

UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Mila D. Vučković

**UTICAJ INJEKTABILNOG FIBRINA BOGATOG
TROMBOCITIMA U INICIJALNOJ TERAPIJI
HRONIČNOG PARODONTITISA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Mila D. Vučković

**THE EFFECT OF INJECTABLE PLATELET-
RICH FIBRIN IN THE INITIAL THERAPY OF
CHRONIC PERIODONTITIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Mentor:

Prof.dr Zoran Aleksić,

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu

Članovi komisije:

Prof. dr Saša Janković,

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu

Prof. dr Jelena Milašin,

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
RJ Inštitutski predmeti – Humana genetika

Prof. dr Milanko Đurić,

Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet,
Klinika za stomatologiju Vojvodine

Datum odbrane: __/__/____.

Zahvalnica

Najpre se zahvaljujem mom mentoru profesoru dr. Zoranu Aleksiću na profesionalnoj podršci, ukazanom poverenju i datoj slobodi prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se profesorima dr Saši Jankoviću i dr Nataši Nikolić Jakobi, na pokazanoj podršci i razumevanju u mom naučnom i kliničkom radu, kao i na dodatnoj podršci profesora dr Milanka Đurića.

Posebno se zahvaljujem profesorki dr Jeleni Milašin na nesebičnoj pomoći u laboratorijskom radu, sagledavanju dobijenih rezultata i ličnom angažovanju u njihovom javnom publikovanju; na doprinosu u izradi ove doktorske disertacije, brojnim korisnim savetima i datoj mogućnosti da se upoznam sa naučno-istraživačkim radom.

Zahvaljujem se profesorki dr Biljani Miličić na predanom radu u toku statističke obrade podataka i neizmernoj pomoći u sagledavanju dobijenih rezultata iz najrazličitih analitičkih uglova.

Zahvaljujem se srdačno kolektivu Klinike za parodontologiju i oralnu medicinu.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici na neizmernoj podršci, ljubavi i razumevanju!

Apstrakt

Parodontitis je hronično, inflamatorno i destruktivno oboljenje svih potpornih tkiva zuba: gingive, cementa korena zuba, periodontalnog ligamenta i alveolarne kosti. Inflamacija započinje u gingivi, a potom se, kako bolest napreduje, širi u dublja parodontalna tkiva. Kao posledica javlja se resorpcija alveolarne kosti koja može dovesti do gubitka zuba. Epidemiološki podaci iz čitavog sveta ukazuju na izuzetnu rasprostranjenost oboljenja potpornog aparata zuba – gingivitisa i parodontitisa. Pored eliminacije osnovnog etiološkog faktora, dentalnog plaka i inflamacije parodontijuma, cilj inicijalne terapije (engl. *scaling and root planing*-SRP) je da se ostvari delimična ili potpuna regeneracija svih izgubljenih parodontalnih tkiva. Kako bi se unapredila SRP terapija mogu joj se pridodati pomoćni terapijski postupci.

Regeneraciju kako mekih, tako i čvrstih tkiva parodontijuma odlikuje kompleksna interakcija brojnih intracelularnih i ekstracelularnih signalnih mehanizama. Poznato je da trombociti kao rezervoari velikog broja faktora rasta i drugih bioaktivnih molekula, imaju značajnu ulogu u procesu zarastanja rana. Tečni oblik fibrina bogatog trombocitima, injektabilni fibrin bogat trombocitima (engl. *injectable platelet-rich fibrin* – i-PRF) predstavlja revolucionarni korak u terapijskom konceptu aktivne regeneracije tkiva. Ovaj autologi trombocitni koncentrat se dobija pažljivim centrifugiranjem venske krvi, bez dodavanja antikoagulantnih sredstava ili drugih biohemijски aktivnih susstanci. Postepenim oslobađanjem bioaktivnih molekula porekla trombocita i leukocita zarobljenih u gustoj fibrinskoj mreži i-PRF -a, dolazi do pokretanja procesa regeneracije; sinteze DNK, diferencijacije pluripotentnih matičnih ćelija, proliferacije i migracije ćelija, hemotakse polimorfonuklearnih leukocita, kao i sinteze ekstracelularnog matriksa i angiogeneze.

Cilj ove studije je bio da se ispita efekat aplikacije i-PRF-a u toku SRP tretmana u vidu uticaja na smanjenje inflamacije tkiva, koncentracije medijatora zapaljenja i mikroorganizama u sulkusnoj tečnosti (engl. *gingival crevicular fluid* – GCF), kao i stepena uspešnosti procesa regeneracije. Kod pacijenata obolelih od hroničnog parodontitisa uključenih u studiju, evidentirani su bili klinički parametri: dubina sondiranja (engl. *periodontal pocket depth* – PPD), nivo ivice gingive (engl. *level of gingival margin* – LGM), nivo pripojnog epitela (engl. *clinical attachment level* – CAL), krvarenje na provokaciju (engl. *bleeding on probing* – BOP) i plak indeks (engl. *plaque index* – PI). Uzorci GCF uzimani papirnim poenima (Periopaper, Amityville, NY, USA) su čuvani na -70 °C. Koncentracije parodontopatogenih mikroorganizama: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A. a.), *Porphyromonas gingivalis* (P. g.), *Prevotella intermedia* (P. i.) i *Tannerella forsythia* (T. f.) su analizirane ili određivane primenom lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) nakon dodavanja reverznih visoko specifičnih prajmera i univerzalnog „forward“ prajmera za 16s rRNK. Takođe, ukupna koncentracija mikroorganizama izračunavana je qPCR-om u realnom vremenu (engl. *PCR-real time*). Uzorkovanje GCF korišćeno je i za utvrđivanje nivoa matriksne-metaloproteinaze-8 (MMP-8), faktora nekroze tumora- α (TNF- α) i alkalne fosfataze (ALP). Analiza njihove koncentracije u ovoj tečnosti je sprovedena upotrebom odgovarajućih komercijalnih ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) kompleta. Statistički paket za društvene nauke (softverski paket SPSS, verzija 20.0; SPSS Inc., Čikago, IL, SAD) korišćen je za analizu svih podataka. Razlike

između posmatranih grupa su smatrane značajnim kada je p vrednost bila $<0,05$. Snaga studije izračunata za parametar CAL nakon perioda od 6 meseci je veća od 90%.

Dobijeni rezultati su pokazali da na početku istraživanja nije bilo statistički značajne razlike između ispitivane (P) i kontrolne (C) grupe. Primena i-PRF koncentrata u toku SRP terapije dovodi do statistički značajnog poboljšanja kliničkih parametara ispitanika nakon svakog od definisanih intervala praćenja (1 mesec, 3meseca i 6 meseci). Ovo ukazuje na moguće dugoročne povoljne efekte na kliničko stanje parodontijuma pacijenata sa parodontitisom. Ukupna koncentracija ispitivanih parodontopatogena u GCF nakon sprovedene obe vrste terapije je statistički značajno manja nakon 1 i 3 meseca između posmatranih grupa. Međutim, nakon 6 meseci razlika se više ne uočava, najverovatnije zbog „split mouth” dizajna studije. Koncentracije TNF- α , MMP-8 i ALP u GCF posmatrane grupe uzoraka uz primenjen i-PRF su statistički značajno manje nakon svakog intervala praćenja. Linearnom regresionom analizom svih posmatranih parametara, kao faktor predikcije uočava se razlika u dubini sondiranja i vrednosti TNF- α nakon prvog meseca. Ovo potvrđuje efikasniji antiinflamatorni efekat terapije dodatkom i-PRF preparata. Zabeležena je i statistička značajnost indeksa krvarenja na provokaciju nakon 6 meseci. Analizom vrednosti paramtera CAL u linearnom regresionom modelu, kao faktor predikcije izdvaja se vrednost ovog parametra nakon mesec dana. Smanjenje ovog parametra u prvom mesecu u P grupi će rezultovati boljim terapijskim ishodom i kliničkim stanjem parodontijuma nakon 6 meseci.

Na osnovu ovog istraživanja može se zaključiti da primena i-PRF-a ima pozitivan efekat na šestomesečni ishod inicijalne terapije hroničnog parodontitisa. Međutim, neophodna su dalja istraživanja na većem broju ispitanika i u dužem vremenskom periodu da bi se pokazali efekti i-PRF-a.

Ključne reči: hronični parodontitis, kauzalna terapija, injektabilni fibrin bogat trombocitima

Naučna oblast: Stomatologija

Uža naučna oblast: Parodontologija

UDKbroj:

Abstract

Periodontitis is a chronic, inflammatory and destructive disease of all tooth-supporting tissues: gingiva, root cementum, periodontal ligament, and alveolar bone. The inflammation begins in the gingiva. Afterwards, as the disease progresses, it spreads to deeper periodontal tissues. As the consequence, the resorption of the alveolar bone occurs which can lead to tooth loss. Epidemiological data from all over the world indicate exceptional prevalence of gingivitis and periodontitis.

In addition to the elimination of the primary etiological factor - dental plaque and inflammation of the periodontium, the goal of the initial therapy (scaling and root planing-SRP) is to achieve partial or full regeneration of all lost periodontal tissues. In order to improve SRP therapy, adjunct therapeutic procedures can be included.

The regeneration of both soft and hard periodontal tissues is characterized by a complex interaction of numerous intracellular and extracellular signalling mechanisms. Platelets are known to have a significant effect on wound healing, as reservoirs of a large number of growth factors and other bioactive molecules.

The liquid form of platelet-rich fibrin, injectable platelet-rich fibrin – i-PRF, represents a revolutionary step in the therapeutic concept of active tissue regeneration. This autologous platelet concentrate is obtained by careful centrifugation of venous blood, without the addition of anticoagulants or other biochemically active substances. With the gradual release of bioactive molecules of platelet and leukocyte origin, trapped in the dense fibrin network of i-PRF, the regeneration process is initiated, such as DNA synthesis, pluripotent stem cell differentiation, cell proliferation and migration, polymorphonuclear leukocyte chemotaxis, along with the extracellular matrix synthesis and angiogenesis.

The aim of the study was to explore the effect of the application of i-PRF during SRP treatment on reducing tissue inflammation, concentration of inflammatory mediators and microorganisms in gingival crevicular fluid - GCF, and the success of regeneration itself. In patients with chronic periodontitis included in the study, the following clinical parameters were recorded: periodontal pocket depth- PPD, level of gingival margin - LGM, clinical attachment level - CAL, bleeding on probing – BOP, and plaque index - PI. The samples of GCF collected by paper strips (Periopaper, Amityville, NY, USA) were stored at -70 °C. Having added reverse specific primers and a universal forward primer for 16S rRNA, the concentrations of periodontopathogenic microorganisms, i.e. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A. a.), *Porphyromonas gingivalis* (P. g.), *Prevotella intermedia* (P. i.) and *Tannerella forsythia* (T. f.), were analysed by using polymerase chain reaction (PCR). Moreover, the total concentration of microorganisms was calculated by PCR-real time. The samples of GCF were also used to determine the levels of matrix metalloproteinase-8 (MMP-8), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and alkaline phosphatase (ALP). The analysis of their concentrations in GCF was performed by using appropriate commercial ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kits. Statistical Package for Social Science (SPSS software package, version 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for all

the data analyses. The differences between the observed groups were considered as significant when the p value was <0.05 . The study power calculated for the parameter CAL over the period of 6 months was above 90%.

The obtained results showed there were no statistically significant differences between the study (P) and the control (C) group at baseline. The application of PRF concentrates during SRP therapy led to statistically significant improvement in the clinical parameters after each defined follow-up (1 month, 3 months, and 6 months). Therefore, this could lead to long-term beneficial effects on periodontal clinical condition in patients with periodontitis. The total concentration of examined periodontopathogens in GCF after the implementation of both types of therapies was statistically less significant after 1 and 3 months when the results of the observed groups were compared. However, after 6 months the difference was not noticed, most probably due to "split mouth" design. The concentration of TNF- α , MMP-8 and ALP in GCF of the i-PRF group were statistically less after each follow-up. By linear regression analysis of all observed parameters, the difference in PPD and TNF- α values after the first month stood out as a prediction factor. Therefore, it confirmed more effective anti-inflammatory effect by adding i-PRF to SRP therapy. The statistical significance of BOP value after 6 months was also noted. By analysing the value of the CAL parameter in the linear regression model, the value after one month was singled out as a prediction factor. Reduction of this parameter in the first month in the P group would result in a better therapeutic outcome and clinical condition of the periodontium after 6 months.

Based on the research, it can be concluded that the use of i-PRF has a positive effect on a six-month outcome after the initial therapy of chronic periodontitis. However, further researches are needed on a larger number of respondents over a longer period of time to prove the efficacy of i-PRF.

Keywords: chronic periodontitis, nonsurgical therapy, injectable platelet rich fibrin

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. PREGLED LITERATURE.....	4
1.1.1. Istorijski osvrt.....	4
1.2. KLASIFIKACIJA PARODONTITISA.....	5
1.2.1. Tipovi parodontitisa.....	5
1.3. KLINIČKA SLIKA PARODONTITISA.....	8
1.4. EPIDEMIOLOGIJA PARODONTITISA.....	8
1.5. ETIOLOGIJA.....	9
1.5.1. Dentalni plak.....	10
1.5.3. Akcesorni etiološki faktori.....	11
1.5.3.1. Lokalni akcesorni etiološki faktori.....	11
1.5.3.2. Sistemski (opšti) akcesorni etiološki faktori.....	11
1.5.4. Faktori virulencije mikroorganizama dentalnog plaka.....	12
1.5.5. Faze razvoja dentalnog plaka.....	12
1.6. MIKROORGANIZMI DENTALNOG PLAKA.....	14
1.6.1. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (A. a.).....	16
1.6.2. <i>Porphyromonas gingivalis</i> (P. g.).....	17
1.6.3. <i>Prevotella intermedia</i> (P. i.).....	18
1.6.4. <i>Tannerella forsythia</i> (T. f.).....	19
1.7. MIKROORGANIZMI I STANJE PARODONCIJUMA.....	20
1.8. PATOGENEZA OBOLJENJA PARODONCIJUMA IZAZVANIH DENTALNIM PLAKOM.....	21
1.8.1. Klinička slika zdrave gingive.....	21
1.8.2. Gingivitis.....	22
1.8.3. Parodontitis.....	23
1.8.4. Progresija gingivitisa u parodontitis.....	25
1.8.4.1. Destrukcija ekstracelularnog matriksa.....	27
1.8.4.2. Destrukcija kosti.....	28
1.8.4.3. Destruktivne promene u periodontalnom ligamentu.....	29
1.8.4.4. Destrukcija cementa korena zuba.....	30
1.9. GINGIVALNA TEČNOST.....	30

1.9.1.	Faktor nekroze tumora- α (TNF- α).....	31
1.9.2.	Matriksne metaloproteinaze – MMP	31
1.9.3.	Alkalna fosfataza (ALP).....	33
1.10.	REZOLUCIJA INFLAMACIJE.....	33
1.11.	REGENERACIJA	34
1.12.	KONCENTRATI TROMBOCITA.....	38
1.12.1.	Fibrinski lepak (<i>fibrin glue</i>).....	39
1.12.3.	Fibrin bogat trombocitima (PRF)	42
1.12.4.	Injektabilni fibrin bogat trombocitima (i-PRF)	45
1.13.	INICIJALNA TERAPIJA.....	47
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	49
3.	METODOLOGIJA	51
3.1.	ETIČKI STANDARD	52
3.2.	SELEKCIJA PACIJENATA	52
3.3.	PARODONTALNI STATUS PACIJENTA.....	53
3.4.	TERAPIJSKI POSTUPAK.....	55
3.5.	PROTOKOL ZA PRIPREMU i-PRF-a.....	56
3.6.	UZORKOVANJE GINGIVALNE TEČNOSTI.....	57
3.7.	LABORATORIJSKI POSTUPCI.....	57
3.7.1.	Mikrobiološko ispitivanje.....	57
3.7.3.	Ispitivanje biokemijskih parametara.....	61
3.8.	RIZIK	64
3.9.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	65
4.	REZULTATI	67
4.1.	STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA	68
5.	DISKUSIJA	141
6.	ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA	158
7.	LITERATURA	160

1. UVOD

Parodontitisi su hronična, inflamatorna i destruktivna oboljenja svih potpornih tkiva zuba: gingive, cementa korena zuba, periodontalnog ligamenta i alveolarne kosti. Inflamacija započinje u gingivi, a potom se, kako bolest napreduje, širi u dublja parodontalna tkiva. Kao posledica javlja se resorpcija alveolarne kosti i formiranje koštanih defekata. Ukoliko se oboljenje ne prepozna i ne leči, može dovesti do gubitka zuba.

Epidemiološki podaci iz čitavog sveta ukazuju na izuzetnu rasprostranjenost oboljenja potpornog aparata zuba – gingivitisa i parodontitisa.

Pored eliminacije osnovnog etiološkog faktora, dentalnog plaka i inflamacije parodontijuma, cilj aktuelnih terapijskih postupaka je da se ostvari delimična ili potpuna regeneracija svih izgubljenih parodontalnih tkiva. Konvencionalna, inicijalna terapija parodontalnih oboljenja se sastoji od mehaničkog uklanjanja čvrstih i mekih naslaga (kamenca/konkrementa i biofilma) sa površina korena zuba uz konstantnu irigaciju patološki formiranih prostora. Međutim, ovakva terapija, mehanički debridman (engl. *scaling and root planing*-SRP) iako uspešna za veliki broj pacijenata, predstavlja veoma zahtevnu proceduru koja ima i ograničenja^{1, 2}. Krajnji rezultati nisu potpuno predvidivi zbog nemogućnosti adekvatnog pristupa dubokim i uskim parodontalnim džepovima, džepovima komplikovane strukture ili onima koji su lokalizovani u furkacijama korenova višekorenih zuba³.

