

## УЧЕСТВО НА СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ И РЕАКТИВНИ КИСЛОРОДНИ ФОРМИ ВО ПАТОГЕНЕЗАТА НА ПАРОДОНТАЛНАТА БОЛЕСТ

### *THE ROLE OF FREE RADICALS- (FR) AND REACTIVE OXYGEN SPECIES- (ROS) IN THE PATHOGENESIS OF THE PERIODONTAL DISEASE*

Автори: **Маја Пандилова**,  
Киро Ивановски, Силвана Георгиева,  
Снежана Пешевска, Филип Конески,  
Катарина Дирјанска, Емилија Стефановска

Катедра за Болести на устата и пародонтот,  
Стоматолошки факултет, Универзитет „Св.  
Кирил и Методиј“, Скопје, Македонија

Autor: **Maja Pandilova**,  
Kiro Ivanovski, Silvana Georgieva,  
Snezana Pesevska, Filip Koneski,  
Katarina Dirjanska, Emilija Stefanovska

Department for Parodontology, Faculty for Den-  
tistry, University “Ss. Cyril & Methodius” , Skopje,  
Macedonia

#### Апстракт

Патогенетските збиднувања во тек на инфламацијата на пародонталните ткива се сложени и покренуваат мноштво на процеси и чинители.

Меѓу нив во последниве години се поголеми се податоците и сознанијата за учеството на слободните радикали и реактивните кислородни форми .

Целта на трудот беше да се даде преглед и да се систематизираат досегашните сознанија од литературата за потеклото, начинот на дејство и специфичните патогенетски делувања на слободните радикали врз ткивата на пародонтот.

На крај од трудот направена е систематизација на досегашните сознанија за можноста за користење на антиоксидансите и предложените протоколи во терапијата на пародонтопатијата.

**Клучни зборови:** слободни радикали, реактивни кислородни форми, пародонтална болест

#### Abstract

Periodontal inflammation is a complex mechanism including a variety of agents and pathological processes amongs which the role of ROS has been widely investigated.

The paper offers a systematic review of data about the origin, tissue destruction, and pathogenetic implications of Reactive oxygen species (ROS) in periodontal disease.

The paper offers and some strategies about the use of antioxidant agents in periodontal therapy.

**Keywords:** free radicals, free oxygen species, periodontal disease

## Вовед

Слободните радикали по дефиниција се високо реактивни молекули кои во последната електронска обвивка можат да добиваат или губат по еден електрон. Ваквата структура ги прави извонредно нестабилни, па тие опстануваат во организмот многу кратко време, во рангот на една наносекунда или помалку. Меѓутоа, за ова кратко време тие може да предизвикаат сериозни оштетувања, пред се на клеточно ниво како: оштетувања на ДНК, генски мутации, промени во структурата на протеините (правејќи ги туѓи за организмот), липидна пероксидација, оксидација на одредени ензими, стимулирање на создавањето на цитокини, па се обвинуваат за автоимуните заболувања, атеросклеротичните промени и канцерогениот раст на клетките<sup>1</sup>.

Слободните радикали можат да бидат позитивно наелектризирани ( $\text{NAD}\cdot+$ ), негативно наелектризирани ( $\text{O}_2\cdot-$ ) или неутрални ( $\text{OH}\cdot$ ) (со конвенција е прифатено неспарените електрони да се означуваат со  $\cdot$ ).

Постојат одредени молекули како водородниот пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), хипохлорната киселина ( $\text{HOCl}$ ) и т.н. „singlet“ кислород ( $^1\text{O}_2\cdot$ ) кои структурно не претставуваат радикали, а имаат висок оксидациски потенцијал во екстрацелуларната и интрацелуларната средина. Затоа, терминот слободни радикали во последните години се заменува со терминот реактивни кислородни форми, кои ги вклучуваат споменатите молекули<sup>2</sup>.

Редукцијата на кислородот со еден електрон доведува до создавање на супероксиден анион, уште еден дополнителен електрон води до создавање на водороден пероксид, а трет електрон води до создавање на хидроксилен радикал, за кој се смета дека е најактивен мутаген агенс добиен како последица на јонизирачко зрачење.

Некои карактеристики на слободните радикали се дека:

- настануваат при оксидоредуктивните процеси во организмот
- потекнуваат од неутрофилните гранулоцити, моноцитите и фибробластите, како и од клетки на ендотелот на крвните садови
- можат да бидат предизвикани од ултравиолетово зрачење, радијација, пушење, загадена животна средина и сл.

Користењето анестетици, аналгетици и цитостатици може да придонесе за создавањето на сло-

## Introduction

Free radicals (FR) are by definition highly reactive molecules in which an electron can be added or suspended from the last electronic shell. This structure makes the FR extremely unstable, so they survive in the body for a very short time, in the range of a nanosecond or less.

However, during this short time they can cause serious damages, primarily on cellular level as: DNA damage, gene mutations, changes in the structure of proteins (making them unknown for the body), lipid peroxidation, oxidation of certain enzymes, stimulating formation of cytokines. Due to that, it is thought that FR are responsible for some autoimmune diseases, atherosclerotic changes and malignant alteration of cells<sup>1</sup>.

Free radicals can be positively charged ( $\text{NAD}\cdot+$ ), negatively charged ( $\text{O}_2\cdot-$ ) or neutral ( $\text{OH}\cdot$ ) (unpaired electrons are marked with  $\cdot$  by Convention).