Za regeneraciju parodontijuma neophodna je kompleksna interakcija između epitelnih ćelija, gingivalnih fibroblasta, ćelija periodontalnog ligamenta, cementoblasta i osteoblasta. Širok spektar intracelularnih i ekstracelularnih događaja i prisustvo različitih signalnih molekula posreduju u regulaciji regeneracije kako mekih, tako i čvrstih tkiva parodontijuma.

Odvijanje celokupnog procesa regeneracije je još uvek nedovoljno razjašnjeno, ali je svakako poznato da ključnu ulogu imaju trombociti⁴. Prekid kontinuiteta krvnih sudova na početku procesa zarastanja defekta dovodi do formiranja fibrinskog ugruška, adhezije i agregacije trombocita. Oni su odgovorni za otpuštanje faktora rasta i medijatora zapaljenja u okolno tkivo⁵. Trombociti takođe imaju sposobnost sekrecije glikoproteina ekstracelularnog matriksa, kao što su fibrin, fibronektin i vitronektin, koji se ponašaju kao matriks za vezivno tkivo i kao adhezivni molekuli za uspešniju ćelijsku migraciju⁶. Ovo je fokus savremenih istraživanja usmerilo ka sagledavanju uloge trombocita i mogućnosti njihove primene u terapijskim procedurama za ubrzanje regeneracije tkiva. Razvoj biološki aktivnih materijala koji se koriste u regulaciji inflamatornih procesa, kao i za ubrzanje procesa zarastanja tkiva jedan je od velikih izazova kliničkih istraživanja⁴.

U opštoj medicinskoj praksi različiti koncentracije trombocita su korišćeni za prevenciju i lečenje krvarenja usled trombocitopenija, kao posledica aplazije koštane srži, akutne leukemije ili značajnog gubitka krvi zbog prekida kontinuiteta krvnih sudova (povrede, hirurški zahvati...) ⁶. Trombociti izolovani iz periferne krvi deluju kao autologi izvor faktora rasta. Početkom 1970. godine je opisana jedna vrsta fibrinskog lepka, koji je formiran polimerizovanjem fibrinogena u prisustvu trombina i kalcijuma⁷. Ovakav fibrinski lepak bio je pripreman iz plazme nepoznatih donora i postojao je rizik od prenošenja različitih bolesti. Stabilnost i kvalitet ovog biomaterijala nije bio zadovoljavajući, zbog niske koncentracije fibrina u plazmi. Potreba za fibrinskim lepkom je pomogla razvoj proizvodnje koncentrata krvnih pločica za potrebe aktivne regeneracije tkiva. Od 1990. godine su izdvajane različite komponente krvi koje, kao sastavni deo prirodnog procesa zarastanja rana, imaju potencijal da ubrzaju reparaciju i regeneraciju tkiva nakon narušavanja njegovog integriteta.

Fibrin bogat trombocitima (engl. *platelet rich fibrin* – PRF) predstavlja revolucionarni korak u terapijskom konceptu aktivne regeneracije tkiva. Pažljivim centrifugiranjem autologe venske krvi dobija se PRF u vidu guste fibrinske mreže u kojoj su zarobljeni trombociti i leukociti^{8, 9, 10}, a koja ne zahteva dodavanje antikoagulantnog sredstva i drugih biohemijskih aktivnih suspcstanci^{11, 12}. PRF, koji je prvi opisao Choukroun 2000. godine, predstavlja drugu generaciju trombocitnih koncentrata - koja je nastala u cilju unapređenja prve generacije - plazme bogate trombocitima (engl. *platelet rich plasma* – PRP). Tečni oblik PRF-a je nazvan injektabilni fibrin bogat trombocitima (engl. *injectable platelet rich fibrin* – i-PRF)²³¹. Fibrinska mreža predstavlja matricu za migraciju fibroblasta i endotelnih ćelija u procesu angiogeneze. Autologi koncentraciji krvi predstavljaju bezbedan i jednostavan način aplikacije visoke koncentracije faktora rasta i drugih polipeptida, proteina i citokina, koji učestvuju u procesu zarastanja parodontalne rane^{13, 14}. Doan Erenfest (*Dohan Ehrenfest*) sa saradnicima^{15, 16, 17} je pokazao da je približno 97% trombocita i 50% leukocita iz originalne zapremine krvi koncentrovano u trodimenzionalnoj mreži PRF ugruška, tj. u srednjem od tri sloja koja se formiraju nakon centrifugiranja krvi.

Aktivacijom trombocita, kao odgovor na oštećenje tkiva, dolazi do spajanja α -granula sa ćelijskom membranom trombocita^{18, 19} i oslobađanja njihovih faktora rasta, polipeptida, glikoproteina i citokina^{20, 21}. U najvećoj meri se oslobađaju polipeptidni faktori rasta: TGF- β 1 (transformišući faktor rasta- β 1), PDGF (trombocitni faktor rasta), VEGF (vaskularni endotelni faktor rasta), EGF (epidermalni faktor rasta), ILGF- 1 (faktor rasta sličan insulinu-1); glikoproteini: endostatin i trombospondin-1. Faktori rasta vrše svoje funkcije preko vezivanja za specifične receptore na površini ćelije odakle se dalje kroz citoplazmu signal transdukuje do nukleusa²². Oni se postepeno otpuštaju u ranu tokom razgradnje fibrinske mreže, u trajanju od najmanje 7 dana²³, kako je pokazano *in vitro*. Aktivno učestvuju u procesima regeneracije tkiva, što uključuje sintezu DNK, sintezu matriksa, izraženu metaboličku aktivnost i dr. Takođe, utiču i na migraciju ćelija, hemotaksu polimorfonuklearnih leukocita, proliferaciju i diferencijaciju pluripotentnih matičnih ćelija i angiogenezu.

Najnovija istraživanja pokazuju da se upotrebom PRF-a znatno smanjuje reparacija parodonticijuma formiranjem dugačkog pripojnog epitela. Nasuprot tome, dolazi do regeneracije kako kosti i periodontalnog ligamenta, tako i cementa korena zuba^{24, 25}. Za ovo je odgovorna faza regeneracije tkiva u kojoj se regrutuju nediferencirane ćelije u fibrinskoj mreži i inicira njihova diferencijacija²⁶.

Gingivalna tečnost se decenijama ispituje kao biološki materijal koji bi mogao da posluži u monitoringu parodontalnih oboljenja. Pored primene kliničkih parametara, smatra se da se procena stanja parodonticijuma i efekata terapije može izvesti i na osnovu kvalitativnog i kvantitativnog dokazivanja parodontopatogenih mikroorganizama u gingivalnoj tečnosti, kao i na osnovu njenog biohemijskog sastava, odnosno prisustva određenih markera.

1.1. PREGLED LITERATURE

Parodontitis je hronično, inflamatorno i destruktivno oboljenje svih potpornih tkiva zuba: gingive, cementa korena zuba, periodontalnog ligamenta i alveolarne kosti. Inflamacija započinje u gingivi, a potom se, kako bolest napreduje, širi u dublja parodontalna tkiva, što dovodi do postepene resorpcije alveolarne kosti i formiranja koštanih defekata. Ukoliko se oboljenje ne prepozna i ne leči, može dovesti do gubitka zuba, a time i do poremećaja funkcije žvačnih mišića, fonetskih, estetskih i socijalnih poremećaja, kao i poremećaja opšteg zdravstvenog stanja ²⁷.

Epidemiološka istraživanja ukazuju na izuzetnu rasprostranjenost oboljenja potpornog aparata zuba – gingivitisa i parodontitisa. Parodontitis predstavlja najčešće oboljenje parodontcijuma, a zauzima šesto mesto po učestalosti svih bolesti na globalnom nivou. Ovo oboljenje je registrovano kod skoro 800 miliona ljudi do 2016. godine ²⁸, zbog čega predstavlja značajan medicinski problem ²⁹.

Procesi koji se odvijaju u parodontcijumu u početku su isključivo lokalizovani u epitelu i subepitelnom delu tkiva gingive. Prouzrokovani osnovnim etiološkim faktorom – dentalnim plakom – odlikuju se razvojem akutnog zapaljenja. Progresija ovog procesa se klinički manifestuje pojavom gingivitisa. Ukoliko su u toku imunog odgovora domaćina pretežno zastupljeni regenerativni procesi, akutno zapaljenje se može zameniti rezolucijom tkiva u potpunosti. Međutim, perzistiranje ovog zapaljenja tokom dužeg vremena dovodi do pojave hroničnih destruktivnih i reparatornih promena u parodontalnom tkivu ireverzibilnog karaktera.

1.1.1. Istorijski osvrt

Klinički znaci i simptomi parodontalnih oboljenja bili su prepoznati još u davnim vremenim o čemu govore zapisi Egipćana i Kineza od pre 5000 godina ³⁰. Nova pisana saznanja se ponovo pojavljuju tek u 18. veku, a zatim dolazi i do njihovog razvoja jedan vek kasnije sa unapređivanjem novih tehnoloških dostignuća, radiologije, mikrobiologije i histoloških tehnika ispitivanja. Analizom uzroka atrofije i degeneracije parodontcijuma, uticaja okluzalne traume i infektivnog agensa ³¹, zaključeno je da primarni etiološki faktor za nastanak parodontalne bolesti predstavljaju specifične vrste mikroorganizama i njihove zajednice, koje se formiraju u dentalnom plaku ³². „Hronični parodontitis” se navodi kao najčešća parodontalna bolest odraslih već 1960-ih godina ³². Takođe, primećeno je da gingivitis prethodi parodontitisu kao početna lezija, ali da se patogeneza svakog gingivitisa ne mora završiti parodontitisom, već je moguć i oporavak tkiva. Postavljena je hipoteza „oralnog plaka” kao osnovnog etiološkog faktora čijim se efikasnim uklanjanjem kontroliše tok bolesti ³³.

Posle gotovo dve decenije od poslednje Klasifikacije parodontalnih oboljenja i stanja iz 1999. godine, odbori Američke akademije za parodontologiju (AAP) i Evropske federacije za parodontologiju (EFP) sastali su se u novembru 2017. godine kako bi unapredili pomenutu

klasifikaciju. Objavljen je Zbornik radova Svetske radionice za Klasifikaciju parodontalnih i periimplantatnih oboljenja i stanja, koji se sastoji od 19 preglednih radova i 4 konsenzus izveštaja.

1.2. KLASIFIKACIJA PARODONTITISA

U poslednjih 30 godina klasifikacija parodontitisa je u više navrata modifikovana u pokušaju da se uskladi sa novim naučnim dostignućima.

Klasifikacija iz 1989. godine se zasnivala na činjenicama da parodontitis karakteriše nekoliko različitih kliničkih formi, životno doba u kome nastaje i stepen njegove progresije³⁴. Na osnovu ovih varijabli parodontitis je tada kategorizovan kao prepubertetski, juvenilni (lokalizovani i generalizovani), parodontitis odraslih i brzonapredujući.

Na evropskoj konferenciji koja je održana 1993. godine utvrđeno je da klasifikaciju treba pojednostaviti i predloženo je grupisanje parodontitisa u dva glavna oblika: parodontitis odraslih i rani parodontitis³⁵.

Glavne promene su nastale u klasifikaciji parodontitisa iz 1999. godine, koja je bila u upotrebi poslednjih 19 godina^{36, 37}. Parodontitis je reklasifikovan i podeljen na hronični, agresivni (lokalizovan i generalizovan), nekrotizirajući i kao manifestacija sistemskih bolesti.

Nova saznanja do kojih su dovela biološka i klinička istraživanja mehanizama u osnovi parodontopatije, ukazala su na potrebu da se osavremeni postojeća klasifikacija oboljenja parodonticijuma.

Učesnici Konferencije koja je održana 2017. godine u Čikagu složili su se da je ovo oboljenje moguće podeliti u tri oblika³⁸. Za razliku od ranijih klasifikacija, 2017. godine se prvi put definiše kliničko zdravlje i pravi razlika između intaktnog, zdravog parodonticijuma i redukovano parodonticijuma nakon lečenja.

1.2.1. Tipovi parodontitisa

Parodontitisi su podeljeni prema etiologiji i toku oboljenja na:

- 1) Parodontitis - oboljenje parodonticijuma, hroničnog, cikličnog toka sa periodima egzacerbacije i periodima remisije. Sam tok oboljenja kod pojedinih pacijenata može biti progresivniji.

2) Nekrotizirajuća parodontalna oboljenja

Nekrotizirajuća parodontalna oboljenja su prema klasifikaciji iz 1999. godine obuhvatala nekrotizirajući ulcerozni gingivitis (NUG) i nekrotizirajući ulcerozni parodontitis (NUP)³³. Međutim, brojne studije su tokom godina pokazale da NUG i NUP mogu predstavljati različite oblike jedne iste bolesti, jer imaju sličnu (istu) etiologiju, kliničke karakteristike i terapijski postupak, a moguće je i napredovanje ovih oboljenja i do težih formi, kao što su nekrotizirajući stomatitis (NS) i noma³⁹. Termin „ulcerozni” je eliminisan, jer se ulceracija smatra sekundarnom eflorescencom u odnosu na nekrozu⁴⁰.

Nekrotizirajući parodontitis je upalni proces parodontijuma koji se karakteriše prisustvom nekroze/ulceracije interdentalne papile, gingivalnim krvarenjem, zadahom iz usta, bolom i brzim gubitkom kosti, koji mogu biti praćeni formiranjem pseudomembrana, pojavom limfadenopatije i groznice⁴¹.

3) Parodontitisi udruženi sa sistemskim oboljenjima

Parodontitis udružen sa sistemskim oboljenjima predstavlja inflamatorni proces u parodontijumu koji dovodi do gubitka potpornog aparata zuba i alveolarne kosti pod uticajem različitih sistemskih poremećaja.

Ovoj klasifikaciji je moguće dalje pridodati različite odlike parodontitisa i ocenjivati ga i posmatrati u više dimenzija. U skladu sa tim je oformljen sistem stadijuma i stepena parodontitisa, koji se prvenstveno zasniva na promeni nivoa pripojnog epitela i stepena destrukcije kosti. Na ovaj način se parodontitis klasifikuje u **4 stadijuma** oboljenja na osnovu njegove težine i oštećenja parodontijuma (I, II, III ili IV) i **3 stepena** na osnovu same podložnosti oboljenju, progresije oboljenja i očekivanog odgovora na terapiju (A, B ili C).

Stadijumi parodontitisa se razlikuju prema stepenu oštećenja parodontijuma koji se procenjuje na osnovu najveće vrednosti nivoa pripojnog epitela (NPE) u interdentalnom prostoru, stepena i procenta radiografskog gubitka alveolarne kosti, obima infrakoštanih defekata i postojanja furkacionih defekata, stepena labavljenja zuba, kao i broja izgubljenih zuba.

Stadijumi parodontitisa:

- I – Inicijalni (početni) parodontitis
- II – Umereni parodontitis
- III – Uznapredovali parodontitis koji nosi rizik od gubitka jednog ili više zuba
- IV – Uznapredovali parodontitis koji nosi rizik od gubitka svih zuba.

U svim stadijumima može se definisati kao dodatni kriterijum i forma parodontitisa u zavisnosti od procentualne zahvaćenosti zuba:

- a) lokalizovana forma ($\leq 30\%$ zuba)
- b) generalizovana forma ($\geq 30\%$ zuba)
- c) incizivi-molari forma.

Stepen progresije parodontitisa se procenjuje na osnovu istorije bolesti, opšteg zdravstvenog stanja pacijenta i drugih faktora koji utiču na homeostazu parodoncijuma (pušenje ili nivo metaboličke kontrole kod dijabetesa), a na osnovu već određenih kliničkih i radiografskih parametara. Takođe, on određuje i predviđeni odgovor na terapiju, na osnovu individualizovanog profila i genetska predispozicije, a označava i stepen rizika od negativnog uticaja ovog oboljenja, kao i njegovog lečenja na opšte zdravlje pacijenta.

Stepen progresije parodontitisa:

A – spora progresija

B – umerena progresija

C – brza progresija.

Tabela 1. Klasifikacija parodontitisa prema stadijumu i stepenu oboljenja
(preuzeto iz rada autora Tonetti MS i sar. ⁴² i prevedono)

Razvijenost oboljenja i kompleksnost terapije				
Dokazi o riziku brzog napredovanja oboljenja, predviđeni odgovor na lečenje i uticaj na sistemsko zdravlje	Stadijum I: Inicijalni parodontitis	Stadijum II: Umereni parodontitis	Stadijum III: Uznapredovali parodontitis koji nosi rizik od gubitka jednog ili više zuba	Stadijum IV: Uznapredovali parodontitis koji nosi rizik od gubitka svih zuba
Stepen A	Individualni raspored stadijum i stepena			
Stepen B				
Stepen C				

1.3. KLINIČKA SLIKA PARODONTITISA

Sa aspekta kliničkih parametara, dijagnoza parodontitisa se postavlja ukoliko postoji:

1. merljiva vrednost nivoa pripojnog epitela u interdentalnoj regiji kod 2 ili više zuba koji nisu susedni;
2. merljiva vrednost nivoa pripojnog epitela sa bukalne/oralne strane i dubinom sondiranja ≥ 3 mm koja se može detektovati kod 2 ili više zuba, ali samo ukoliko se posmatrani nivo pripojnog epitela ne može dovesti u vezu sa:
 - a. recesijom gingive traumatskog porekla;
 - b. zubnim karijesom lokalizovanim u cervikalnom delu krunice zuba i najkoronarnijem delu korena zuba;
 - c. postojanjem merljive vrednosti nivoa pripojnog epitela na distalnoj površini drugog molara kod malpozicije trećeg molara ili nakon njegove ekstrakcije;
 - d. endodontskom lezijom koja se nalazi u regiji gledno-cementne granice;
 - e. pojavom vertikalne frakture korena.

1.4. EPIDEMIOLOGIJA PARODONTITISA

Oboljenja parodontitisa, gingivitisa i parodontitisa, svrstavaju se u najrasprostranjenije bolesti čovečanstva⁴³.

Prevalencija parodontalnih oboljenja je porasla za 57,3% od 1990. do 2010. godine^{44, 45, 46}. Teži oblik parodontitisa (koga karakterišu dubine sondiranja ≥ 6 mm) je šesta najčešća bolest u svetu. Prema istraživanju iz 2016. godine parodontitis je dijagnostikovao kod skoro 800 miliona ljudi ili 11,2 % populacije starosti od 15 do 99 godina²⁸. Ukupna prevalencija parodontitisa se povećava s godinama i učestalost raste kod odraslih u starosnoj dobi od 30 i 40 godina. Češći je kod muškaraca, osoba starijih od 40 godina i kod pripadnika crne rase u odnosu na belu rasu. Učestalost parodontitisa će nastaviti da raste kako se povećava brojnost starije populacije, ali i zbog porasta broja zuba koji perzistiraju u vilici tokom života^{28, 46, 47}.

Parodontitis nesrazmerno više pogađa ugrožene delove svetske populacije i odraz je socijalne nejednakosti⁴⁷. U zemljama u razvoju je zabeležena veća učestalost prisustva kamenca i krvarenja na provokaciju kod adolescenata (od 35% do 70%), u odnosu na njihove vršnjake iz razvijenih zemalja, gde je zabeležena učestalost između 4% i 34 %. Slično tome, u 14 – 47% odrasle populacije u razvijenim zemljama su mogli da se pronađu depoziti kamenca u poređenju sa 36 – 63% odraslih u zemljama u razvoju.

Teži oblici parodontitisa se mogu uočiti kod čak 538 miliona pojedinaca, dok se potpuni gubitak zuba detektuje kod 276 miliona pregledanih pacijenata širom sveta²⁸.

1.5. ETIOLOGIJA

Parodontitis je hronična inflamatorna bolest parodonticijuma i njegovu uznapredovalu formu karakterišu značajan gubitak parodontalnog ligamenta i destrukcija okolne alveolarne kosti. Parodontitis predstavlja jedan od dva glavna uzroka gubitka zuba⁴⁸. Različitim laboratorijskim tehnikama⁴⁹ identifikovano je oko 800 vrsta mikroorganizama koje naseljavaju usnu duplju i učestvuju u jedinstvenoj kompleksnoj interakciji sa tkivom domaćina⁵⁰. Ovi mikroorganizmi su uglavnom komensali, koji žive u jednom specifičnom obliku simbioze i imaju određeni uzajamni stepen tolerancije sa tkivom domaćina⁵¹. Međutim, promena mikrobioma, odnosno sastava i koncentracije bakterija koje u dužem vremenskom periodu naseljavaju jednu regiju može dovesti do pojave i razvoja oboljenja⁵².

Smatra se da je oko 750 različitih vrsta bakterija zastupljeno u subgingivalnom dentalnom plaku. Oko 20 vrsta najpotentnijih mikroorganizama se izdavaju kao parodontopatogeni⁵³.

Istraživači su 1996. godine postigli konsenzus da su, uprkos polimikrobnoj teoriji nastanka infekcije u parodonticijumu, ipak samo određeni mikroorganizmi dokazani parodontopatogeni: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* i *Tannerella forsythia* (ranije *Bacteroides forsythus*), a da su drugi potencijalni (*P. intermedia* / *nigrescens*, *T. denticola*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *F. nucleatum*, *P. micros*, *S. intermedium*)⁵⁴. Prema mišljenju Sokranskog (*Socransky*) i saradnika mikroorganizam koji se svrstava u parodontopatogene mora posedovati određene osobine: udruženost sa parodontitisom, karakteristiku povećanja koncentracije u toku nastanka oboljenja, posedovanje jasno definisanih faktora virulencije koji potencijalno mogu dovesti do razvoja oboljenja, evidentan dokaz reakcije domaćina na njegove antigene^{55, 56}, kao i sposobnost da izazove bolest na animalnom modelu⁵⁷.

Mada prisustvo mikroorganizama u nastanku i razvoju parodontitisa ima ključnu ulogu, stepen oštećenja parodontalnih tkiva je posledica uzajamnog dejstva mikrobiološkog faktora i odbrambenog sistema domaćina⁵⁸. Prisustvo parodontopatogena je potreban, ali ne i dovoljan faktor za razvoj oboljenja. Činjenica je da u većini slučajeva za pojavu bolesti uglavnom nije dovoljna samo bakterijska kolonizacija tj. njihovo prisustvo na/u tkivu parodonticijuma. Neophodna je infekcija ovog tkiva, koja se karakteriše uspešnim opstankom i razmnožavanjem mikroorganizama. Međutim, ni infekcija ne mora uvek da vodi ka oboljenju, već se može razviti i latencija. Ipak, u nekim situacijama kao što su oportunističke infekcije npr., sama kolonizacija može da izazove oboljenje.

Parodontitis je bolest jasnih karakteristika, specifičnih za svaki pojedinačni parodontalni džep i blisko povezana sa mikrobiomom datog džepa. Svaka strana zuba se odlikuje jedinstvenim mikrobiomom u subgingivalnoj regiji i sledstvenom nezavisnom kliničkom slikom. Mikrobiom uveliko odražava promene u parodonticijumu i pre pojave klinički vidljivih znakova bolesti (kliničke manifestacije). Stoga praćenje promena mikrobioma može značajno da doprinese dijagnostici i prognozi bolesti⁵⁹. Longitudinalna ispitivanja mikrobioma svake strane zuba tokom razvoja bolesti su esencijalna za razumevanje uloge mikroorganizama u njenoj patogenezi.

1.5.1. Dentalni plak

U osnovi pojave i razvoja inflamatornih oboljenja parodontijuma – gingivitisa i parodontitisa – je dentalni plak. Dentalni plak predstavlja organsku, meku, bezbojnu, ponekad opalescentnu naslagu, kompleksne strukture, funkcionalno organizovanu na površini zuba, ali i na površinama mekih tkiva i drugih struktura koje se mogu naći u usnoj duplji³². Složena zajednica mikroorganizama čini 80% dentalnog plaka, dok 20% čine organske i neorganske materije. Mikroorganizmi dentalnog plaka svojim brojnim faktorima virulencije su odgovorni za nastanak i razvoj imunog odgovora domaćina i formiranje specifičnog mikrokruženja. Sastav biofilma rezultat je dinamičnih procesa između mikroorganizama i njihovog mikrokruženja⁶⁰.

1.5.2. Teorije dejstva dentalnog plaka

Nakon otkrića glavnog etiološkog faktora gingivitisa i parodontitisa još u 19. veku postavljena je „nespecifična teorija” dejstva mikroorganizama dentalnog plaka. Ona je bila zastupljena uz neke modifikacije do druge polovine 20. veka. Nespecifična teorija je zastupala stav o nespecifičnom udruženom dejstvu mikroorganizama i njihovom podjednakom doprinosu virulenciji dentalnog plaka usled slabljenja mehanizama odbrane i/ili izazivanja upale u tkivu domaćina⁶¹.

Ovu teoriju zamenila je „specifična teorija”. Specifična teorija se zasniva na činjenicama da specifične vrste mikroorganizama dentalnog plaka mogu da se odlikuju većom virulentnošću od drugih i da se sastav plaka menja u zavisnosti od toga da li je parodontijum zdrav ili oboleo⁶².

Prema „Ekološkoj hipotezi”, pojava *disbioze*, tj. dominacije agresivnih parodontopatogena gram-negativnih anaeroba u odnosu na gram-pozitivne aerobe može dovesti do pojave parodontitisa⁶³.

Savremena „Hipoteza ključnog patogena” pokazuje da određeni mikrobiološki patogeni prisutni u manjem broju mogu izazvati inflamatorne bolesti promenom sastava mikrobioma⁶⁴. Tako, skorašnja istraživanja pokazuju da parodontalna bolest nije udružena sa kompleksnom alteracijom celokupne zajednice mikroorganizama – mikrobioma, nego sa dominacijom jednog ili nekoliko patogena. Na primer, pokazano je da *Porphyromonas gingivalis* ima modulatorni efekat na urođeni imunološki sistem domaćina i značajno podstiče razvoj inflamacije u parodontijumu^{65,66}.

Poznato je da parodontitis ima cikličan karakter i da se periodi smirivanja (remisije) i aktivacije (egzacerbacije) inflamatornih procesa u parodontijumu smenjuju tokom perzistiranja oboljenja. Utvrđeno je da u periodima egzacerbacije dolazi do značajnog povećanja koncentracije gram-negativnih bakterija u odnosu na povećanje gram-pozitivnih bakterija u periodima remisije.

1.5.3. Akcesorni etiološki faktori

Prisustvo pojedinih parodontopatogenih mikroorganizama u većoj koncentraciji neće kod svakog pojedinca izazvati pojavu oboljenja. Zbog toga je izveden zaključak da postoje i drugi faktori koji utiču na mogućnost pojave i stepen progresije ovog oboljenja. Akcesorni etiološki faktori olakšavaju nakupljanje dentalnog plaka ili potenciraju štetno dejstvo njegovih produkata⁶⁷.

1.5.3.1. Lokalni akcesorni etiološki faktori

- a. parodontalni džepovi,
- b. anatomija korena zuba (poput kratkog korenskog stabla, cervikalne gleđne perle⁶⁸),
- c. druge naslage na zubima,
- d. položaj zuba i teskoba,
- e. jatrogeni faktori (restaurativni radovi),
- f. traumatska okluzija,
- g. impakcija hrane,
- h. loše navike,
- i. morfološka i anatomska odstupanja mekog / koštanog tkiva,
- j. ostali lokalni faktori.

1.5.3.2. Sistemska (opšti) akcesorni etiološki faktori

To su faktori koji utiču promenom otpornosti parodonticijuma prema dejstvu mikroorganizama dentalnog plaka. U opšte akcesorne faktore ubrajaju se:

- a) imunološki poremećaji,
- b) genetski faktori,
- c) endokrinološki faktori (hiperglikemija, steroidni hormoni, pubertet, menstrualni ciklus, trudnoća, oralni kontraceptivi),
- d) nutritivni faktori,
- e) krvne bolesti,
- f) drugi opšti faktori (stres, pušenje, droga, lekovi)^{66, 67}.

Sinergizam uticaja lokalnih i sistemskih faktora usloviće formiranje individualnog, biološkog fenotipa oboljenja, specifičnog za svakog pojedinca.

1.5.4. Faktori virulencije mikroorganizama dentalnog plaka

Dentalni plak utiče na nastanak i razvoj patoloških promena u parodontijumu preko sledećih mehanizama: invazijom mikroorganizama, delovanjem egzotoksina, endotoksina i enzima, kao i suzbijanjem imunog odgovora⁶⁷. Karakteristično za parodontopatogene subgingivalne regije je sposobnost invazije epitela džepa, sinteza i otpuštanje različitih proteolitičkih enzima, oslobađanje lipopolisaharida (LPS) iz membrana i suzbijanje hemotakse i fagocitoze domaćina⁶⁹.

Formiranje dentalnog plaka se odvija tačno definisanim redosledom međusobno povezanih procesa na površini za koju je vezana zubna pelikula. Međutim, iako postoje opšti principi nastanka dentalnog plaka, njegov mikrobiološki sastav je jedinstven i karakterističan za svakog pojedinca.

Po svom sastavu kod svakog pojedinca se takođe razlikuje dentalni plak koji sazreva na površini zuba iznad nivoa ivice gingive i dentalni plak koji se nalazi ispod nivoa ivice gingive i perzistira osim na površini zuba i u samom gingivalnom sulkusu, gingivalnom ili parodontalnom džepu (slobodni dentalni plak) i na površini epitela gingive. Supragingivalni dentalni plak karakterišu mikroorganizmi poreklom iz usne duplje koji su uglavnom gram pozitivni aerobi, dok subgingivalni dentalni plak većinom naseljavaju gram negativni, fakultativno ili striktno anaerobni mikroorganizmi, koji su uglavnom visoko pokretni. Mikroorganizmi subgingivalnog dentalnog plaka mogu da prodru u pripojni epitel⁷⁰.

Pojedini faktori virulencije ispoljavaju svoje dejstvo u različitim fazama razvoja i sazrevanja dentalnog plaka.

1.5.5. Faze razvoja dentalnog plaka

Prva faza u nastajanju dentalnog plaka je formiranje zubne pelikule. Pelikula je u najvećoj meri sastavljena od glikoproteina (mucina) i lipida poreklom iz pljuvačke. Ona ima zaštitnu ulogu u toku mastikacije, ali isto tako predstavlja i povoljno mesto za adherenciju bakterija, menjajući naelektrisanje površine gleđi.

U drugoj fazi sazrevanja dentalnog plaka dolazi do kolonizacije sekundarne zubne pelikule, nekoliko sati po njenom formiranju na površini zuba, posredstvom specifičnih molekula adhezina. Primetni postaju gram-pozitivni mikroorganizmi (koke, bacili i filamenta), kao što je *Actinomyces viscosus* i *Streptococcus sanguis*. Nakon adhezije, u povoljnim uslovima, dolazi do daljeg rasta i razmnožavanja ovih mikroorganizama. Zapremina dentalnog plaka se uvećava, broj adheriranih bakterija raste, metabolišu se mnogi produkti, a sredina dentalnog plaka postaje sve siromašnija kiseonikom.

Treća faza predstavlja sekundarnu kolonizaciju mikroorganizmima i sazrevanje plaka. Započinje nakon 48 sati i traje 2 – 3 dana. U toku ove faze usled rasta i razvoja plaka, dolazi do dominacije gram negativnih anaerobnih vrsta. Najznačajniju ulogu imaju: *P. i.*, *Prevotella loescheii*, *Capnocytophaga species*, *Fusobacterium nucleatum*, *P. g.*, *T. f.* (*Bacteroides fusiformis*)⁵³. Posebno je proučavana i dokazana koagregacija u početku između gram-pozitivnih i gram-negativnih mikroorganizama, a kasnije samo između gram-negativnih mikroorganizama⁷⁰. Mnoge vrste bakterija imaju na površini ćelije različite strukture, faktore virulencije, kao što su fimbrije ili fibrile, kojima se pričvršćuju za određene površine zubnog tkiva, naslaga ili površine drugih mikroorganizama⁷¹. Fimbrije su dugi filamenti sastavljeni od proteina, koji se sa površine bakterijske ćelije pružaju pojedinačno ili u snopovima. Smatra se da su za ove bakterije fimbrije važne u procesu kolonizacije, jer mutirani oblici koji poseduju manji broj fimbrija pokazuju smanjenu sposobnost vezivanja i invazije epitelih ćelija i fibroblasta. Povezanost bakterija unutar dentalnog plaka je visoko organizovana. Određene vrste su adhezijom i koagregacijom povezane za druge vrste, što ovu vezu čini još kompleksnijom⁷². Međusobna komunikacija bakterijskih ćelija je moguća preko signalnih molekula, ali isto tako i intracelularnih adhezijskih molekula epitelih ćelija, molekula vaskularne adhezije ćelija, E-selektina i P-selektina. Krajnji efekat ove reakcije dovodi do hemotakse i aktivacije leukocita na mestu upale. *P. g.* „0- fimbrie” takođe stimulišu produkciju faktora nekroze tumora- α (TNF- α), interleukina-1 α (IL-1 α), interleukina-1 β (IL-1 β) i faktora koji stimuliše rast kolonija granulocita/makrofaga, što sve zajedno može dovesti do resorpcije kosti⁷¹.

Četvrta faza započinje četvrtog dana i traje sedam do deset dana. Karakteriše je pojava pokretnih fuziformnih bacila i spiroheta³².

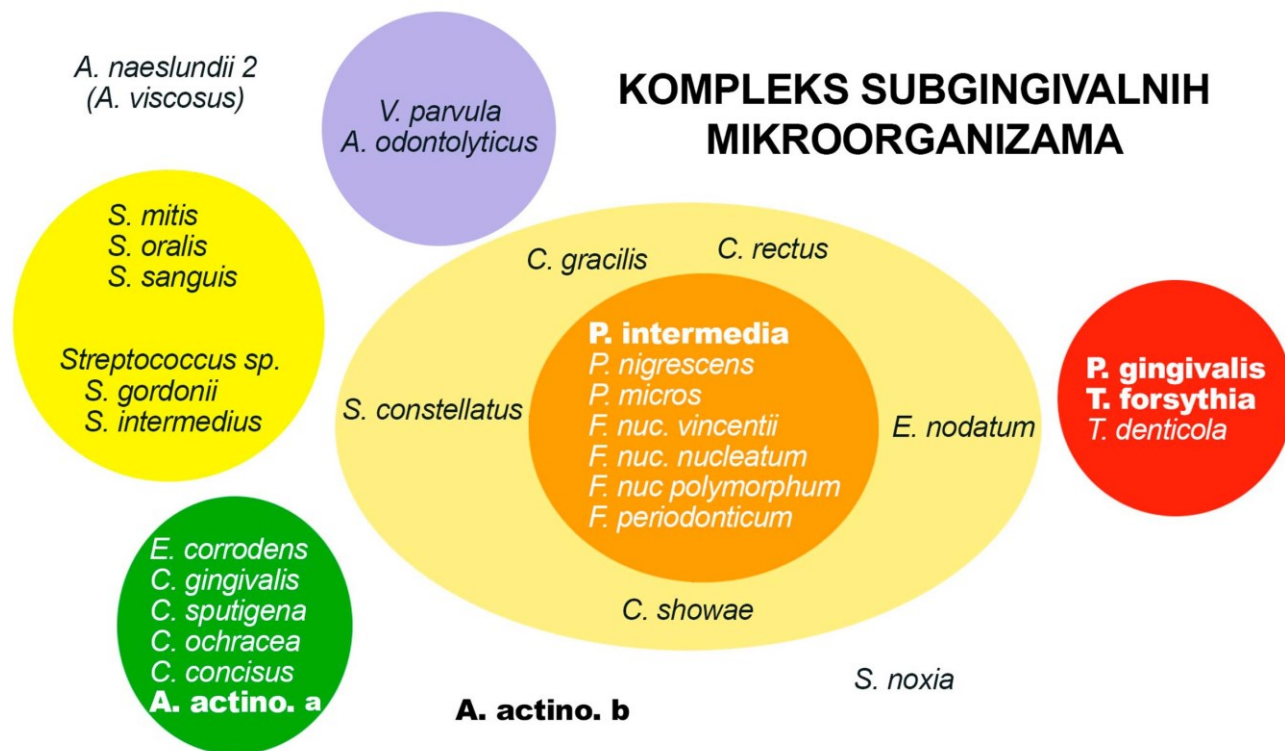
1.6. MIKROORGANIZMI DENTALNOG PLAKA

Studija Sokranskog (*Socransky*) i saradnika dokazala je udruženost parodontalne bolesti sa specifičnim bakterijskim vrstama kao što su *P. g.*, *Treponema denticola* i *T. f.*, koje su klasifikovane kao crveni kompleks bakterija, ali i sa bakterijama narandžastog kompleksa⁵⁷. Potvrđeno je prisustvo šest blisko povezanih grupa bakterijskih vrsta:

1. *Actinomyces*, koji se sastoji od *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* 1 i *Actinomyces naeslundii* 2;
2. žuti kompleks koji se sastoji od članova roda *Streptococcus*;
3. zeleni kompleks koji se sastoji od *Capnocytophaga* vrsta, *Actinomycetem-comitans serotipa A*, *Eikenella corrodens* i *Campylobacter concisus*;
4. ljubičasti kompleks koji se sastoji od *Veillonella parvule* i *Actinomyces odontolyticus*;
5. narandžasti kompleks koji se sastoji od *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* i *Streptococcus constelatus*, *Campylobactergracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobactershowae*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum* subvrste, *Fusobacterium periodonticum*, *Peptostreptococcus micros*;
6. crveni kompleks koji se sastoji od *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* i *Treponema denticola*⁵⁷.