There are certain molecules such as hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hypochlorous acid ( $\text{HOCl}$ ) and so-called “singlet” oxygen ( $^1\text{O}_2\cdot$ ) which are not radicals by structure, but have a high oxidation potential in the extracellular and intracellular environment.

Therefore, the term free radicals in recent years was replaced with the term reactive oxygen species (ROS), which include the mentioned molecules<sup>2</sup>.

The reduction of oxygen with an electron leads to formation of superoxide anion. An additional electron leads to formation of hydrogen peroxide, and a third electron leads to formation of hydroxyl radical, which is considered as most active mutagenic agent generated by the effects of ionizing radiation.

Some characteristics of ROS are:

- they are formed in oxidoreductive processes in the body;
- they are generated in neutrophil granulocytes, monocytes, fibroblasts and endothelial cells of blood vessels;
- they can be generated as a result of exposure of ultraviolet radiation, ionizing radiation, smoking, polluted environment etc.

The use of anesthetics, analgesics and chemotherapy may contribute to the formation of ROS.

Once produced, free radicals can react between themselves, which is the least likely outcome considering their short lifetime.



бодните радикали. Еднаш создадени, слободните радикали можат да реагираат меѓу себе, што е најповолен, но воедно и најмалку веројатен исход со оглед на нивниот краток живот. Доколку продукцијата на слободните радикали е во физиолошки граници, тогаш антиоксидативниот систем на организмот ги врзува за себе формирајќи реактивно стабилни соединенија. Меѓутоа, кога продукцијата е зголемена или кога антиоксидативниот систем во организмот е истрошен (малнутриција, диети, зголемена физичка активност) тогаш тие ќе предизвикаат верижна реакција на создавање се поголем број слободни радикали кои можат да бидат и пореактивни од иницијалниот, предизвикувајќи верижна реакција која тече се додека не ја прекине некој од антиоксидативните механизми во организмот<sup>1,2</sup>.

### Слободните радикали и пародонталната болест

Дејството на слободните радикали во текот на пародонтопатијата е согледано од аспект на една инфламаторна состојба. Литературните податоци ги наведуваат следните оштетувања кои можат да настанат во пародонталните ткива под дејство на слободните радикали<sup>3</sup>.

Оштетување и десквамација на епителот нагингивата, бабрење и губење на еластичноста и кинење на колагените влакна,обемна ресорпција на коската и намалување на брзината на вградување на Ц пролин и на крај, а можеби и како почетни промени на крвните садови, задебелување на ѕидот на крвните садови и тромбози на истите со сите исхемични последици.

Во прогресијата на пародонталната болест суштествена улога има недостигот на токоферол при што регистрирани се промени од типот на:

1. Десквамација на епителот
2. Едем
3. Леукоцитна инфилтрација
4. Оштетување на мембраната на фибробластите
5. Намалено ниво на калциум и зголемена ресорпција на алвеоларната коска
6. Гингивална рецесија во предел на моларите

Промените на пародонтот при хроничен недостиг на антиоксиданси се многу слични со хроничните инволутивни промени кои се јавуваат со стареењето. Овој податок дозволува да се извлече заклучокот дека намаленото внесување на антиоксиданси во организмот ги забрзува инволутивните процеси кои се јавуваат со стареењето.

If the production of ROS is in the physiological limits, the anti-oxidative system of the organism binds them, which results in formation of reactive stable compounds.

When production of ROS is increased or when the anti-oxidative system in the body is depleted (malnutrition, diets, increased physical activity) they will cause a chain reaction and create a number of ROS that can be more reactive than the initial, causing a chain reaction.

When the antioxidant mechanisms get active and successfully neutralize the ROS, the chain reaction stops running<sup>1,2</sup>.

### ROS and periodontal disease

Effects of ROS during the periodontal disease are experimentally studied mainly from the perspective of an inflammatory condition. Literature data<sup>3</sup> confirm set of changes in periodontal tissues due to ROS such as:

- Damage and desquamation of the epithelium of the gingiva;
- Swelling, loss of elasticity and tearing of collagen fibers;
- Extensive bone resorption and reducing the speed of incorporation of proline C;
- Thickening of the blood vessel wall (perhaps as initial change) and thrombosis, leading to ischemic consequences.

Furthermore lack of tocopherol has major role in the progression of periodontal disease such as:

1. Desquamation of epithelium;
2. Oedema;
3. Leukocyte infiltration;
4. Damage on the membrane of fibroblasts;
5. Decreased levels of calcium and increased alveolar bone resorption;
6. Gingival recession in the molar area.

Changes in the periodontal tissues in chronic lack of antioxidants are very similar to chronic involutive changes that occur with aging.

Therefore, reduced intake of antioxidants in the body accelerates the involutive processes that occur with aging.



### Потекло на реактивните кислородни форми во тек на пародонтопатијата

Најголем извор на слободни радикали во тек на пародонтопатијата се неутрофилните гранулоцити, бидејќи 90% од вкупниот број на леукоцити во гингивалниот флуид во тек на почетната инфламација и 50% од вкупните леукоцити кои го инфилтрираат припојниот епител отстааат на неутрофилните гранулоцити.

Тие ги продуцираат супероксидните слободни радикали како антибактериски агенс, кои заедно со лизозомалните ензими учествуваат во уништувањето на фагоцитираните микроорганизми. Доколку изостане продукцијата на супероксидниот радикал, фагоцитираните микроорганизми се враќаат во интерстициумот<sup>4</sup>.