Posebnoj grupi parodontopatogenih bakterija pripada *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Studije novijeg datuma su proučavale 16S rRNK koja obezbeđuje sveobuhvatniji prikaz zajednice mikroorganizama u subgingivalnoj regiji u stanju zdravlja ili bolesti. Takođe su pokazale da postoji tačno određena razlika u taksonomskoj kompoziciji bakterija zdravih i obolelih delova parodontijuma

⁷³ ⁷⁴
, .



Slika 1.1. Kompleksi subgingivalnih mikroorganizama subgingivalnog dentalnog plaka

(preuzeto iz rada Socransky i sar.⁵⁷ i modifikivano)

1.6.1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (*A. a.*) je gram-negativan, fakultativno anaeroban, nepokretan, kapnofilni štapić koji stvara male konveksne kolonije na pločici od krvnog agara sa središtem u obliku zvezde. Ovo je prva vrsta koja je svrstana u parodontopatogene bakterije zbog njenog prisustva u većoj koncentraciji u lezijama lokalizovane (juvenilne) parodontopatije⁷⁵ u poređenju sa zdravim parodontijumom ili gingivitisom. U toku lečenja parodontitisa dolazi do smanjenja koncentracije ove bakterije ili dolazi čak i do njene eliminacije⁷⁶. *A. a.* je nekada pripadala rodu *Actinobacillus*, da bi promenila ime više puta, dok nije 2006. godine svrstana u rod *Aggregatibacter*, koji pripada familiji *Pasteurellaceae*⁷⁷.

A. a. poseduje veći broj faktora virulencije uključujući i leukotoksin⁷⁸, bakteriocine, inhibišući faktor hemotakse, citotoksični faktor, citoletalni toksin istežanja, Fc vezujući protein, fibroblast inhibični faktor, antibiotik rezistentne determinante i faktor inhibicije funkcije polimorfonuklearnih leukocita⁷⁹.

Lipopolisaharid gram-negativnih bakterija u patogenezi parodontitisa zauzima posebno mesto. Lipopolisaharid u malim koncentracijama ima svojstvo aktiviranja uspavanog imunog sistema⁸⁰, a posebno T i B limfocita kod osoba obolelih od agresivnog parodontitisa. Lipopolisaharid utiče na pojačanu produkciju antitela od strane B limfocita na *A. a.* Ova antitela učestvuju u procesu opsonizacije i na taj način pospešuju fagocitozu i degranulaciju neutrofila, istovremeno podstičući i koštanu resorpciju. Lipopolisaharid *A. a.* ima sposobnost da stimuliše makrofage na oslobađanje interleukina (IL-1 α , IL-1 β) i faktora nekroze tumora- α (TNF- α)⁸¹.

Pokazano je *in vitro* da je *A. a.* sposoban da napadne ćelije gingive, a *in vivo* da naseli vaskularne endotelne ćelije⁸² i epitelne ćelije sluzokože obraza⁸³. *A. a.* se primarno nalazi na epitelnim ćelijama sluzokože usne duplje, za koje se vezuje preko adhezina, specifičnog proteina, a kasnije se za površinu zuba vezuje preko fimbrija. Izolovan je iz pljuvačke, supra i subgingivalnog dentalnog plaka, i sa sluzokože gotovo svih regija usne duplje: tonzila, tvrdog nepca, gingive, jezika i bukalne sluzokože⁸⁴.

U prisustvu *A. a.* gingivalni fibroblasti bivaju pokrenuti da sintetišu proinflamatorni citokin – interleukin-6 (IL-6) i hemokin – interleukin-8 (IL-8), dok mononukleari proizvode hemokine MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein*) i RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*)⁸⁵.

Citotoksičan efekat ovog parodontopatogena ostvaruje se preko produkcije leukotoksina, glavnog faktora virulencije ovog mikroorganizma. Pokretni oblici ga sadrže u svojoj membrani, dok ga oni adherentni mogu izlučivati preko vezikula.

Leukotoksin ima sposobnost da se vezuje preko β 2-integrin receptora LFA-1 (engl. *leukocyte function-associated antigen-1*) za hematopoezne ćelije limfoidne ili mijeloidne loze i da izazove lizu ovih ćelija ili njihovu apoptozu. Niže koncentracije leukotoksina u *in vitro* uslovima izazivaju degranulaciju neutrofila, intenzivno oslobađanje matriksne metaloproteinaze-8 (MMP-8) i inhibiciju fagocitoze od strane neutrofila. Više koncentracije dovode do apoptoze leukocita⁸⁶.

A. a. ulazi u sastav i normalne flore kod mnogih zdravih osoba. Genetička različitost između serotipova *A. a.* je velika (šest serotipova, obeleženih slovima od *a* do *f*), kao i njihova osobina da stvaraju i otpuštaju različite faktore virulencije⁸⁷.

U nedavnim istraživanjima je pokazano da samo neki sojevi *A. a.* mogu da budu odgovorni za lokalizovanu agresivnu parodontopatiju (JP2 klon). *A. a.* se može vezivati i za druge bakterije koagregacijom (Kolenbrander et al. 2000). Iz supragingivalnog dentalnog plaka bakterije lako stižu u subgingivalni dentalni plak, a odatle *A. a.* lako prodire u ćelije sulkusnog i pripojnog epitela i može se naći i u dubljim slojevima gingive i intimi krvnih sudova⁸³, a kultivisan je i iz ateromatoznog plaka većih krvnih sudova⁸⁸.

1.6.2. *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*)

Porphyromonas gingivalis (*P. g.*) predstavlja jedan od ključnih parodontopatogena, koji je usko povezan sa razvojem parodontitisa, ali i sa progresijom nekih sistemskih oboljenja^{89, 90}. *P. g.* je anaerobni, gram-negativni mikroorganizam, oblika koka. *P. g.* pripada crno pigmentisanim bakterijama iz grupe *Bacteroides-a*, koje na pločicama krvnog agara stvaraju kolonije mrke ili crne boje. Grupi *Bacteroides-a* pripadaju asaharolitične vrste *P. g.*, koje su srednjeg stepena fermentacije ugljenih hidrata (*Prevotella intermedia*) ili su visoko saharolitične (*Prevotella melaninogenica*).

P. g. ima neuobičajeno veliki broj faktora virulencije. Pripadnici ove vrste imaju sposobnost invazije u epitelne ćelije parodontalnog džepa, ali i endotelne ćelije aorte i srca⁹¹, izbegavajući na taj način imuni odgovor domaćina. U *in vitro* eksperimentima je pokazano da se *P. g.* može naseliti u ljudskim gingivalnim fibroblastima i tako opstati i u prisustvu antibiotika. Pored toga, može da proizvede ekstracelularne vezikule koje doprinose gubljenju receptora CD14 na makrofagima⁹². Imuni odgovor domaćina se narušava i inhibicijom migracije polimorfonuklearnih leukocita kroz epitelnu barijeru, a pokazano je da utiče i na stvaranje ili degradaciju citokina za šta su odgovorni gingipaini, koje ova bakterija proizvodi⁹³.

Gingipaini su proteini sa proteolitičkom aktivnošću koji su najviše odgovorni za virulentnost *P. g.* Podeljeni su na arginin specifične (Rgp) i lizin specifične (Kgp)⁹⁴. Rgp razgrađuje velike molekule peptida poreklom od domaćina i na taj način obezbeđuje dovoljno komponenti za ishranu *P. g.* u vidu jedinjenja azota i ugljenika. *P. g.* takođe može da razgradi transferin, protein ključan za dopremanje gvožđa ćelijama, elementa koji je neophodan za obavljanje velikog broja njihovih funkcija. Rgp gingipain je odgovoran i za osobine adhezije i invazije ćelija domaćina i adhezije za druge bakterijske vrste, zbog uloge u procesu sinteze prekursora fimbrija na površini ove bakterije. Kgp se može vezati za imobilisane proteine matriksa, fibrinogen i fibronektin i na taj način omogućiti bakteriji kolonizaciju domaćina. Gingipaini takođe imaju ulogu u modulaciji imunog odgovora domaćina. U toku enzimskih reakcija raskidaju veze u molekulu IgG antitela i otcepljuju podklasu 1 i 3⁹⁵. Pospešuju sintezu proinflammatoryh citokina: interleukina-1 β (IL-1 β), interleukina-2 (IL-2), TNF- α i interleukina-8 (IL-8)

⁹². Kao posledica svega ovoga, može se reći da su gingipaini i u velikoj meri odgovorni za proces degradacije tkiva u toku parodontitisa.

P. g. takođe učestvuje i u procesima degradacije matriksnih proteina, kolagena i fibronekrina, što dovodi i do sporijeg i manje uspešnog zarastanja parodontalnih tkiva. Osim kolagenaza, proizvodi i hemolizine, masne kiseline, NH_3 , H_2S , indol, supstancu sličnu tripsinu, fibrolizin, endotoksin i fosfolipazu ⁹⁶. Zahvaljujući ovome *P. g.* formira odgovarajuće niše i povoljne uslove za preživljavanje i drugih mikroorganizama u dentalnom plaku mogućnost nastanka rezistentnosti na antibiotike i imuni odgovor domaćina. Uklanjanje ovakvog biofilma u toku obrade parodontalnog džepa manje je efikasno u terapiji parodontitisa, jer se u toku nekoliko sati stvara novi biofilm koji može biti ponovo naseljen ovih parodontopatogenima ⁹⁴.

Virulentnost *P. g.* prepoznaje se i u sposobnosti sinteze već pomenutih fimbrija, ključnih faktora u adheziji, invaziji i kolonizaciji. *P. g.* ima dugačke fimbrije, kratke fimbrije i dodatne komponente, od kojih svaka ima različite funkcije. Fimbrije su takođe odgovorne za invaziju vezikula u ćelijama domaćina.

P. g. je odavno poznat kao parodontopatogen koji naseljava duboke parodontalne džepove, posebno na mestima sa znacima aktivne inflamacije ⁹⁷.

Istraživanja su pokazala da je inkapsulirani soj *P. g.* u mnogo većoj meri virulentan u odnosu na neinkapsulirani soj. Kapsula *P. g.* je polisaharid i kada je prisutna, utiče na sintezu proinflamatornih citokina: IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF- α . Glavni sastojak spoljašne membrane *P. g.*-a je lipopolisaharid (LPS), koji posreduje u nastanku inflamacije i podstiče leukocite da luče proinflamatorne citokine, posebno IL-1 β , TNF- α i IL-6 ⁹⁸. LPS poreklom od *P. g.* ima ključnu ulogu u inicijaciji i razvoju parodontalne bolesti ⁹⁹. Ovaj LPS je potentan stimulator produkcije inflamatornih citokina i koštane resorpcije. Jedna od ciljnih ćelija za delovanje LPS su fibroblasti koji igraju važnu ulogu u remodelaciji mekog tkiva parodontalnim i regulaciji mreže citokina koji se u njemu proizvode ¹⁰⁰.

Postoji jasna veza između prisustva *P. g.* i opšteg zdravlja. Tako na primer, gingipaini su faktori virulencije *P. g.* koji su povezani sa Alchajmerovom bolešću ¹⁰¹. *P. g.* se dovodi u vezu i sa sa patogenezi ateroskleroze velikih krvnih sudova, reumatoidnim artritisom i multiplom sklerozom ¹⁰².

1.6.3. *Prevotella intermedia* (*P. i.*)

Prevotella intermedia (*P. i.*) je svrstana u rod *Bacteroides*. *P. i.* je striktno anaerobni, gram-negativan, crno-pigmentisani štapić. *P. i.* često je izolovana kod pacijenata obolelih od parodontitisa, gingivitisa trudnoće ili nekrotizirajućeg gingivitisa ¹⁰³. Na pločici krvnog agara formira sjajne i glatke kolonije, svetlo smeđe ili crne boje ¹⁰⁴. *P. i.* može igrati ulogu u inicijaciji i razvoju parodontalne bolesti ¹⁰⁵. Ova bakterija poseduje različite vrste faktora virulencije, kao što je sposobnost adhezije, produkcije hemaglutinina, hidrolitičkih enzima i hemolizina, kao i postojanje fimbrija na površini ćelijskog omotača ¹⁰⁶. Kao i kod drugih parodontopatogenata, za rast *P. i.* je neophodno gvožđe i sposobnost za

sintezu hema, važnog faktora rasta za ove bakterije. Pokazano je da *P. i.* ima hemolitičke i hemaglutinirajuće sposobnosti. Hem oslobođen iz hemoglobina ili hemina usled hemolitične razgradnje crvenih krvnih zrnaca, je glavni izvor gvožđa i hranljivih materija neophodnih za rast ove bakterije ¹⁰⁷.

Sistemska povezanost prisustva *P. i.* i opštih oboljenja je pokazana izolovanjem DNK bakterije iz aterosklerotičnog plaka ili njenim prisustvom kod drugih kardiovaskularnih oboljenja, kao i kod majki prevremeno rođene dece. Uzimanjem krvi iz pupčane vrpce ovih beba, utvrđen je veći titar IgM antitela u odnosu na bebe rođene u planiranom terminu. Ova bakterija je prisutna i u zdravom parodonticijumu, jer je zahvaljujući fimbrijama koje poseduje u stanju da se veže za ćelije oralne sluzokože ¹⁰⁸.

1.6.4. *Tannerella forsythia* (T. f.)

Tannerella forsythi-u (T. f.) je prvobitno izolovao iz uznapredovalih parodontalnih lezija Taner (Tanner) sa saradnicima. U početku označena kao *Bacteroides forsythus*, ova anaerobna gram-negativna bakterija je klasifikovana kao član porodice *Cytophaga-Bacteroides*. Kada su taksonomske analize zasnovane na *16S rRNK* sekvenci otkrile da je ova vrsta bliže povezana sa predstavnicima *Porphyromonas* nego *Bacteroides*, reklasifikovana je u porodicu *Porphyromonadaceae* i dobila je naziv *Tannerella forsythia* (T. f.) ¹⁰⁹. T. f. je nepokretna anaerobna bakterija filamentozne ćelijske morfologije; tek nakon 7 – 14 dana uzgajanja stvara male kolonije tako da se teško kultiviše. T. f. pokazuje tipičnu gram-negativnu ćelijsku ovojnicu koja se sastoji od citoplazmatske membrane, periplazme i spoljne membrane koja sadrži lipopolisaharid ¹¹⁰. Pored toga, spoljna membrana bakterije je u potpunosti prekrivena jedinstvenim površinskim S-slojem ^{111, 112}. Pokazalo se da ovaj S-sloj zajedno sa površinskim BspA (engl. *Bacteroides surface protein A*) proteinom karakterističnim za T. f. ⁵⁵ može da izvrši supresiju odgovora T-helper limfocita na signal poreklom od dendritičnih ćelija i na taj način poveća resorpciju alveolarne kosti (na animalnom modelu miša) ¹¹³.

Osim ovih faktora T. f. poseduje i druge faktore virulencije, uključujući i površinski antigen-proteolitčki enzim ¹¹⁴, hemaglutinin ¹¹⁵, lipopolisaharid ćelijske membrane ¹¹⁶, glikozidaze ¹¹⁷. T. f. ima sposobnost da produkuje proteinazu nalik tripsinu ¹¹⁸. Važna karakteristika je i sposobnost prodora u ćelije domaćina i indukcija apoptoze ¹¹⁹.

T. f., *P. g.* i *Treponema denticola* ulaze u sastav „crvenog kompleksa” bakterija. U *in vivo* studijama je pokazano da patogeni potencijal ove bakterije raste u prisustvu drugih bakterija, na primer *Fusobacterium nucleatum* i *P.g.* a njihova koinfekcija dovodi do ubrzanog procesa resorpcije kosti ¹²⁰. Zbog toga je T. f. uvek usko povezana sa aktivnim lezijama u toku parodontitisa.

„Crveni kompleks” bakterija je u direktnoj korelaciji sa kliničkim parametrima kao što su dubina sondiranja i indeks krvarenja gingive. Ovaj kompleks ima osobinu da indukuje sekreciju citokina kao što su IL-1b, IL-6, IL-8 and TNF- α , koji dovode do egzacerbacije inflamacije ¹²¹.

Dodatno, ova bakterija u zajedničkim kulturama makrofaga i inflamatornih ćelija dovodi do ekspresije proinflamatornih citokina, hemokina, prostaglandina E (PGE) i matriksne metaloproteinaze 9 (MMP-9)¹²².

1.7. MIKROORGANIZMI I STANJE PARODONCIJUMA

Zastupljenost pojedinih vrsta mikroorganizama u subgingivalnom dentalnom plaku je procentualno promenljiva tokom vremena i karakteristična za svakog pojedinca. Sa pojavom oboljenja dolazi do drastične promene u broju pojedinih mikroorganizama u odnosu na zdrav parodontcijum, pogotovo parodontopatogena. U toku razvoja parodontitisa raste i ukupan broj bakterija, tako da on u akutnoj fazi bolesti može biti i dvostruko veći¹²³.

Za razliku od zdravog parodontcijuma gde se u dentalnom plaku nalazi prosečno 75% gram-pozitivnih mikroorganizama, parodontitis karakteriše i do 65% gram-negativnih bakterija.¹²⁴

U dentalnom plaku gingivalnog sulkusa uglavnom perzistiraju *Streptococcus* i *Actinomyces* (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces viscosus* i *Actinomyces naeslundii*). U daleko manjem procentu su zastupljene (oko 13%) *P. i.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga*, *Neisseria* i *Veillonella species*, *Campylobacter species*, a najmanje spirohete i pokretni bacili³². Pojedine bakterije imaju protektivnu ulogu, s obzirom da naseljavaju samo zdrave, a nema ih u obolelim regijama. Tu se svrstavaju: *Streptococcus sanguis*, *Veillonella parvula*, *Capnocytophaga ochracea* i *Campylobacter*.

Sa pojavom inflamacije u gingivi nakon 3–4 dana, a potom i kliničkom manifestacijom akutnog oblika gingivitisa, broj gram-pozitivnih aerobnih mikroorganizama opada. Hronični gingivitis se karakteriše podjednakom procentualnom zastupljenošću i jednih i drugih. Nakon daljeg produblјivanja gingivalnog a potom i parodontalnog džepa, počinju da prevladavaju gram-negativni anaerobni mikroorganizmi.

Hronični parodontitis karakteriše faze egzacerbacije i remisije koje se periodično smenjuju. U dentalnom plaku ovih pacijenata se može naći i do 90% anaerobnih i 70% gram-negativnih mikroorganizama uz prisustvo i spiroheta. Gram-pozitivni mikroorganizmi čine svega 10–13% ukupne populacije¹²⁵. U fazama remisije u manjem broju prisutni su: *P. g.*, *P. i.*, *A. a.*, *T. f.*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, i *Treponema denticola*. U fazama egzacerbacije povećava se broj sledećih mikroorganizama: *P. g.*, *T. f.*, *P. i.* i *A. a.* Pokazalo se da njihovom eliminacijom dolazi do značajnog poboljšanja, tj. remisije oboljenja. Dinamika povećavanja i smanjivanja pojedinih mikroorganizama je usko povezana sa njihovim međusobnim odnosom u oformljenim mikroekosistemima, ali i neprekidnom interakcijom sa domaćinom.

Na osnovu osobina spomenutih mikroorganizama, *A. a.* se smatra glavnim uzročnikom agresivnog parodontitisa, a *P. g.* i *T. f.* su uzročnici hroničnog parodontitisa. Navedene patogene bakterije su dokazane u ispitivanjima koja su obavljena i na eksperimentalnim životinjama¹²⁶.

1.8. PATOGENEZA OBOLJENJA PARODONCIJUMA IZAZVANIH DENTALNIM PLAKOM

Inflamacija tkiva nastaje kao zbir imunoloških i biohemijskih reakcija izazvanih dejstvom fizičkih, hemijskih ili bioloških štetnih agenasa ili apoptozom ćelija. U akutnoj fazi inflamacije, kao kratkotrajni imuni odgovor, nastaje niz celularnih i morfoloških promena, kako bi se oštećenje tkiva ograničilo i lokalizovalo. Međutim, ukoliko ne dođe do rezolucije tkiva, javlja se hronična inflamacija praćena nizom destruktivnih patoloških procesa uključujući aktivaciju i urođenog i stečenog imuniteta tokom dužeg vremena. Imunološke reakcije imaju ulogu u rezoluciji inflamacije i procesu zarastanja, kao i reparaciji i regeneraciji oštećenog tkiva.

1.8.1. Klinička slika zdrave gingive

Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji, zdrav parodontijum je stanje koje se odlikuje odsustvom znakova inflamacije karakterističnih za parodontalna oboljenja, gingivitis ili parodontitis, stanje koje omogućava pojedincu da normalno obavlja svoje svakodnevne aktivnosti i koje ne remeti njegovo fizičko, psihičko ili mentalno zdravlje. Intaktni parodontijum se karakteriše netaknutim pripojnim epitelom, odsustvom koštane resorpcije, kao i klinički vidljivog krvarenja u toku sondiranja, crvenila ili otoka gingive i simptoma oboljenja koje bi saopštio pacijent. U fiziološkim uslovima nivo ivice kosti se nalazi 1–3mm od gledno-cementne granice zuba.

Klinički zdrava gingiva na redukovanom parodontijumu odlikuje se takođe odsustvom krvarenja prilikom sondiranja, eritema i edema, odsustvom simptoma parodontitisa, ali prisustvom resorpcije kosti i apikalne migracije pripojnog epitela.

Najznačajnije je napomenuti da uspešno lečen i stabilan parodontitis može da se manifestuje klinički zdravim, ali redukovanim parodontijumom ili blagom marginalnom inflamacijom gingive sa dubinom sondiranja ≤ 3 mm. Ovakvo stanje je uvek praćeno povećanim rizikom od pojave rekurentne progresije oboljenja.

1.8.2. Gingivitis

Kao reakcija na prisustvo najmanje količine dentalnog plaka u tkivu gingive dolazi do nakupljanja inflamatornog infiltrata koji predstavlja „fiziološki imuni odgovor”. Čak i kada se nivo biofilma svede na minimum, inflamatorni infiltrat ostaje prisutan u tkivima gingive kao deo fiziološkog imunog „nadzora”^{127, 128}.

Pionirskom studijom Lo-a (*Loe*) i sar. *Eksperimentalni gingivitis kod čoveka*, koja je objavljena 1965. godine, potvrđena je uloga zubnog plaka u genezi gingivalnih i parodontalnih bolesti¹²⁹. U roku od 7 do 21 dana nakon prekida mera oralne higijene dolazi do razvoja gingivitisa. Ovaj razvoj gingivitisa je reverzibilan proces koji se odvija u roku od 7 do 10 dana nakon ponovnog uspostavljanja mera oralne higijene¹²⁹. Naredne studije pokazale su bakteriološku pozadinu bolesti i pomeranje gram-pozitivne bakterijske populacije povezane sa parodontnim zdravljem u pravcu pretežno gram-negativne zajednice, povezane sa parodontnom bolešću.

Ukoliko ne postoje naslage dentalnog plaka, u parodontalnom tkivu je prisutna minimalna koncentracija zapaljenskog infiltrata, koja učestvuje u održanju homeostaze. U prvim satima nakon uklanjanja dentalnog plaka, kada dođe do njegovog ponovnog formiranja, prvu liniju odbrane predstavljaju neutrofilni leukociti, koji čine oko 20% ćelija infiltrata. U slučaju da naslage dentalnog plaka perzistiraju i nakon 4 dana, doći će do nakupljanja velikog broja leukocita u vezivnom tkivu neposredno ispod pripojnog epitela i do 7-og dana neutrofilni granulociti će činiti između 60% i 70% ukupne populacije leukocita. Nakon ovog perioda u infiltratu postepeno dominaciju preuzimaju monociti, da bi od 28-og dana veći deo predstavljali plazmociti, a neutrofili činili samo malu frakciju.

U toku razvoja gingivitisa preovladava nespecifično delovanje svih mikroorganizama dentalnog plaka na tkivo što za posledicu izaziva inflamatornu reakciju¹³⁰. U trenutku kada dođe do pojave disbioze i dominantne zastupljenosti najagresivnijih anaerobnih mikroorganizama (parodontopatogena), doći će do pogoršanja inflamacije i pojave parodontitisa¹³¹.

Gingivitis predstavlja inflamatorno stanje inicirano mikroorganizmima iz nakupljenog dentalnog plaka, kao i njihovim produktima¹³². Karakteriše ga crvenilo i otok gingive, kao i odsustvo gubitka vezivno-tkivnog pripoja¹³³. Gingivitis je obično bezbolan, udružen sa suptilnim kliničkim promenama, ređe sa njihovim komplikacijama, što rezultuje time da većina pacijenata nije svesna da bolest postoji niti je u stanju da je prepozna. U gingivalnom džepu, kao patognomoničnom znaku oboljenja, uglavnom su zastupljeni gram-pozitivni mikroorganizmi (*Actinomyces viscosus*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus spp*) i gram-negativni anaerobi (*Campylobacter gracilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *P. i.*, *Veillonella parvula*)¹³⁴. Perzistiranje povoljnih uslova u toj mikro-sredini tokom dužeg vremena, pogodovaće smeni ovih mikroorganizama potentnijim parodontopatogenima i razvoju parodontitisa.

Prelazak iz stanja parodontnog zdravlja u stanje koje karakteriše gingivitis je reverzibilan. Gingivitis nije sam dovoljan uslov za razvoj parodontitisa¹³⁵. Ukoliko ipak dođe do napredovanja ovog oboljenja i njegovog prelaska u parodontitis, javlja se gubitak vezivno-tkivnog pripoja, koji predstavlja ireverzibilan proces.

1.8.3. Parodontitis

Parodontitis je hronična multifaktorska inflamatorna bolest parodontijuma udružena sa disbiotičnim dentalnim plakom i progresivnom destrukcijom tkiva. U toku patogeneze parodontitisa dolazi do progresije eksudativno-produktivnog tipa zapaljenja u dublja parodontalna tkiva, koje zatim smenjuju degenerativno-atrofični procesi, uz pojavu patognomoničnog znaka parodontitisa parodontalnog džepa.

Parodontalni džep nastaje anatomskom i funkcionalnom dezintegracijom parodontijuma, produbljivanjem gingivalnog džepa apikalnom migracijom pripojnog epitela usled gubitka vezivno-tkivnog pripoja i resorpcije alveolarne kosti, što na kraju može dovesti do labavljenja i ispadanja zuba.

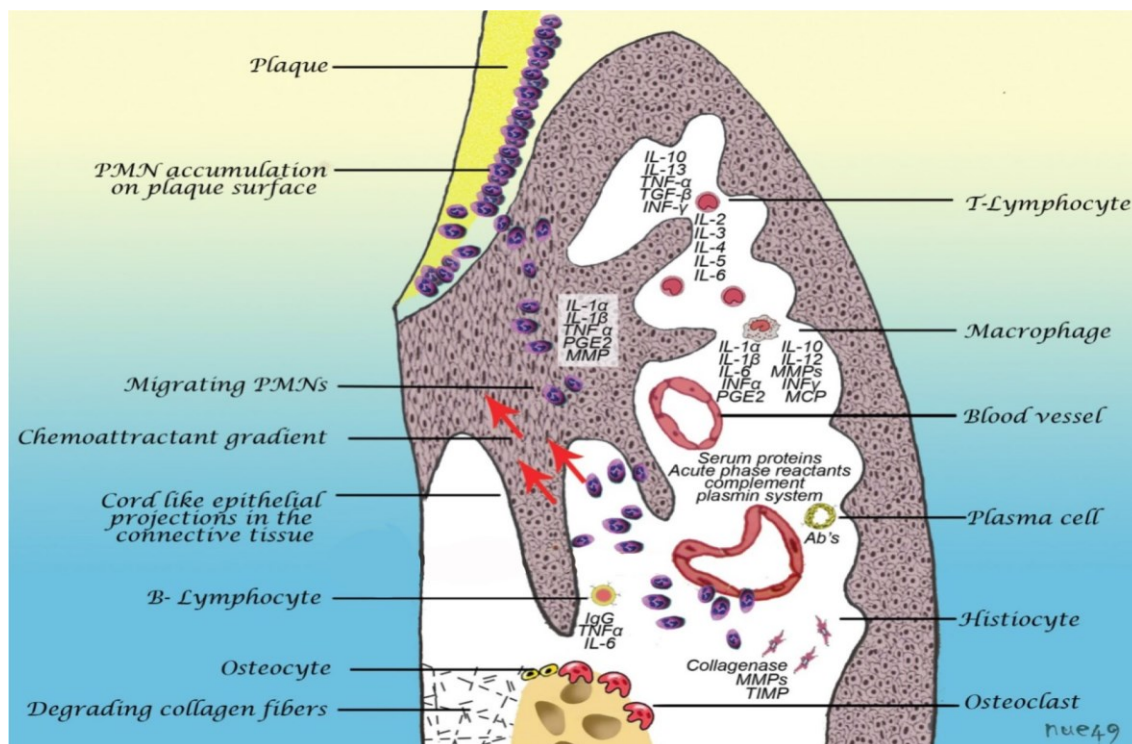
Klinička manifestacija ovih promena, tj. znaci parodontitisa – inflamacija gingive, recesija gingive, parodontalni džep, subgingivalni konkrementi, supuracija iz mekog zida parodontalnog džepa, labavljene i patološka migracija zuba – praćeni su manje ili više izraženim simptomima ovog oboljenja poput krvarenja spontanog ili na provokaciju, osećaja trnjenja, pritiska između zuba, preosetljivosti ogoljenih korenova zuba na termičke i hemijske nadražaje, promene ukusa, kao i zadah iz usta¹³⁶.

Važno je istaći da stepen inflamacije i destrukcije parodontijuma u toku parodontitisa nije zastupljen u jednakoj meri u predelu svih zuba jednog zubnog niza. Stepenn oštećenja tkiva nije identičan čak ni na svim površinama jednog zuba¹³⁷. Parodontitis predstavlja dinamičan proces koji karakterišu smene perioda egzacerbacije i remisije oboljenja. Period egzacerbacije se odlikuje akutnim pogoršanjem inflamacije, širenjem procesa alteracije u dublja parodontalna tkiva i kliničkim produbljivanjem parodontalnih džepova koje može trajati od nekoliko dana do više meseci. Ukoliko odbrambeni mehanizmi uspeju da lokalizuju ovaj proces, postepeno dolazi do smanjenja inflamacije, prekida se dalji proces resorpcije kosti i degeneracije vezivnog tkiva i dolazi do uspostavljanja ravnoteže između dejstva štetnih noksi i odbrambenih snaga domaćina. Kada ponovo dođe do poremećaja ove ravnoteže, javiće se dalja destrukcija parodontijuma⁶⁷.

Prelazak gingivalnog u parodontalni džep podržava više teorijskih objašnjenja uzajamnog uticaja bakterijskog faktora i faktora domaćina. Povećanjem stepena inflamacije u tkivu povećava se i koncentracija nakupljenih neutrofilnih granulocita, dolazi do proširenja kapilara i njihove povećane propustljivosti, uvećava se količina gingivalne tečnosti i proširuju se intercelularni prostori pripojnog epitela¹³⁸. Umerena distenzija intercelularnih prostora se ne smatra poremećajem strukture i funkcije pripojnog epitela, ali povećan broj polimorfonuklearnih leukocita na kraju dovodi do dezintegracije pripojnog epitela¹³⁹. Ovo je u skladu sa konceptom da sam domaćin učestvuje u inicijaciji destrukcije pripojnog epitela.

Inicijator ovog imunog odgovora domaćina je stalno dejstvo bakterija dentalnog plaka, koje se brzo šire u dublja parodontalna tkiva usled slabljenja prve linije odbrane¹³⁹. S tim u vezi, predmet intenzivnih istraživanja bili su gingipaini. Gingipaini su cisteinske proteinaze, jedne od osnovnih faktora virulencije *P. g.*, vodećeg uzročnika hronične inflamacije i nastanka parodontitisa¹²¹. Osim proteolize međućelijskih veza epitelnih ćelija, gingipaini cepaju i međućelijski adhezivni molekul-1 na oralnim epitelnim ćelijama, koji dovodi do poremećaja interakcije (adhezije) između polimorfonukleara i epitelnih ćelija i učestvuju u kontroli migracije leukocita na mestu inflamacije¹⁴⁰.

Dakle, specifična degradacija međucelijskih veza i poremećaj adhezije neutrofila za epitelne ćelije ukazuju na važnost gingipaina kao faktora virulencije koji indukuje degradaciju pripojnog epitela, što na kraju dovodi do razvoja parodontalnog džepa. Migriranje epitela u apikalnom pravcu se odvija zbog njegove destrukcije u koronarnom delu i smanjenja njegove visine, uz istovremenu apikalnu proliferaciju epitelnih ćelija, kako bi se održao biološki mehanizam – epitelni pripoj¹³⁹.



Slika 1.2. Šematski prikaz ćelija zapaljenja i citokina u toku razvoja zapaljenja

(preuzeto: <https://periobasics.com/periodontal-pocket/>)

1.8.4. Progresija gingivitisa u parodontitis

Pejdz i Šreder (*Page & Shroeder*) su 1986. godine klasifikovali proces patogeneze gingivitisa u parodontitis u 4 faze: inicijalna, rana, manifestna i uznapredovala ¹⁴¹.

Inicijalna faza oboljenja ne pokazuje klinički manifestne znake bolesti, ali se na histološkom nivou odigravaju prvi znaci inflamacije. U ovoj fazi ne postoje klinički znaci oboljenja, iako dolazi do aktiviranja epitelnih ćelija da produkuju proinflamatorne citokine i stimulišu proizvodnju neuropeptida koji uzrokuju vazodilataciju krvnih sudova i uvećanje intercelularnih prostora između endotelnih ćelija. Povećava se protok gingivalne tečnosti, koja potpomaže rastvaranje i spiranje štetnih noksi poreklom iz dentalnog plaka. Neutrofili bivaju privučeni hemotaktičnim signalima usled prisustva povećanog broja mikroorganizama i njihovih produkata, produkcijom proinflamatornih citokina i hemokina u povećanim koncentracijama (npr. IL-8) ¹⁴².