### Механизми на оштетување на пародонталните ткива од реактивните кислородни форми

Пародонталните патогени од субгингивалниот дентален плак кои се главни причинители на пародонталната болест, ја активираат инфламацијата преку неколку патишта. Оваа активација се случува преку CD14 и Toll-like рецепторите тип 4, кои се наоѓаат на клеточната мембрана на фибробластите, со што започнуваат да се создаваат и ослободуваат бројни инфламаторни цитокини. Со тоа локално драстично се зголемува бројот на неутрофилните гранулоцити како прва линија на одбрана.<sup>5</sup>

Во тек на инфламацијата настанува деструкција на неутрофилните гранулоцити и ослободување на супероксидниот радикал, кој и не е многу агресивен. Меѓутоа, супероксидниот радикал влегувајќи во реакција со молекулите на вода со посредство на бакарни и железни јони покренува верижна реакција која резултира со формирање на хидроксилниот радикал, кој е далеку пореактивен. Хидроксилниот радикал најчесто се поврзува со промени во структурата на ДНК, исцрпување на аденозинтрифосфатот како и генски мутации и малигни трансформации<sup>6</sup>.

Од друга страна, се зголемува и создавањето на матриксните металопротеинази, што доведува до деструкција на ткивото. Оваа деструкција води до хиперпродукција на липидни пероксиди, инфламаторни медијатори и оксидирани протеини, кои од своја страна дополнително ги активираат макрофагите, неутрофилите и фибробластите и тие уште повеќе создаваат слободни радикали<sup>7</sup>.

Меѓутоа, позначајно е што во тек на инфла-

### Origin of ROS during periodontal disease

The major source of ROS during the periodontal disease are the neutrophil granulocytes.

That is because 90% of the total number of leukocytes in gingival fluid during the initial inflammation and 50% of total leukocytes that infiltrate the junctional epithelium represents neutrophil granulocytes.

They produced the superoxide free radicals as antibacterial agents, which together with lysosomal enzymes participate in the destruction of microorganisms. Absence of free radical production means returning of phagocytized microorganisms back to interstitium<sup>4</sup>.

### Mechanisms of periodontal tissue damage by ROS

Periodontal pathogens from subgingival dental plaque are major causers of periodontal disease. They activate the inflammation through several pathways. This activation occurs via CD14 and Toll-like receptors type 4, which are found on the cell membrane of fibroblasts, which begin to produce and release a number of inflammatory cytokines.

Therefore, there is a huge increase in the number of local neutrophil granulocytes as a first line of defense.<sup>5</sup>

During inflammation there is destruction of neutrophil granulocytes and releasing superoxide radical, which is not so much aggressive.

However, the superoxide radical gets in a reaction with water molecules through the copper and iron ions and initiates a chain reaction that results in formation of hydroxyl radical, which is far more reactive than superoxide. Hydroxyl radical is commonly associated with changes in the structure of DNA, depletion of adenosine triphosphate, gene mutations and malignant transformation as well<sup>6</sup>.

On the other hand, formation of matrix metalloproteinases occurs, leading to destruction of the tissue.

This destruction leads to overproduction of lipid peroxides, inflammatory mediators and oxidized proteins, which further activate macrophages, neutrophils and fibroblasts, so they produce more free radicals<sup>7</sup>.

However, more important is that during inflamma-



маџата хидроксилниот радикал покренува верижна реакција позната како липидна пероксидација. Како најчест супстрат на оваа реакција се јавува арахидонската киселина, а како крајни продукти на оваа реакција се јавуваат простагландини од сите класи со сите придружни дејства, како и тромбокساني кои ја забрзуваат агрегацијата на тромбоцитите предизвикувајќи тромбоза на крвните садови<sup>8</sup>.

Современите теории за патогенезата на пародонтопатијата особено значење им придаваат на промените на крвните садови. Факторите на ризик за настанување на пародонтопатија и атеросклерозата доведуваат до недостаток на омега масни киселини (ФАС). Тоа доведува до ослободување на радикали на кислородот при аеробно разградување на фагоцитирачките леукоцити, кои се акумулираат во гингивалната течност и ткивото на гингивата. Полиморфнонуклеарните леукоцити ослободуваат инфламаторни медијатори, хидролази и кинини. Овие материи предизвикуваат фази на дилатација и фази на спазам на капиларната мрежа во гингивата и имунолошки нарушувања. Последователно се јавуваат фази на хипероксија и хипооксија на пародонтот и дифузија на слободните радикали од гингивалното ткиво во коскениот ткиво<sup>9</sup>.

Оксидацијата на липидите под дејство на слободните радикали во коскениот ткиво, атеросклерозата на крвните садови во коскениот ткиво и имунопатолошките механизми предизвикуваат деструкција на колагените влакна и ресорпција на алвеоларната коска<sup>9</sup>.

Исто така, докажано е дека присуството на слободните радикали (особено супероксидот и водородниот пероксид) има поголема улога во активацијата на остеокластите отколку во директната ресорпција на коскениот матрикс. Контроверзно, азотниот оксид кој исто така влегува во групата на радикали има улога во инхибицијата на коскениот ресорпција<sup>10</sup>.

In vitro студиите покажуваат дека слободните радикали се способни да деградираат бројни компоненти на екстрацелуларниот матрикс, пред сè протеогликаните, што резултира со модификација на функционалните аминокиселински групи. Ова води до фрагментација на протеините и деполимеризација на гликозаминогликаните. Истражувањата вршени на алвеоларна коска од животинско потекло покажале значајна деструкција на коската во текот на 24 часа. Во однос на протеините, забележано е намалување на пропорцијата на леуцин и комплетно отсуство

tion, the hydroxyl radical initiates a chain reaction known as lipid peroxidation.