Rana faza – broj neutrofila se drastično povećava, ali im se pridružuju i monociti, tj. tkivni makrofagi, limfociti i mastociti. U ovoj fazi klinički se može detektovati krvarenje na provokaciju. Fibroblasti pokazuju znake degeneracije putem apoptoze, započinje razgradnja kolagenih vlakana da bi se obezbedio prostor za limfocitnu infiltraciju ¹⁴³. Makrofagi su dominantni u tkivu i igraju ključnu ulogu u novoj regrutaciji neutrofila i limfocita putem produkcije citokina, proinflamatornih: interleukina-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) i TNF- α ¹⁴⁴. Na površini epitelnih ćelija se nalaze toll-like receptori, koji se aktiviraju vezivanjem mikroorganizama ili njihovih produkata, a onda preko brojnih medijatora dovode do produkcije IL-1, IL-6 i TNF- α . U međuvremenu se povećava koncentracija i hemokina poput IL-8, inflamatornih proteina i RANTES u gingivalnom tkivu i u gingivalnoj tečnosti. Oni su nadalje hemotaksa za nove imune ćelije ¹⁴⁵. Kao odgovor na proinflamatorne citokine i hemokine, makrofagi i T-limfociti započinju proizvodnju antiinflamatornih citokina: interleukina-4 (IL-4), interleukina-10 (IL-10) i interleukina-13 (IL-13).

Manifestna faza – ovo je stadijum u kojem inicijalna akutna lezija nije uspešno izlečena u toku imunog odgovora i zbog toga prelazi u hroničnu leziju. Histološki T-limfociti i B-limfociti postaju predominantni sa IgG1 (imunoglobulin G1) i IgG3 (imunoglobulin G3) prisutnom potklasom B-limfocita ¹⁴⁶. Protok krvi je kompromitovan, a kolagenoliza je uznapredovala. Pripojni epitel mahom naseljavaju neutrofilni leukociti i on postaje visoko propustljiv za brojne supstance u/i iz vezivnog tkiva ¹⁴⁶. Takođe se povećava proizvodnja kolagena od strane fibroblasta. Klinički se ova faza manifestuje kao umereni do teški gingivitis sa krvarenjima iz gingive promenjene boje, oblika, veličine, površinske građe i strukture, ali pripojni epitel je još uvek na gledno-cementnoj granici i nema znakova resorpcije alveolarne kosti. Ovakvo stanje može perzistirati u dužem vremenskom periodu, kao hronična inflamacija, bez prelaska u parodontitis ili se može u potpunosti izlečiti: *restitutio ad integrum*, ukoliko se egzaktno izvrši eliminacija dentalnog plaka i drugih naslaga sa površine zuba ¹⁴⁷.

Uznapredovala lezija gingivalne inflamacije dovodi do pojave parodontitisa. Ovo je stadijum kada restitucija parodonticijuma postaje ireverzibilna. U ovoj fazi, predominantno limfocitna infiltracija se širi na dublja parodontalna tkiva, dolazi do dalje destrukcije kolagenih vlakana, migracije pripojnog epitela i resorpcije alveolarne kosti ¹⁴⁷. Matriksne metaloproteinaze kojih ima u velikim količinama u tkivu su povezane sa degradacijom integriteta tkiva. Dolazi do ekspresije tkivnih inhibitora matriksnih metaloproteinaza: antiinflamatornih citokina, hemokina. Istovremeno, kada započne inflamacija,

započinje i proces obnove, da bi se postigla homeostaza, a ćelije koje učestvuju u ovim procesima su iste ¹⁴⁸. Nepotpuna eliminacija leukocita, tkivnog detritusa i odložena apoptoza ćelija iz lezije rezultiraju neuspelom u rešavanju akutne inflamacije, što dovodi do hronične bolesti i fibroze. Oštećenje tkiva koje nastaje usled aktivnosti neutrofila je glavni uzrok patoloških procesa u ljudskom organizmu uključujući artritis, astmu, karcinom, kardiovaskularne bolesti i parodontalne bolesti ¹⁵⁰.

U tkivu se proces destrukcije može ograničiti pokretanjem reparatornih mehanizama, prvenstveno aktivacijom fibroblasta da produkuju brojne faktore rasta. Pored toga fibroblasti luče nove količine kolagenih vlakana, a osteoblasti se aktiviraju kao odgovor na osteoklastnu resorpciju kosti. Ovaj preokret događaja u koštanom tkivu regulišu RANKL i osteoprotežerin. Bitka između reparacije i degradacije vodi ka hroničnoj dugogodišnjoj leziji u kojoj parodontitis napreduje polako. Inflamacija tkiva gingive je preduslov da bi se razvio parodontitis, ali samo ako za to postoje odgovarajući uslovi. U suprotnom, gingivitis može postepeno biti izlečen.

Parodontalna sredina je mesto sa najvećim brojem bakterija u organizmu i tkivo parodonticijuma nikada ne može biti sterilno i posle najdetalnijeg i najupornijeg čišćenja dentalnog plaka i drugih naslaga na mekim i čvrstim oralnim tkivima ¹⁴⁹.

Na samom početku inflamacije medijatori zapaljenja i hijaluronidaza dovode do razgradnje osnovne komponente ekstracelularnog matriksa, mukopolisaharida. Međućelijski prostori pločasto-slojevitog epitela bivaju prošireni. Kasnije, kako proces napreduje, kao odgovor na destruktivne procese u vezivnom tkivu, epitel (sulkusni i pripojni) zadebljava i kao fizička barijera sprečava prodor mikroorganizama. Štaviše, epitelne ćelije ekspimiraju antimikrobne peptide – defenzine ¹⁵¹. Pošto su u stalnom kontaktu sa bakterijama i njihovim produktima, epitelne ćelije luče i hemokine kako bi privukli neutrofilne granulocite u subepitelno vezivno tkivo. Na taj način epitel ne predstavlja samo prostu fizičku barijeru ka parodontopatogenima ¹⁵².

Prepoznavanje molekula koji su strani patogeni od strane imunog sistema u većini slučajeva se odvija preko receptora koji se nazivaju toll-like receptori. Oni se nalaze na površini ćelijske membrane leukocita, uključujući neutrofile, monocite, makrofage, NK ćelije (natural killer), T i B limfocite ¹⁵³. Toll-like receptori se takođe ekspimiraju na prekursorima osteoklasta, kao i na osteoblastima, fibroblastima, endotelnim, dendritičnim i epitelnim ćelijama, od kojih svaka ima različit profil i ekspresiju ovih receptora. Ovi receptori omogućavaju prepoznavanje brojnih antigenih molekula, uključujući lipopolisaharid, bakterijski lipoprotein, lipoteihoičnu kiselinu, flagelin i dr. ¹⁵⁴.

Kada se za toll-like receptore vežu patogeni molekuli, započinje niz intracelularnih događaja, što dovodi do proizvodnje citokina, hemokina i antimikrobnih peptida. Toll-like receptor ima i potencijal da indukuje razne citokine kroz nuklearni faktor *kappa* pojačivača lakog polipeptidnog gena u jezgru B-limfocita. Prvi citokini urođenog imunog odgovora koji se detektuju u toku patogeneze parodontitisa su TNF- α , IL-1 β i IL-6. IL-1 β i IL-6 su odgovorni za migraciju inflamatornih ćelija i osteoklastogenezu dok TNF- α pokazuje više različitih efekata ¹⁵⁵.

Neutrofilni granulociti, ključni činiooci urođenog imuniteta, imaju fundamentalnu ulogu u održanju zdravlja potpornog aparata zuba, uprkos stalnim negativnim uticajima poreklom dentalnog plaka ¹⁵⁶. Neutrofilni migriraju iz krvnih sudova gingivalnog pleksusa do ekstravaskularnog vezivnog tkiva, a zatim kroz bazalnu membranu u intercelularne prostore pripojnog epitela. Prisustvo jednog broja

neutrofila u pripojnom epitelu formira zaštitnu barijeru domaćina između subgingivalnog biofilma i gingivalnog tkiva.

Kao odgovor na prisutne hemotaktične faktore neutrofili su prve ćelije koje pristižu u većoj koncentraciji. Osim hemokina hemotaktično dejstvo imaju i bakterijski produkti, komplement, peptidaze i dr. Neutrofilni granulociti imaju zadatak da ograniče patološki izmenjeno tkivo i spreče dalje širenje dejstva štetnih agenasa. Osim fagocitoze imaju ulogu i u sintezi i oslobađanju: elastaze, lizozima, kisele hidrolaze, katepsina, laktoferina, ali i kolagenaza I i II (MMP-8 i 9). Prilikom obavljanja svojih funkcija, neutrofilni granulociti mogu dovesti i do oštećenja tkiva domaćina, koja mogu biti značajna za dalji razvoj parodontitisa. Naime, smatra se da enzimaska hiperaktivnost neutrofilnih granulocita u mnogome doprinosi razvoju bolesti, kao i povećana produkcija slobodnih radikala kiseonika (engl. *reactive oxygen species*–ROS) ¹⁵⁷.

Druga vrsta važnih imunih ćelija koje učestvuju u patogenezi parodontitisa su makrofagi. Makrofagi su široko rasprostranjeni fagociti, koji igraju nezamenljivu ulogu u homeostazi i odbrani organizma. Oni efikasno fagocituju deo antigena i eksprimiraju glavne molekule u okviru histokompatibilnog kompleksa klase II koji kostimulatorno indukuju aktivnost T-ćelija. Klasični inflamatorni makrofagi (M1) aktiviraju interferon γ (IF- γ) i lipopolisaharid. Alternativni aktivirani makrofagi (M2) su važne ćelije u rezoluciji inflamacije; oni imaju smanjeni kapacitet za proizvodnju proaktivnih citokina ¹⁵⁸.

Daljom progresijom inflamacije, ako rana lezija potraje bez rezolucije, prezentovanje bakterijskih antigena dovodi do aktivacije limfocita. Aktivacija B-limfocita ide u pravcu sinteze specifičnih antitela. T-limfociti, u sastavu efektorskog odloženog imuniteta, aktiviraju se pod uticajem glavnog histokompatibilnog kompleksa i potom učestvuju u degradaciji patogene ćelije, aktivaciji drugih T-i B limfocita i makrofaga. Na taj način T-limfociti imaju značajnu ulogu u i u celularnom i u humoralnom imunitetu.

Novo otkriveni T-CD4 limfociti T-helper 17 i T-regulatorni limfociti direktno su odgovorni za nastanak lezije u toku parodontitisa. T-helper 17 su dobili naziv po svojoj jedinstvenoj sintezi interleukin-17 (i IL-22) koji stimuliše osteoklastogenezu ¹⁵⁹.

1.8.4.1. Destrukcija ekstracelularnog matriksa

U vezivnom tkivu dolazi najpre do kidanja manjeg broja kolagenih vlakana i njihove fragmentacije. Kako proces dezintegracije tkiva napreduje, sve veći broj kolagenih vlakana biva zahvaćen, što vodi ka poremećaju u pravcu njihovog prostiranja i dezorganizaciji. Promene zahvataju i elastična, retikulinska i ostala vlakna, pa tkivo u potpunosti menja svoju morfologiju ¹⁶⁰. Istovremeno, povećana količina ćelijskog infiltrata direktno utiče na stepen oštećenja vezivnotkivnih komponenti u toku razvoja oboljenja. Hiperaktivirani neutrofili dovode do pojačane produkcije lizosomalnih enzima i kolagenaza, pogotovo MMP-8, što rezultuje smanjenom količinom kolagena. Proces napredovanja inflamacije se nakon povećane propustljivosti krvnih sudova, manifestuje vazokonstrikcijom krvnih sudova, zadebljanjem njihovog zida i obliteracijom lumena ¹⁶¹. Zbog smanjene koncentracije kiseonika i drugih

hranljivih materija u tkivu, dolazi do redukcije metabolizma ćelija, posebno fibroblasta, što se prepoznaje smanjenjem regenerativnog i reparatornog potencijala tkiva¹⁶². Klinički se manifestuje i pojavom recesije gingive kao znakom manifestnog stadijuma parodontitisa.

Na koronarnom kraju pripojnog epitela dolazi do kidanja dezmozoma i hemidezmozoma, a njegove apikalne ćelije nastavljaju da proliferišu u apikalnom smeru u delove vezivnog tkiva bez potpore kolagenih vlakana. Kao posledica destrukcije vezivnotkivnih elemenata, izraženog ćeliskog infiltrata i povećane količine eksudata u međućelijskom prostoru dolazi do apikalne migracije pripojnog epitela duž korena zuba¹⁶³. Na taj način se produbljuje gingivalni džep u parodontalni džep.

Sulkusni i pripojni epitel se ubrzo istanjuju i ulcerišu što vodi krvarenju prilikom sondiranja ovakvih prostora.

Bakterije kolonizuju eksponirane površine zuba i nikada ne bivaju uklonjene u potpunosti iz parodontalnog džepa. One aktiviraju prvo nespecifičnu, a potom i specifičnu zaštitu organizma, stimulacijom lučenja citokina i drugih derivata arahidonske kiseline i MMP-a. Rezultat je stalna inicijacija destruktivnog inflamatornog odgovora u tkivima parodonticijuma. Produbljivanjem parodontalnog džepa, pokušaji eliminacije bakterija bivaju sve teži i ciklus se iznova ponavlja i sve više progredira¹⁶³.

1.8.4.2. Destrukcija kosti

Resorpcija kosti pod dejstvom osteoklasta se odigrava kao reakcija na signale poreklom iz imunskih ćelija kako bi se očuvala „sigurna” udaljenost od inflamatornog infiltrata. Zapravo, dva glavna faktora koja dovode do resorpcije kosti u toku parodontitisa su količina medijatora zapaljenja, kao i udaljenost inflamatorne reakcije od ivice kosti. Brojna istraživanja su pokazala da je kod pacijenata obolelih od parodontitisa alveolarna kost odvojena zonom zdravog vezivnog tkiva širine 0,5–1 mm¹⁶⁴.

Različiti medijatori kao što su IL-1 β , prostaglandin E2 (PGE2), IL-6 i TNF- α i su aktivatori osteoklasta,. Drugi regulatorni mehanizam remodelovanja kosti uključuje aktivator receptora za nuklearni $\kappa\beta$ (RANK) i njegov ligand (RANKL) i osteoprotežerin (OPG), preko aktivacije i diferencijacije osteoklasta i prekursora osteoklasta¹⁶⁵. U toku remodelacije koštanog tkiva i proliferacije i diferencijacije osteoblasta, javlja se pojačana sekrecija RANKL-a. Vezivanje RANKL-a za RANK na površini preosteklasta izaziva njihovu diferencijaciju i fuziju u polimorfonuklearni osteoklast. Kada se OPG nađe u blizini RANKL-a, vezivanjem za njega blokiraće stvaranje kompleksa RANKL–RANK i dalje kaskade ove reakcije¹⁶⁶. Osim kompleksa monocit/makrofag, dendritičnih ćelija, T i B limfocita, RANKL ekspimiraju i mezenhimne ćelije, stromalne ćelije, hondrociti, osteoblasti, prekursori osteoklasta i zreli osteoklasti¹⁶⁷. Suprotno tome OPG ekspimiraju fibroblasti i ćelije periodontalnog ligamenta¹⁶⁸.

Pokazano je da blokiranje RANKL aktivnosti OPG-om signifikantno zaustavlja gubitak koštanog tkiva kod reumatoidnog artritisa, osteoporoze, resorpcije alveolarne kosti kod pacijenata sa dijabetesom ili kao

posledica metastaza. Sve ovo potvrđuje ključnu ulogu kompleksa RANKL/RANK/OPG u osteoklastogenezi, kojoj doprinosi i produkcija faktora stimulacije kolonije makrofaga (CSF-1) koji proizvode osteoblasti i stromalne ćelije¹⁶⁹.

Kontinuirani procesi resorpcije i apozicije kosti održavaju visinu alveolarne kosti na tačno određenom nivou. Merenjima je pokazano da se u fiziološkim uslovima ivica kosti nalazi u proseku na 1–3mm od gleđno-cementne granice zuba. Najuticajniji faktori koji dovode do koštane resorpcije su proinflamatorni citokini (IL - 1, IL - 6, TNF- α), IF- γ , prostaglandini (najviše E2) i leukotrieni (kao i drugi derivati arahidonske kiseline). Nasuprot njima, formiranju kosti doprinose faktor rasta dobijen iz trombocita (PDGF), transformišući faktor rasta β (TGF - β), koštani morfogeni faktor (BMF) i insulinu sličan faktor rasta 1 i 2 (IGF 1 i 2)^{67, 161}.

Cirkulišući faktori koštane remodelacije su steroidni hormoni (pogotovo estrogen), paratiroidni hormon, kalcitonin i vitamin D3¹⁷⁰. U toku parodontitisa dolazi do prevage procesa resorpcije nad procesom apozicije kosti pod uticajem opštih i lokalnih faktora. Inflamacija gingive koja se širi u alveolarnu kost putem vaskularnog kanala interdentalnog septuma rezultuje horizontalnom resorpcijom alveolarne kosti. Sinergistično delovanje inflamacije i traumatske okluzije stvara uslove za vertikalnu (kosu) resorpciju alveolarne kosti¹⁶¹.

1.8.4.3. Destruktivne promene u periodontalnom ligamentu

Nakon narušavanja integriteta pripojnog epitela, širenje inflamacije u periodocijum se odvija duž periodontalnih vlakana, krvnih i limfnih sudova. Smer prodora mikroorganizama i migracije ćelija imunog odgovora je donekle usmeren u pravcu prostiranja gingivo-dentalne, cirkularne i trans-septalne grupe vlakana. Tako na smer širenja inflamacije utiče i postojanje traumatske okluzije, koja menja pravac prostiranja ovih vlakana. U toku razvoja destruktivnih procesa u parodontocijumu dolazi do postepene razgradnje kolagenih vlakana periodontalnog ligamenta, ćelijske infiltracije i potom do razgradnje i drugih komponenata ekstracelularnog matriksa. Destrukcija ekstracelularnog matriksa svakako zavisi od održavanja ravnoteže u ekspresiji MMP-a i njihovih inhibitora, što je regulisano brojnim mehanizmima, između ostalih i IL-1 α i -1 β , TGF- β , IL-10 i LPS¹⁷¹.

Rezultat degradacije periodontalnog ligamenta je još apikalnija migracija pripojnog epitela i dalje produblјivanje parodontalnog džepa.

1.8.4.4. Destrukcija cementa korena zuba

Na površini acelularnog cementa koji prekriva dentin korena zuba, tokom čitavog života stvara se celularni cement od strane cementocita. Oni svoje nutritijente u adultnom životnom dobu dobijaju isključivo iz periodontalnog ligamenta. Nakon destrukcije periodoncijuma, izostaje mogućnost difuzije hranljivih materija ka cementocitima uz istovremeno negativno dejstvo spoljašnje sredine. Cement podleže nekrozi i demineralizaciji. Razgradnja Šarpejevih vlakana se odvija pod dejstvom proteolitičkih enzima mikroorganizama ili samog domaćina, oslobođenih u toku inflamatornog odgovora. Usled propadanja cementa i olakšane mogućnosti njegovog uklanjanja sa površine korena, ogoljeni dentinski tubuli će biti otvoreni za transdukciju termičkih, hemijskih i mehaničkih signala ka pulpnom tkivu, kao i za prodor samih mikroorganizama. Vidljive posledice su pojava karijesa korena zuba uz mogućnost pojavljivanja komplikacije pulpitisa. Hrapava površina korena zuba je još u većoj meri prijemčiva za dentalni plak i akumulaciju novih čvrstih naslaga, konkremenata i kamenca, što čitav proces patogeneze parodontitisa ponovo uvodi u novi komplikovaniji ciklus⁶⁷.

1.9. GINGIVALNA TEČNOST

Gingivalna tečnost (engl. *gingival crevicular fluid* - GCF) predstavlja transudat krvne plazme koji iz venula gingivalnog pleksusa dospeva u gingivalni sulkus. Njegova funkcija, osim ispiranja parodontalnih prostora, predstavlja i prenošenje krvnih komponenata kao što su neutrofilni leukociti, antitela, komponente komplementa¹⁷². Protok GCF se povećava tokom zapaljenja, a prikupljanje GCF predstavlja neinvazivnu kvantitativnu metodu koja ima značajnu dijagnostičku vrednost¹⁷³. Sakupljanje i analiza uzoraka gingivalne tečnosti može biti značajan pokazatelj za procenu lokalnog čelijskog metabolizma koji se odražava na kliničko parodontalno zdravlje pojedinca. Armitaž (*Armitage*) i saradnici su 2004. izdvojili preko 65 sastojaka GCF koji mogu biti potencijalni biomarkeri¹⁷⁴. Armitaž je biomarkere GCF u toku razvoja parodontitisa podelio u tri grupe:

- 1) enzimi poreklom od domaćina i njihovi inhibitori (MMP),
- 2) medijatori zapaljenja i modifikatori imunog odgovora (PGE₂, IL -1, TNF- α , TGF- β , RANK, RANKL),
- 3) produkti raspadanja tkiva- hidroksiprolin/kolagen fragmenti.

Takođe u biomarkere uključuju i nalaz specifičnih bakterija, njihovih produkata – isparljivih sumpornih jedinjenja i specifične proteaze, neutrofilne elastaze i alkalne fosfataze. Oni su u GCF direktno proporcionalni stepenu zapaljenja¹⁷⁵.

1.9.1. Faktor nekroze tumora- α (TNF- α)

Faktor nekroze tumora- α (engl. *tumor necrosis factor- α* –TNF- α) učestvuje u hemotaksi i migraciji ćelija zapaljenja. Pospješuje hemotaksu i adheziju neutrofilnih granulocita za zid krvnog suda i njihovu dijapedezu. TNF- α pozitivno utiče na produkciju IL-1 β i IL-6¹⁷⁶. Pored toga TNF- α učestvuje u razgradnji ekstracelularnog matriksa i resorpciji kosti i zbog potenciranja procesa koji dovode do povećanog lučenja MMP-a i RANKL-a¹⁷⁷. Takođe, učestvuje delom i u procesu formiranja kosti – dodatnim mehanizmima. U eksperimentalnoj studiji na miševima koji su imali deficit p55 gena za receptor za TNF- α pokazan je signifikantno manja ekspresija MMP i RANKL i njihova povećana rezistencija na parodontitis¹⁷⁷.

Odmah nakon produkcije pro-inflamatornih citokina započinje i sekrecija antiinflamatornih citokina: IL-4 i IL-10. Kao anti-inflamatorni citokin IL-4 utiče preko IF- γ na smanjenje produkcije IL-1 i 6 i TNF- α . Pored toga, inhibitorno deluje na MMP i RANKL, ali i sam intenzivira produkciju IL-10. IL-10 dodatno smanjuje inflamaciju suprimiranjem MMP-a, a indirektno i smanjenjem kapaciteta makrofaga da prezentuju antigene drugim ćelijama zapaljenja i uticajem na produkciju IF- γ i IL-17^{177, 178}.

1.9.2. Matriksne metaloproteinaze – MMP

Proteolitički enzimi domaćina, matriksne metaloproteinaze (engl. *matrix metalloproteinases* –MMP) pre svega učestvuju u fiziološkim procesima rasta i razvoja, zatim u procesu zarastanja i remodelovanja tkiva, ali i u procesima razgradnje ekstracelularne komponente vezivnog tkiva, bazalne membrane epitela i resorpcije kosti u toku parodontitisa⁶⁷. MMP čine porodicu od 23 enzima koji su strukturno srodni.

Nomenklatura ovih endopeptidaza zasniva se na specifičnosti njihove molekularne strukture i specifičnosti supstrata na koji deluju. Predložena je klasifikacija u 4 grupe:

1. intersticijalne kolagenaze (MMP -1, -8,-13),
2. želatinate (MMP - 2, - 9 i kolagenaza tipa IV),
3. stromalizini (MMP - 3, - 10, - 11) i
4. membranske matriksne metaloproteinaze (MMP - 14, - 15, - 16 i -17)

Prvobitno se ekspresija MMP usko vezivala za neutrofilne granulocite, ali se kasnije uvidelo da u njihovom procesu sinteze učestvuju i druge ćelije parodonticijuma, kao što su epitelne ćelije, gingivalni fibroblasti, endotelne ćelije, monociti/makrofagi, plazma ćelije, osteoblasti i osteoklasti¹⁶¹.

MMP se izlučuju neaktivne i aktiviraju se proteolizom. Ovo se postiže proteazama – poput katepsina G – koje proizvode neutrofili. MMP inhibiraju inhibitori proteinaze koji imaju antiinflamatorna svojstva.

Aktivnost MMP je strogo regulisana balansom između njihove sinteze i ekspresije njihovih inhibitora. Jasno je da su MMP udružene sa inflamacijom u toku parodontitisa¹⁷⁹. Ključni inhibitori MMP koji se nalaze u serumu uključuju glikoprotein α 1-antitripsin i α 2-makroglobulin, veliki protein plazme proizveden u jetri, koji može inaktivirati široku lepezu proteinaza. Inhibitori MMP koji se nalaze lokalno u tkivima nazivaju se tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMP), produkovani od različitih tipova ćelija. Iako je njihova glavna funkcija da inhibiraju matriksne metaloproteinaze, oni takođe regulišu njihov transport, stabilizaciju i lokalizaciju u ekstracelularnom matriksu. Klasifikovani su u 4 familije TIMP, od kojih najvažnija u parodontalnoj bolesti je TIMP-1⁶⁴.

Uticaj MMP na tok inflamacije je i dalje u žiži interesovanja naučnika. Pod uticajem bakterijskih proteinaza, drugih tkivnih proteinaza ili krajnjih produkata oksidativnog stresa može biti inicirana sinteza MMP posredstvom citokina kao što su TNF- α , IL-1, IL-6, ali i drugih matriksnih metaloproteinaza kroz kaskadu uzajamne aktivacije¹⁸⁰. Dinamičan proces njihove sinteze i razgradnje će u vezivnom tkivu izazvati razgradnju kolagena, fibronektina i proteoglikana.

Uprkos infektivnoj etiologiji, gubitak potpornih tkiva parodontijuma tokom parodontitisa smatra se krajnjom posledicom imunološkog odgovora domaćina. MMP se ubrajaju u jedne od glavnih regulatora zapaljenja, putem proteolize hemokina, faktora rasta, receptora i njihovih vezujućih proteina, proteaza, inhibitora proteaza, kao i intracelularnih multifunkcionalnih proteina, što rezultira pro ili antiinflamatornim funkcijama koje vode ili do homeostaze ili destrukcije tkiva¹⁴⁹.

Postojanje povratne sprege između citokina i hemokina i regulacije aktivnosti MMP-a pokazana je poslednjih godina. Povećane koncentracije citokina povećavaju MMP, a potom ih one povratno razgrađuju zbog njihovog proteinskog sastava. Učešće MMP u regulaciji imunog odgovora veće je nego što se prethodno procenjivalo. One su u parodontitisu sposobne da učestvuju u kaskadama unakrsne aktivacije i automatske aktivacije, kao i u regulaciji dostupnosti mnogih zapaljenskih signalnih molekula. Dvosmerna regulacija MMP-a sa nivoima citokina/hemokina strogo je kontrolisana i još uvek nedovoljno poznata¹⁸¹.

Jedna od najznačajnijih MMP je MMP-8, najzastupljenija kolagenaza u parodontalnom tkivu, GCF i pljuvački pacijenata obolelih od hroničnog parodontitisa⁶⁷. Ona je sekretovana mahom iz specijalnih sekundarnih granula neutrofila i kao glavni enzim dovodi do degradacije kolagena tip I i III¹⁸².

Pokazano je da se aktivnost kolagenaze povećava povećanjem težine zapaljenja, povećanjem dubine džepa i gubitkom alveolarne kosti¹⁸³. Čen i saradnici (*Chen HY*) su ustanovili povišen nivo aktivne neutrofilne kolagenaze u tečnosti gingive kod pacijenata sa parodontitisom¹⁸⁴.

1.9.3. Alkalna fosfataza (ALP)

Alkalna fosfataza (engl. *alkaline phosphatase* –ALP) je glikoprotein koji učestvuje u procesima očuvanja alveolarne kosti i periodontalnog ligamenta. U gingivalnoj tečnosti se ALP može verovatno naći kao posledica aktivnosti polimorfonuklearnih leukocita. Longitudinalne studije koje je realizovao Nakashima sa saradnicima su pokazale da je koncentracija ALP veća u regiji inflamirane gingive nego zdrave i do 20 puta. Aktivnost ALP je u korelaciji sa dubinom sondiranja parodontalnog ili gingivalnog džepa¹⁸⁵. Tako se nivo ALP u gingivalnoj tečnosti iz parodontalnih džepova može smatrati indikatorom uništavanja parodontalnog tkiva.

ALP osim neutrofilnih granulocita, i fibroblasti, osteoblasti, ali i bakterije unutar dentalnog plaka. Porast koncentracije ALP se može detektovati u stanjima izražene osteoplastne aktivnosti i remodelovanja koštanog tkiva. Stoga porast ALP nakon smirivanja inflamacije u parodonticijumu ne mora ukazivati na recidiv oboljenja. S druge strane, smanjenje količine plaka kao izvora mikroorganizama nije uvek u korelaciji sa smanjenjem koncentracije ALP u GCF. Udeo bakterijskog ALP u ovoj tečnosti je manje od 20%, pa ukupni nivo ALP tačnije odražava samo stanje parodonticijuma¹⁸⁶.

1.10. REZOLUCIJA INFLAMACIJE

Akutna inflamacija u parodonticijumu se javlja kao prva zaštitna reakcija lokalnog imunog odgovora na negativno dejstvo dentalnog plaka. Ukoliko ne dovode do eliminacije štetnih agenasa i rezolucije tkiva, ona prelazi postepeno u hronični oblik zapaljenja. Akutna inflamacija je fiziološki odgovor domaćina u vaskularizovanim tkivima, a sve u cilju odbrane domaćina i održavanje homeostaze. Zapravo je inflamacija ključni faktor za opstanak i očuvanje integriteta tkiva, organa i organizma i prva faza procesa zarastanja i regeneracije tkiva¹⁸⁷.

Nakon prelaska u hroničnu formu rezolucija tkiva postaje sve manje izvesna, a zarastanje se odvija u smeru reparacije, tj. zamene funkcionalnog tkiva fibroznom tkivom. Polimorfonuklearne ćelije, pre svega neutrofili i makrofazi, bivaju zamenjeni limfocitima, mastocitima (tkivnim makrofazima), koji učestvuju u aktivaciji fibroblasta, a uz konstantnu destrukciju kolagenih vlakana i resorpciju kosti. Ožiljci i fibrozno tkivo su osnovni razlog nemogućnosti povratka homeostaze u parodontitisu.

Očigledno je da razrešenje zapaljenja predstavlja aktivni proces koji je regulisan posebnim mehanizmima koji obnavljaju homeostazu¹⁵⁰.

1.11. REGENERACIJA

Regeneracija parodontalnog tkiva je još uvek nedovoljno istražena, zbog čega su rezultati različitih terapijskih postupaka često nedovoljno kontrolisani i nepredvidivi. Prema definiciji, uspešna regeneracija parodontalnog tkiva podrazumeva uspešnu regeneraciju periodontalnog ligamenta zajedno sa cementom korena zuba sa jedne strane i prave alveolarne kosti sa druge strane uz tačno definisanu vremensku i prostornu distribuciju¹⁸⁸.

Regeneracija započinje istovremeno sa inflamacijom tkiva. Migraciju određenih ćelija na mesto defekta smenjuje njihova proliferacija i produkcija komponenata ekstracelularnog matriksa, kako bi se formirala trodimenzionalna strukturna matrica kao osnova za dalju regeneraciju tkiva i povratak homeostaze. Ovi procesi su koordinirani mnoštvom solubilnih medijatora i faktora rasta, različitim tipovima ćelija i brojnim unakrsnim interakcijama komponenata ekstracelularnog matriksa. Nakon formiranja odgovarajućih stabilnih prostornih uslova, angiogeni signali i nove vaskularne mreže pružaju nutritivnu potporu za dalji rast i obnovu tkiva usmereni ka postizanju homeostaze. Jenom formirani koštani i cementni matriks dovodi do organizacije kolagenih fibrila periodontalnog ligamenta u tačno usmerene snopove vlakana koji povezuju zub i alveolarnu kost.

Zbog složenosti procesa regeneracije parodonticijuma, neophodne su kompleksne strategije za kontrolu imunog odgovora domaćina i polimikrobne infekcije.

Savremene regenerativne terapijske procedure možemo podeliti prema postupku delovanja na proces regeneracije tkiva:

- Pasivna regeneracija tkiva
 - Aktivna regeneracija tkiva.
- Pasivna regeneracija tkiva obuhvata terapijske postupke koji ne utiču direktno na proces regeneracije, već samo obezbeđuju povoljne uslove za njeno odvijanje. Ovaj koncept podrazumeva primenu:
 - koštanih transplantata-matriksa
 - usmerene tkivne regeneracije (engl. guided tissue regeneration -GTR).
 Najčešće pasivna regeneracija tkiva obuhvata primenu koštanog transplantata autogenog porekla (intraoralnog ili ekstraoralnog), alogenog porekla (engl. *freeze-dried bone allograft* – FDBA i *decalcified freeze-dried bone allograft* – DFDBA), aloplastične koštane transplantate (hidroksiapatit – HA, beta-trikalcijum-fosfat – β -TCP), polimere i bioaktivna stakla ili koštane implantate, najčešće govedeg porekla. Svi oni, osim biokompatibilnosti, moraju posedovati i odgovarajuće fizičke osobine u smislu veličine i oblika defekta tkiva, kao i povoljnog matriksa za migraciju, proliferaciju ćelija i njihovu međusobnu komunikaciju u toku procesa regeneracije tkiva. Neki od njih imaju osteokonduktivne ili osteoinduktivne osobine, a neki i osteogeni potencijal¹⁸⁹. Sprečavajući migraciju epitelnih ćelija i ćelija granulacionog tkiva u prostor parodontalnog defekta, stvaraju se optimalni uslovi za njegovu repopulaciju ćelijama koštanog tkiva, periodontalnog

ligamenta i omogućava obnova celularnog cementa. Ovo podrazumeva primenu usmerene tkivne regeneracije semipermeabilnim membranama sa mogućnošću integracije u okolna tkiva ili bez ove mogućnosti.

- ❖ Aktivna regeneracija tkiva predstavlja direktan uticaj na tok regeneracije, koji je poslednjih decenija sve više zastupljen u kliničkoj praksi. Obuhvata primenu:
 - Biomimetike
 - Tkivnog inženjeringa.

- Koncept biomimetike (biomimikrije)

Aktivna regeneracija tkiva primenom koncepta biomimetike ili biomimikrije zasnovana je na mimikriji, oponašanju prirodnih procesa koji se odigravaju u toku razvoja tkiva. Ovo podrazumeva primenu proteina ekstracelularnog matriksa koji aktivno utiču na regeneraciju tkiva i stimulišu zarastanje parodontalne rane.

- Primena proteina/peptida

Trenutno je možda najzastupljenija upotreba komercijalno dostupnih proteina/peptida: protein rasta gleđi (Straumann® Emdogain™) ili rekombinantni faktor rasta poreklom iz trombocita (engl. *recombinant human platelet-derived growth factor-BB* (rhPDGF-BB)) dopunjeno konceptom pasivne regeneracije, tj. u kombinaciji sa beta tri kalcijum fosfatom (β -TCP).