The most common substrate of this reaction is arachidonic acid, and products of this reaction are prostaglandins of all classes with all their actions, and thromboxane that accelerate platelet aggregation causing thrombosis of blood vessels as well<sup>8</sup>.

Current theories of pathogenesis of the periodontal disease give big importance to changes in blood vessels.

The risk factors for the occurrence of atherosclerosis and periodontal disease lead to a lack of omega fatty acids (FAS).

This leads to releasing of oxygen radicals during the aerobic lysis of leukocytes that accumulate in the gingival fluid and gingival tissue. Polymorphonuclear leukocytes release inflammatory mediators, kinins and hydrolases.

These substances cause episodes of dilatation and episodes of spasm of the capillars in the gingiva and some immune disorders. Subsequently, episodes of hyperoxia and hypoxia in the periodontal tissue occur, which leads to diffusion of ROS from the gingival tissue in bone tissue<sup>9</sup>.

Oxidation of lipids by the action of free radicals in bone tissue, atherosclerosis of the blood vessels in the bone tissue and immunopathological mechanisms cause destruction of collagen fibers and alveolar bone resorption as well<sup>9</sup>.

It is also demonstrated that the presence of free radicals (especially superoxide and hydrogen peroxide) has a greater role in the activation of osteoclasts than in direct resorption of bone matrix.

Controversial, nitric oxide, which also belongs to the group of radicals, plays a role in the inhibition of bone resorption<sup>10</sup>.

In vitro studies show that free radicals are able to degrade a number of extracellular matrix components, mainly proteoglycans, resulting in modification of amino acid functional groups.

This leads to fragmentation of proteins and depolymerization of glycosaminoglycans. Studies performed on alveolar bone of animal origin showed significant bone destruction within 24 hours.

When talking about proteins, there is a decrease in the proportion of leucine and complete absence of proline, tyrosine and phenylalanine.



на пролин, тирозин и фенилаланин. Со ваквите студии се покажало дека хидроксилниот радикал (OH) е пореактивен отколку водородниот пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>.

Уште еден извор на слободни радикали во пародонтот е никотинамид динуклеотид фосфат оксидазата, која се создава во фагоцитите. Кај пациентите со агресивна пародонтопатија се смета дека значително е зголемено создавањето на овој реактивен молекул, како резултат на дејството на микроорганизмите, а се дава и одреден акцент на наследната компонента. Дополнително, мутации на гените кои се одговорни за функционирање на Toll-like рецепторите (особено тип 4) се поврзуваат со побрзото активирање на инфламаторните реакции<sup>3,5,10</sup>.

Деструктивното дејство на слободните радикали врз различните ткива може да се процени со детектирање на одредени биомаркери. Главни биомаркери на липидната периксидација се конјугираните диени, реактивните супстанции на тиобарбитуратната киселина (малондиалдехид), изопростанази и др. Биомаркер кој укажува на оштетување на ДНК е 8-хидроксидеоксигванозин. Бидејќи протеинското оштетување од страна на слободните радикали е доста сложено, а истото се јавува и при други механизми, неговото одредување е неспецифично. Сепак, денес најчесто како биомаркер се користи акролеинот<sup>12</sup>.

Споменатите податоци ги поттикнуваат прашањата за акумулација на продуктите на слободните радикали во гингивалната течност и во гингивата и состојбата на оралната хигиена. Се поставува прашањето за состојбата на пародонтот кај индивидуи со вроден недостаток на антиоксидантни ензими. Тргувајќи од концепцијата на улогата на слободните радикали во патогенезата на пародонтопатијата, се смета дека е целисходно да се разработи фармакопрофилактиката на пародонтопатијата со биоантиоксиданси и други биорегулатори. Современите сознанија укажуваат дека оваа фармакопрофилактика треба да биде дополнителна мерка на веќе познатите мерки за превенција на пародонтопатијата.

Систем на антиоксидативна заштита на пародонтот

Антиоксиданс (АО) е секоја супстанција која има способност да го одложи или целосно спречи оксидирањето на некој супстрат. Постојат многу биолошки молекули кои имаат антиоксидативен потенцијал. Тука спаѓа витаминот Ц (ас-

Such studies have shown that the hydroxyl radical (OH) is more reactive than hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>.

Another source of free radicals in the periodontal tissue is nicotinamide dinucleotide phosphate oxidase, which is produced by the phagocytes. It is thought that in patients with aggressive periodontal disease there is significant increasing of the formation of reactive molecules, as a result of the action of microorganisms, and it gives a certain emphasis on hereditary component.

In addition, mutations in genes that are responsible for the functioning of Toll-like receptors (especially type 4) are associated with faster activation of inflammatory responses<sup>3,5,10</sup>.

The destructive effects of free radicals on different tissues can be estimated by detecting specific biomarkers.

Main biomarkers of lipid peroxidation are conjugated dienes, reactive substances of thiobarbituric acid (malondialdehyde) isoprostanes etc.

Biomarker that indicates DNA damage is 8-hydroxydeoxyguanosine. Since protein damage by free radicals is quite complex and it occurs at other mechanisms as well, its determination is not specific. However, the acrolein is the mostly used biomarker today<sup>12</sup>.

All data raise the problem of accumulation of products of free radicals in gingival fluid, gingival condition and oral hygiene as well. The issue is what is the state of the periodontal tissue in individuals with congenital deficiency of antioxidant enzymes.

From the conception of the role of free radicals in the pathogenesis of parodontopathy it is considered that it has to be developed the aspects of pharmacoprophylaxis of periodontal disease with bioantioxidants and other bioregulators.

Current findings suggest that this pharmacoprophylaxis should be additional measure to already known prevention measures for the periodontal disease.

System of antioxidant protection of periodontal tissue

Antioxidant (AO) is any substance that has the ability to delay or completely prevent the oxidation of a substrate. There are many biological molecules that have antioxidant potential. These include vitamin C (ascorbic acid), vitamin E (tocopherol), vitamin A,



корбинска киселина), витаминот Е (токоферол), витаминот А,  $\beta$ -каротен, полиамини, NADPH, цистеин, таурин, метионин, редуциран глутатион и др. Најважни ензими кои ја штитат клетката од реактивните кислородни радикали се: супероксид димутаза (металоензим), кој ја катализира димутазијата (реакција во која две идентични молекули имаат различна судбина); каталазата и пероксидазата, кои го метаболизираат водородниот пероксид; како и редуцираниот глутатион и глутатион пероксидазата која содржи селеноцистеин, аналог на цистеинот кој наместо сулфур содржи селен, кој исто така е познат како силен антиоксиданс<sup>13</sup>.

АО ја инхибираат автооксидацијата на липидите под дејство на слободните радикали уште во иницијалната фаза. Освен тоа, АО ги инхибираат и активните форми на кислородот (супероксид димутази) во мембраната на клетките. Оксидираните форми на аскорбинската киселина се возобновуваат со глутатионот, којшто добива атоми на водород од NADPH. Инхибирањето на слободните радикали се остварува со ланецот глутатион-аскорбат-токоферол, со транспортирање на електрони (водородни) од пиридин нуклеотидите (NAD и NADPH) кон слободните радикали. Овој процес гарантира константно ниско ниво на слободни радикали во клетките. Паралелно со овој антиоксидантен систем во клетките, во инхибирањето на слободните радикали учествуваат и други ензими. Тоа се: глутатион независни редуктази, каталази и пероксидази.

Локализацијата и карактерот на патолошкиот процес предизвикан од слободните радикали зависи од:

1. Природата на егзогениот индуктор на слободни радикали
2. Генотипските особини на ФАС во одделни ткива.

Функционалната активност на ФАС на различните органи и ткива зависи од:

1. Ензимскиот катаболизам (дехидрогенизација) и продукција на NAD+H и NADP+H
2. Степенот на искористеност на NAD+H и NADP+H во биосинтетските процеси
3. Нивото на митохондријалната оксидација на NAD+H
4. Нивото на есенцијалниот ФАС (токоферол, аскорбат, биофлавоноиди и др.)<sup>13</sup>

Испитувањата покажале дека антиоксидантната заштита на пародонтот се должи на ланецот

$\beta$ -carotene, polyamines, NADPH, cysteine, taurine, methionine, reduced glutathione and others.

Key enzymes that protect cells from reactive oxygen radicals are: superoxide dismutase (metalloenzyme), which catalyzes dismutation (reaction in which two identical molecules have different destiny); catalase and peroxidase, which metabolize hydrogen peroxide; and reduced glutathione and glutathione peroxidase which contains selenocystein, an analogue of cysteine that instead of sulfur contains selenium, which is known as a strong antioxidant<sup>13</sup>.

AO inhibit the auto oxidation of lipids by the action of free radicals early in the initial stage. Moreover, AO inhibit the active forms of oxygen (superoxide dismutases) in the membrane of cells as well. Oxidized forms of ascorbic acid are regenerated by glutathione, which receives hydrogen from NADPH.

Inhibition of free radical is done by the chain glutathione-ascorbate-tocopherol, by transporting of electrons (hydrogen) of pyridine nucleotides (NAD and NADPH) to free radicals.

This process ensures a constantly low level of free radicals in cells.

Along with this antioxidant system, other enzymes are included in inhibiting the free radicals in cells.

These are glutathione independent reductases, catalases and peroxidases.

The localization and nature of the pathological process caused by free radicals depends on:

1. The nature of the exogenous inducer of free radicals;
2. Genotypic features of FAS in some tissues.

The functional activity of FAS in various organs and tissues depends on:

1. The enzyme catabolism (dehydrogenation) and production of NAD+H and NADP+H;
2. The degree of utilization of NAD+H and NADP+H in biosynthetic processes;
3. The level of mitochondrial oxidation of NAD+H;
4. The level of essential FAS (tocopherol, ascorbate, bioflavonoids etc.)<sup>13</sup>

Studies have shown that antioxidant protection of the periodontal ligament is performed by chain AO, in so far as periodontal ligament is one of the tissues with greatest vascularisation.



на АО, дотолку повеќе што пародонтот е едно од најдобро крвоснабдени ткива. Но, исто така, пародонтот се одликува и со високо ниво на физиолошка инфилтрација на неутрофилните гранулоцити коишто продуцираат кислородни радикали. Карактеристично за пародонталното ткиво е што има пониско ниво на тиолови АО (глутатион) во споредба со другите ткива, а повисоко ниво на аскорбат и поголема активност на каталазата. Произлегува дека во системот на антиоксидантната заштита на пародонтот особено значење имаат: каталазата, аскорбинската киселина и биофлавоноидите. Ова се потврдува со клиничките иследувања. При недостаток на споменатите антиоксиданси се забележуваат деструктивни процеси во пародонтот, предизвикани од патолошкото дејство на слободните радикали<sup>12</sup>.

Покрај дејството на крвните садови, слободните радикали учествуваат во оштетувањата на ниво на клетки преку липидна пероксидација.

Кога хидроксилниот радикал ќе се најде во близина на клеточната мембрана, реагира со бочните ланци на фосфолипидите, формирајќи пероксидни радикали кои се најагресивни радикали што предизвикуваат оштетување на клетките. Доколку во клеточната мембрана пероксидните радикали не бидат врзани од алфа токоферолот, кој е еден од најмоќните антиоксиданси лоцирани во клеточната мембрана, ќе настане деструкција на клеточната мембрана и лиза на клетката<sup>8,13</sup>.

Доколку ова не се случи, пероксидниот радикал навлегува во клетката покренувајќи процеси на липидна пероксидација чиј краен продукт е малоничниот диалдехид чие натрупување води до смрт на клетката. Од друга страна, како краен продукт на овој процес се јавува единствена класа на простагландин Е<sub>2</sub>, простааноиди, кои се вклучуваат во продукцијата на лимфокини и предизвикуваат вазодилатација и остеокластна ресорпција на коската. Крајните продукти на липидната пероксидација предизвикуваат и пореметување во нивоата и функцијата на калциум АТФ фазата, отворање на порите на клеточната мембрана, натрупување на калциум во клетките и активација на калциум-зависните ензими<sup>5</sup>.

Доколку пероксидниот радикал навлезе во моноцитите покренува еден специфичен механизам на активација на NF-κB протеин кој се наоѓа во цитоплазмата во неактивна форма. Во тек на пародонтопатијата тој е активиран од интерлеукин 1, тумор некротизирачкиот фактор Алфа 1 и ендотоксинот. Меѓутоа, под дејство на слободни-

But the periodontal ligament is characterized with high physiological infiltration of neutrophil granulocytes which produce oxygen radicals.

It is characteristic that periodontal tissue has a lower level of thiolic AO (glutathione) compared with other tissues, higher levels of ascorbate and higher activity of catalase.

Therefore, the system of antioxidant protection of the periodontal tissue significantly depends of catalase, ascorbic acid and bioflavonoids. This is confirmed by clinical examinations.

In case of lack of the aforementioned antioxidants, some destructive processes in the periodontal tissue caused by pathological effects of free radicals are seen<sup>12</sup>.

Besides the effect to the blood vessels, free radicals participate in damaging the cells by lipid peroxidation.

When the hydroxyl radical is found near the cell membrane, it reacts with the side chains of the phospholipids, forming peroxide radicals which are the most aggressive radicals that cause cell damage.

If the peroxide radicals in the cell membrane are not bound by alpha tocopherol, which is one of the most powerful antioxidants located in the cell membrane, destruction of the cell membrane and cell lysis will happen<sup>8,13</sup>.

If this happens, the peroxide radical enters the cell raising processes of lipid peroxidation which end product is malondialdehyde which accumulation leads to cell death.

On the other hand, as end product of this process there is a unique class of prostaglandin E<sub>2</sub>, prostanooids, that are involved in the production of lymphokines and induce vasodilation and osteoclastic bone resorption.

The end products of lipid peroxidation cause disruption in the levels and function of calcium ATP stage as well, opening the pores of the cell membrane which leads to accumulation of calcium in cells and activation of calcium-dependent enzymes<sup>5</sup>.

If peroxide radical enters into monocytes, it raises a specific mechanism of activation of NF-κB protein located in the cytoplasm in an inactive form. During periodontal disease it is activated by interleukin 1, tumor necrosis factor alpha 1 and endotoxin. However, under the action of free radicals, it is transformed into active form by direct oxidation. It can



те радикали, со директна оксидација преминува во активна форма која може да ја премине јадрената мембрана каде директно учествува во транскрипцијата и продукцијата на проинфламаторни цитокини (интерлеукин 2, 6, 8 ТНФ алфа1 и бета интерферон)<sup>8</sup>.

Токму во овој дел е насочен и интересот на научниците во последно време. Имено, антиоксиданс кој учествува во кинење на ланецот на продукцијата на пероксидните радикали, а со тоа и во контролата или намалувањето на продукцијата на проинфламаторни цитокини е глутатионот, а самата реакција е селен-зависна. Антиоксидативните својства на глутатионот се должат на цистеинот во неговиот состав.

Во тек на пародонтопатијата микроорганизмите од пародонталниот џеб го трошат цистеинот формирајќи водороден сулфид (кој е токсичен за клетките и ја инактивира цитохром оксидазата) и на тој начин се троши глутатионот како антиоксиданс<sup>13,14,15</sup>.

За разлика од многубројните литературни податоци за употребата на антиоксиданси во терапијата и за патогеното дејство на слободните радикали, во литературата се наоѓаат оскудни и контрадикторни податоци за тоталниот антиоксидативен капацитет на гингивата и гингивалниот флуид<sup>16,17,18,19</sup>.

Тоталниот антиоксидативен капацитет на плунката е помал во однос на плазмата, опаѓа заедно со возраста и зависи од количината на излачена плунка

Во однос на гингивалниот флуид, тоталниот антиоксидативен статус во 70% се должи на уричната киселина. Глутатион и коензим Q се најдени во помали количини<sup>20,21,22</sup>.

Примена на антиоксидансите во терапијата на пародонтопатијата

Препаратите на антиоксидансите претставуваат нова фармаколошка група, а нивната клиничка примена се поврзува со името на Н.М. Емануел.

Во испитувањата спроведени во последниве години утврдени се следниве карактеристики на АО:

- 1.Тераписките дози на АО не предизвикуваат физиолошки и биохемиски ефекти на здрав пародонт
- 2.Заштитните ефекти на АО не се специфични само за одредена состојба

cross the core membrane and there gets directly involved in transcription and production of proinflammatory cytokines (interleukin 2, 6, 8 and TNF alpha1 and beta interferon)<sup>8</sup>.

Nowadays, the interest of scientists is great in this area. The antioxidant participating in tearing the chain of production of peroxide radicals and thus controlling or decreasing the production of proinflammatory cytokines is glutathione, and the reaction is selenium-dependent.

Antioxidant properties of glutathione are due to cysteine in its composition.

During periodontal disease, microorganisms from periodontal pocket spend cysteine, forming hydrogen sulfide (which is toxic to cells and inactivates cytochrome oxidase) and thus the level glutathione as an antioxidant is getting low.

Unlike many literary data for the use of antioxidants in the treatment and pathogenic effects of free radicals, there are scarce and contradictory data on total antioxidant capacity of gingiva and gingival fluid<sup>13,14,15</sup>.

The total antioxidant capacity of saliva is lower than in plasma, it declines with age and depends on the amount of secreted saliva<sup>16,17,18,19</sup>.

In terms of gingival fluid, total antioxidant status in 70 % is due to uric acid. Glutathione and coenzyme Q were found in smaller amounts<sup>20,21,22</sup>.

Use of antioxidants in the treatment of periodontal disease

The antioxidant preparations are a new pharmacological group and their clinical application is associated with the name of N.M. Emmanuel.

In surveys conducted in recent years the following characteristics of the DA are identified:

1. Therapeutic doses of AO do not cause physiological and biochemical effects of healthy periodontal tissue;
2. The protective effects of AO are not specific only to a particular situation;
3. AO have protective effects in different conditions (hyperthermia-hypothermia; hypoxia-hyperoxia; hypodynamia-exercise);
4. Their protective effects are highlighted when combined liposoluble and hydrosoluble inhibitors of free radicals.

All features of AO are due to their biological role to prevent non-enzymatic abiotic oxidation and their functioning within the FAS. The former fea-



3.АО имаат заштитни ефекти при различни состојби (хипертермија-хипотермија; хипооксија-хипероксија; хиподинамија-физички напор)

4.Нивните заштитни ефекти се потенцираат кога се комбинираат липосолубилни и хидросолубилни инхибитори на слободните радикали

Сите карактеристики на АО се должат на нивната биолошка улога да ја спречат абиотичната неензимска оксидација и нивното функционирање во состав на ФАС. Спомнатите карактеристики на антиоксидансите овозможуваат тие да се користат кај здрави индивидуи при интензивен психофизички напор, во продромален стадиум на болеста и како фармакопрофилактика на старењето. Пероксидната теорија на атеросклерозата на малите крвни садови и застапеноста на овие промени кај пародонталната болест, се основа за примена на АО во терапијата на ова заболување<sup>15,16</sup>.

Испитувањата на експериментални животни покажале дека повеќекратното внесување на препаратот глутатион дава добри резултати. Тие вклучуваат смалување на вредностите на пародонталните индекси и подобрување на наодот на рентгенската слика.

Примената на глутатион во вид на завој нагингивата кај заболениите од пародонталната болест дава добри терапевтски резултати, особено во раната фаза од развојот на болеста. Освен со глутатион, подобрување на клиничката слика на пародонтопатијата е забележано и со примена на други антиоксиданси: токоферол, аскорбинска киселина и др.

#### Основни принципи за примена на АО во терапијата на пародонтопатијата

- 1.Приоритетно искористување на природните антиоксиданси
- 2.Во зима и во пролет задолжително да се употребуваат АО со директно дејство, а во лето и есен препарати со индиректно дејство.
- 3.Комбинирана примена на хидросолубилни и липосолубилни АО.
- 4.Искористување на локалното дејство на АО (во вид на масти и пасти), со што се постигнува нивна висока концентрација во ткивото на пародонтот.
- 5.Адекватно дозирање кое треба да се заснова на телесната маса, возраста и типот на исхраната.
- 6.Должината на профилактичното ординирање на АО зависи од етиолошките фактори на

tures of antioxidants provide that they can be used in healthy individuals during intense physical and mental effort, the prodrome stage of disease and aging pharmacoprophylaxis.

The peroxide theory of atherosclerosis of small vessels and the presence of these changes in periodontal disease is base for application of AO in the treatment of this disease<sup>15,16</sup>.

Studies on experimental animals have shown that multiple input of preparation of glutathione gives good results.

These include reducing the values of periodontal indexes and improvement of the X-ray findings of.

The use of glutathione in the form of a bandage on the affected gingiva in periodontal disease treatment gives good results, especially in the early stage of the disease.

In addition to glutathione, improved clinical picture of periodontal disease is registered with the application of other antioxidants as well: tocopherol, ascorbic acid, etc.

#### Basic principles of application of AO in treatment of periodontal disease

1. Priority usage of natural antioxidants;
2. In winter and spring, AO with direct action must be used; in summer and autumn preparations with indirect effects should be used;
3. Combined application of hydrosoluble and liposoluble AO;
4. Utilizing the local action of AO (ointments and pastes), which achieved their high concentration in the periodontal tissue;
5. Adequate dosage which should be based on body weight, age and type of diet;
6. The length of prophylactic prescription of AO depends on the etiological factors of periodontal disease;
7. Laboratory control the effects of AO.

The stated principles are a basis for preparing patterns for pharmacotherapy and prophylaxis of periodontal disease by applying preparations of AO.

Schemas are a set of measures that lead to:

- Elimination of local irritating factors;
- Impact on the microflora in the periodontal pockets using osteotropic antibiotics;
- Application of antioxidant pastes.



пародонталната болест.

7.Лабораториска контрола на ефектите на АО.

Наведените принципи претставуваат основа за изработка на шеми за фармакотерапија и профилакса на пародонталната болест со примена на препарати на АО. Шемите се збир на мерки со кои се постигнува:

- елиминирање на локалните иритирачки фактори
- дејство врз микрофлората во пародонталните џебови со помош на остеотропни антибиотици
- аплицирање антиоксидантни пасти

Согледувајќи ги клиничките карактеристики на пародонталната болест, се препорачува локално да се ординираат АО со директно дејство во зима и пролет, а АО со индиректно дејство во лето и есен.

Наведените податоци дозволуваат да се формулира концепцијата на фармаколошката примена на АО:

- 1.Приоритетно искористување на природните АО
- 2.Користење на препарати со заштитно дејство врз колагенот
- 3.Користење на инхибитори на анаеробното оштетување на неутрофилите
- 4.Користење на ангиопротектори кои делуваат на крвните садови на пародонтот
- 5.Изработка на АО кои делуваат и во липосолубилна и хидросолубилна интраклеточна и екстраклеточна средина<sup>22</sup>.

### Заклучок

Деструктивните дејства на слободните радикали во тек на пародонталната инфекција се доволно документирани за да секој клиничар во тек на спроведувањето на терапијата на пародонталната болест го земе во предвид и антиоксидативната терапија како дополнителна мерка во лекувањето.

By observation of the clinical features of the periodontal disease, it is recommended local AO with direct effect to be prescribed in winter and spring, and AO with indirect effects in summer and autumn.

The above data allow to formulate the concept of pharmacological usage of AO:

1. Priority use of natural AO;
2. Using preparations with collagen-protective effect;
3. Using inhibitors of anaerobic damaging neutrophils;
4. Using angioprotectors that affect the blood vessels of the periodontal ligament;
5. Producing AO that act in liposoluble and hydrosoluble intracellular and extracellular environment<sup>22</sup>.

### Conclusion

The emerging data for the role of ROS in periodontal inflammation should point out a new direction of periodontal treatment planning including the use of antioxidants as additional treatment of periodontal disease.



## ЛИТЕРАТУРА

## REFERENCES

1. Huber W. Future trends in radical studies, in *Inflammation — Mechanisms and Treatment*. Willoughby P A and Giroud JP, Eds., University Park Press, Baltimore, 1980, 27.
2. Proctor PH and Reynolds ES. Free radicals and disease in man. *Physiol. Chem. Phys.* 1984;16:175.
3. Enwonwo CO. Interface of malnutrition and periodontal diseases. *Am J Clin Nutr.* 1995; 61(Suppl):430S-436S.
4. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral disease.* 2000;6(3):138-51.
5. Dahiya P, Kamal R, Gupta R, Puri A. Oxidative stress in chronic periodontitis. *Chronicles of Young Scientists.* 2011; 2(4):178-181.
6. Canakçi CF, Çiçek Y, Canakçi V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Mosc).* 2005;70(6):619-28.
7. Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2005 Oct;40(5):378-84. PubMed PMID: 16105090.
8. Sharma A, Sharma S. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Periodontics: A Review. *Int J Dent Clin.* 2011;3(2):44-47.
9. Moseley R, Waddington RJ, Embery G, Rees SG. The modification of alveolar bone proteoglycans by reactive oxygen species in vitro. *Connect Tissue Res.* 1998;37(1-2):13-28. PubMed PMID: 9643644
10. D’Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res.* 2010;89:1241.
11. Chapple IL, Brock G, Eftimiadi C, Matthews JB. Glutathione in gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease. *Mol Pathol.* 2002;55:367-3.
12. Lakshmi SS, Mythili R. Antioxidants in Periodontal Diseases: A Review. *Ind J Multidiscipl Dent.* 2011; 1(3):140-146.
13. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol.* 1997 May;24(5):287-96. Review. PubMed PMID: 9178107.
14. Linden GJ, McClean KM, Woodside JV, Patterson CC, Evans A, Young IS, et al. Antioxidants and periodontitis in 60-70-year-old men. *J Clin Periodontol.* 2009;36:843-9.
15. Abou Sulaiman AE, Shehadeh RM. Assessment of total antioxidant capacity and the use of vitamin C in treatment of non-smokers with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2010;81:1547-54.
16. Pavlica Z, Petelin M, Nemeč A, Erzen D, Skalerić U. Measurement of total antioxidant capacity in gingival crevicular fluid and serum in dogs with periodontal disease. *Am J Vet Res.* 2004;65:1584-8.
17. Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal disease. *Clin Oral Investig.* 2003;7:103-7.
18. 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;105:167-2.
19. Moore S, Calder KA, Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res.* 1994;21:417-25.
20. Kim SC, Kim OS, Kim OJ, Kim YJ, Chung HJ. Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. *J Periodontal Implant Sci.* 2010;40:164-71.
21. Guarnieri C, Zucchelli G, Bernardi F, Csheda M, Valentini AF, Calandriello M. Enhanced superoxide production with no change of the antioxidant activity in gingival fluid of patients with chronic adult periodontitis. *Free Radic Res Commun.* 1991;15:11-6.
22. Mason RF and Chingnell CF. Free radicals in pharmacology and toxicology - selected topics. *Pharmacol. Rev.* 1981;33:189.