Njihovo dejstvo se prepoznaje u pozitivnom uticaju na hemotaksu, ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju, angiogenezu i sintezu komponenata ekstracelularnog matriksa.

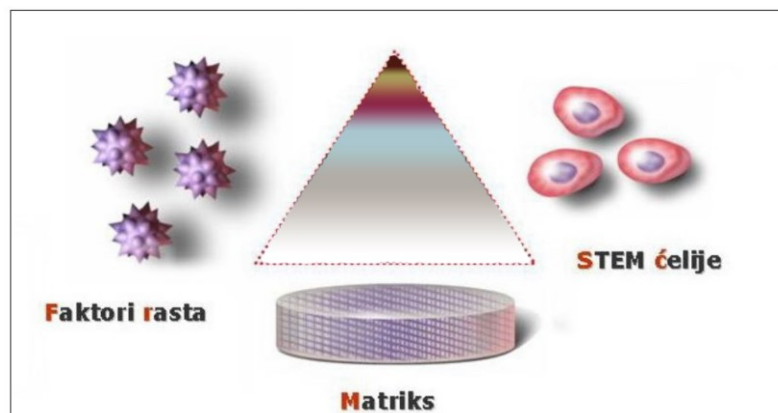
Protein rasta gleđi poreklom je iz ćelija Hertvigove epitelne membrane. U toku razvoja korena zuba na površini dentina se nalaze ove ćelije, koje luče depozite proteina rasta gleđi (PRG), uglavnom sačinjene od amelogenina (90%), amelina, enamelina i proteaza. Dokazan je stimulatorni efekat PRG-a na stvaranje i regeneraciju celularnog cementa¹⁹⁰. Pretpostavlja se da je ovo omogućeno njegovim delovanjem na nediferentovane progenitorne ćelije periodontalnog ligamenta. Na taj način su stvoreni uslovi za inkorporiranje završetaka kolagenih vlakana periodoncijuma u cement korena zuba i podsticanje regeneracije kosti, a istovremeno inhibiranje proliferacije sulkusnog epitela u apikalnom smeru duž korena zuba^{191, 192}. Ovakav proces u potpunosti imitira sam razvoj potpornog aparata zuba¹⁹³.

- Koncept tkivnog inženjeringa

Aktivna regeneracija tkiva primenom koncepta tkivnog inženjeringa podrazumeva primenu osnovne „trijade“:

1. tkivni matriks kao potpora u *in vivo* ili *in vitro* uslovima za:
2. progenitorne ćelije i
3. faktore rasta.

Odvijanje aktivne regeneracije parodontalnih tkiva primenom tkivnog inženjeringa je moguće uz pomoć faktora rasta, matičnih ćelija, genske terapije ili trombocitnih koncentrata.



Slika 1.3.- „Trijada tkivnog inženjeringa
(preuzeto iz udžbenika *Klinička prodontologija*, B. Dimitrijević i sar. i modifikovano)

Faktori rasta označavaju grupu proteina koji imaju sposobnost kako stimulisanja ćelijskog rasta, tako i ćelijske diferencijacije i proliferacije. Kao signalni molekuli oni regulišu različite intracelularne procese po tipu hormonskog regulatornog signala, tj. vezivanjem za specifične receptore na površini ciljane ćelije¹⁹⁴.

Brojni faktori rasta predstavljaju superfamilije strukturno i evolutivno povezanih proteina:

- PDGF: stimuliše sintezu kolagenaze, fibronektina i hijaluronske kiseline;
- TGF: ubrzava angiogenezu i produkciju kolagena;
- VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*): indukuje angiogenezu u uslovima hipoksije tkiva;
- EGF (engl. *epidermal growth factor*): stimuliše proliferaciju keratinocita i fibroblasta;
- FGF: ubrzava angiogenezu, produkciju granulacionog tkiva i eptelizaciju;
- TGF- β : ima ulogu u formiranju granulacionog tkiva, remodelaciji ekstracelularnog matriksa, angiogenezi, diferencijaciji nediferenciranih ćelija u fibroblaste, hondroblaste i osteoblaste;
- IGF: ima uticaj na koštanu homeostazu, podiže aktivnost alkalne fosfataze, podstiče sintezu koštanog matriksa.

Svaka od ovih familija sastoji se od više različitih članova.

Trombocitni faktor rasta - PDGF

Trombocitni faktor rasta – PGDF je familija faktora rasta koja se može podeliti na 5 različitih disulfidnih dimera: PGDF-AA, PGDF-AB, PGDF-BB, PGDF-CC i PGDF-DD. PGDF AB i BB imaju sistemsku ulogu u rastu i razvoju organizma, dok PGDF AA deluje kao lokalni faktor rasta u kosti. Pokazalo se da je PDGF-AA prvi faktor rasta prisutan u rani i ključni posrednik u procesu zarastanja defekta kako mekog, tako i koštanog tkiva¹⁹⁵. Ovaj glikoprotein se oslobađa iz α -granula trombocita, ali ga sintetišu i makrofagi i endotelne ćelije¹⁹⁶. Dok neutrofilu učestvuju u eliminaciji bakterija i štetnih noksi, makrofagi učestvuju u procesu zarastanja lučenjem faktora rasta i aktivacijom fibroblasta. Tako je koncentracija PDGF-a u početku najviša i ima svoj pik trećeg dana¹⁹⁷. Potom sa smanjenjem stepena degranulacije trombocita, opada i koncentracija ovog faktora, ali je neosporno njegovo prisustvo tokom čitavog procesa regeneracije tkiva. PDGF ima uticaj na proliferaciju matičnih ćelija, modulaciju aktivnosti drugih faktora rasta, potenciranje angiogeneze i diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste odgovorne za kontrakciju koagulumu. Značajna uloga PDGF-a je u pokretanju regeneracije koštanog tkiva pozitivnim uticajem na sintezu matriksa, proliferaciju osteoblasta i na kraju na sastav i biomehanička svojstva novog koštanog tkiva¹⁹⁸.

Fibroblastni faktor rasta-FGF

Fibroblastni faktor rasta-FGF čini familija od 22 faktora rasta koji su uključeni u proces embriogeneze, razvoj čitavog organizma i njegove neurološke funkcije, proces zarastanja rana i angiogeneze¹⁹⁹. FGF produkuju fibroblasti, endotelne ćelije i ćelije glatke muskulature, keratinociti, mastociti i hondrociti. U *in vitro* i *in vivo* uslovima je pokazano da FGF učestvuje u ranom aktiviranju makrofaga, povećanju komponenti ECM, diferenciranju i proliferaciji neuroektodermalnih derivata, angiogenezi i epitelizaciji rane²⁰⁰.

Izdvajaju se dve izoforme: kiseli fibroblastni faktor rasta (aFGF-1) i bazni fibroblastni faktor rasta (bFGF-2). bFGF-2 je naročito zastupljen u prvim fazama u fluidu rane. U randomizovanom ispitivanju pokazano je da FGF-2 poboljšava spajanje kosti²⁰¹. U pogledu regeneracije parodontijuma, nakon sprovedene hirurške terapije parodontitisa, pokazalo se da bFGF-2 značajno utiče na procenat regeneracije koštanog tkiva nakon 36 nedelja²⁰². Rekombinantni FGF-2 se koristi za stimulaciju proliferacije prekursora pulpnih ćelija, ćelija periodoncijuma, mezenhimnih ćelija, fibroblasta i preosteoblasta²⁰¹.

Faktor rasta sličan insulinu – IGF

Faktor rasta sličan insulinu – IGF je polipeptid sa aminokiselinskom sekvencom sličnom insulinu. Ova klasa faktora rasta, klasifikovana na IGF-I i IGF-II ima značajnu ulogu u procesima održanja homeostaze koštanog tkiva²⁰³. Prvi podstiče sintezu kolagenih i nekolagenih proteina uključenih u stvaranje koštanog matriksa, dok drugi ima osim efekata na fibroblaste i osteoblaste, utiče i na progenitore osteoklasta. Obe klase ovog faktora utiču na sintezu osteokalcina i oba podstiču aktivnost alkalne fosfataze. IGF-I deluje na migraciju prekursora osteoblasta, a IGF-II svoj efekat ostvaruje preko indukcije deobe osteoblasta²⁰⁴.

Pokazano je dalje da rhGDF-5 (engl. *recombinant human growth/differentiation factor-5*) promoviše proliferaciju ćelija poreklom iz parodontalnog tkiva, uključujući cementoblaste, fibroblaste i osteoblaste²⁰⁵. Takođe, ima hemotaktično dejstvo na progenitore osteoblasta i ubrzava diferencijaciju osteoblasta. Predkliničke studije na psima i nižim primatima su pokazale da je lečenje rhGDF-5 rezultiralo regeneracijom alveolarne kosti, formiranjem cementa i periodontalnog ligamenta. U nedavnoj studiji na ljudima, rhGDF-5 isporučen u b-TCP nosaču rezultirao je izraženim smanjenjem dubine sondiranja i povećanjem nivoa pripojnog epitela, a regeneracija je potvrđena i histološkom analizom²⁰⁵.

Primena različitih proteina, pre svega faktora rasta, nameće se u regenerativnim terapijama zbog njihovih brojnih bioloških efekata. Ipak, moraju se prevazići problemi vezani za otpuštanje optimalnih kliničkih doza ovih proteina s obzirom da su one po pravilu u prvih 24 sata nakon aplikacije daleko iznad fizioloških. Takve doze mogu povećati mogućnost nastanka lokalnih i sistemskih neželjenih efekata. Stoga tehnologija treba da se razvija u pravcu pronalaženja pogodnih nosilaca ovih proteina koji bi kontinuirano otpuštali mnogo manje količine tokom dužeg vremenskog perioda, a koje bi i dalje postizale željene terapijske efekte. Takođe, jedan od problema je i visoka cena njihove proizvodnje²⁰⁶.

1.12. KONCENTRATI TROMBOCITA

Savremena stomatologija se sve više razvija u pravcu upotrebe različitih terapijskih procedura za ubrzanje regeneracije tkiva^{207, 208}. Veliki napor je usmeren ka upotrebi bioloških sredstava kao ključnih medijatora regeneracije tkiva. Neki od nedostataka upotrebe rekombinantnih faktora rasta uključuju upotrebu visokih (supra-fizioloških) doza ovih faktora, kao i visoke materijalne troškove²⁰⁹. Ipak, pojedini faktori rasta su našli široku primenu u mnogim kliničkim procedurama u stomatologiji i medicini, kao što je na primer rekombinantni faktor rasta dibijen iz trombocita (rPDGF), zbog svog pozitivnog uticaja na regeneraciju tkiva²¹⁰.

Sredinom prošlog veka pojavljuju se različiti preparati koji osim zaustavljanja krvarenja, mogu da učestvuju i u brznoj obnovi tkiva. U početku, prvo su se u oblasti transfuziologije razvijali različiti koncentracije trombocita, koji su se koristili u terapiji prevencije krvarenja u stanjima i oboljenjima praćenim trombocitopenijom (obilna krvarenja prilikom većih trauma ili dugotrajnih hirurških zahvata, medularna aplazija ili akutna leukemija).

1.12.1. Fibrinski lepak (*fibrin glue*)

Sedamdesetih godina prošlog veka u nekim regenerativnim procedurama u stomatologiji i medicini uveden je poseban preparat nazvan fibrinski lepak, koji kasnije dobija svoju širu upotrebu. U njegovom sastavu u povećanoj koncentraciji nalazi se nekoliko ključnih faktora rasta, među kojima je i PDGF, koji značajno menjaju tok zarastanja tkiva ²¹¹.

Fibrinski lepak je biološki adheziv, čiji efekat imitira završne faze fiziološke koagulacije biostimulacijom koja pospešuje formiranje novog tkivnog matriksa ²¹². Fibrinski lepak se sastoji iz dve komponente koje se nalaze u odvojenim bočicama: koncentrat proteina koji su uključeni u procesu zgrušavanja krvi, suvo smrznuti fibrinogen, faktor XIII i fibronektin - (zaptivač) i suvo smrznuti trombin i kalcijum hlorid-(katalizator). Upotrebom fibrinskog lepka se dobija ugrušak koji potpomaže hemostazu i zarastanje rane, a potpuno se apsorbuje bez pojave reakcije tkiva na strano telo ili pojave opsežne fibroze. Indikacije za primenu fibrinskog lepka su bile brojne u području kardiovaskularne hirurgije, otorinolaringologije i neurohirurgije, zbog njegove efikasne prevencije lokalnih hemoragijskih komplikacija ²¹².

Tokom godina fokus istraživanja usmerio se ka faktorima rasta poreklom iz ćelija krvi ili krvne plazme, a pogotovo onima koji ostaju zarobljeni u fibrinskoj mreži. Upotreba autologih koncentrata trombocita pokazalo se da isto kao i upotreba rekombinantnih faktora rasta pomaže regeneraciju tkiva ²¹³.

Danas fibrinski lepkovi poreklom iz humane plazme imaju vrlo široku primenu. Autologni fibrinski lepkovi su najbolji izbor sa stanovišta izbegavanja rizika transmisije krvno prenosivih bolesti, ali je njihova upotreba ograničena zbog veoma kompleksnog i skupog procesa proizvodnje ²¹². Ovi lepkovi predstavljali su jedno od prvih pomoćnih bioloških sredstava razvijenih u modernoj eri hirurgije. Kasnije je došlo do razvoja novih koncentrata krvi, kao što su „mešavine trombocit-fibrinogen-trombin“ ili „želatinozna trombocitna gel-pena“. Ovi koncentri su obogaćeni određenom količinom zarobljenih trombocita u fibrinskoj mreži, koji imaju pozitivni uticaj na pojedine faze koagulacije i ojačanje samog fibrinskog gela ²¹².

Trombociti su anukleusne, bikonveksne ćelije krvi, prečnika 2-4 μ m, čiji broj kod ljudi najčešće varira od 150 do 290 x 10⁹/L krvi. U procesu hematopoeze, nastaju fragmentacijom citoplazme megakariocita i njihov životni vek u cirkulaciji traje 7-10 dana. Sadrže brojne proteinske filamente (aktin, miozin i trombostenin), ćelijske organele (endoplazmatksi retikulum, Goldžijev kompleks i mitohondrije) i mnoštvo granula koje su klasifikovane u tri grupe.

Najbrojnije su α -granule koje sadrže mnoštvo medijatora i ključnih faktora rasta, kao što su PDGF, TGF, VEGF, EGF ²¹⁴.

Trombocitni preparati korišćeni su u početku samo kao tkivni adhezivi tj. pružali su potporu polimerizaciji fibrina i tako podsticali efikasnije zatvaranje rane. Brojni koncentri trombocita u upotrebi su i u današnjoj kliničkoj praksi, naročito u oblasti ortopedije, sportske medicine, plastične hirurgije, maksilofacijalne i oralne hirurgije, a primenjuju se i tokom lečenja oboljenja parodonticijuma ²¹⁵.

Osnovna ideja koja spaja ovu heterogenu grupu preparata je da se centrifugiranjem krvi ekstrahiraju svi elementi koji će pospešiti proces zarastanja i tkivne regeneracije. Normalan krvni ugrušak sadrži blizu 95% eritrocita, oko 5% trombocita i manje od 1% leukocita, i mnoštvo fibrinskih niti²¹².

Izraz „plazma bogata trombocitima” (*platelet-rich plasma* – PRP) prvi je koristio Kingzli (*Kingsly*) 1954. godine u studijama koje su se bavile koagulacijom krvi²¹⁶. Lokalna klinička, upotreba ovih preparata počinje u godinama nakon prve Matrasove publikacije o fibrinskim lepkovima, pod nazivom „trombocitno-fibrinogen-trombinske mešavine.

Prvi kliničar koji je pokazao da koncentracije trombocita promovišu zarastanje rane je Najton (*Knighon*), 1986. godine. On je koristio naziv „faktori zarastanja rana izvedeni iz trombocita” (engl. *platelet-derived wound healing factors* – PDWHF) za preparat koji se dobijao postupkom dvostrukog centrifugiranja²¹⁰.

Upotrebu koncentrata trombocita sa ciljem stimulacije zarastanja i zamene fibrinskog lepka, u oblasti oralne i maksilofacijalne hirurgije, prvi je opisao Vitman (*Whitman*) sa saradnicima²¹⁷.

1.12.2. Plazma bogata trombocitima (PRP)

Do 1998. godine, razvoj trombocitnih preparata išao je prilično sporo, dok Marx sa saradnicima nije objavio svoj rad na temu preparata koji naziva „plazma bogata trombocitima – PRP” (engl. *platelet rich plasma*). Tada kreće eksplozija radova u literaturi i razvoja potpuno različitih metodologija i preparata, koji se svi označavaju istim imenom¹¹. Iz komercijalnih razloga neke kompanije daju drugačija imena svojim preparatima, iako po sastavu i biološkim karakteristikama, odgovaraju već postojećim.²¹⁸ Kompanija Endoret, Victoria, Biotechnology Institute iz Španije, po metodologiji Anitue i saradnika, 1999. godine izbacuje protokol za izradu plazme bogata faktorima rasta – PRGF-a (engl. *plasma/preparation rich in growth factors*) koji se, uz manje izmene, i danas koristi. Iste godine firma Alleroed iz Danske, pod komercijalnim imenom Vivostat PRF, promovise tehniku za izradu preparata koji je po sastavu identičan PRP preparatu²¹⁸.

PRP

Plazma bogata trombocitima (PRP) je dobijena iz pune krvi pacijenta centrifugiranjem i dodavanjem antikoagulantnog sredstva (do suprafizioloških koncentracija faktora rasta iz trombocita)²¹³.

Normalan broj trombocita u krvi prosečno je oko $2 \times 10^5 / \mu\text{l}$, dok je u PRP preparatu oko $1 \times 10^6 / \mu\text{l}$. PRP je autologni izvor faktora rasta koji kontroliše zarastanje rane i može imati aktivnu ulogu u

regeneraciji parodontijuma. Dobija se iz 35-50ml krvi (Curasan, PharmaGmbH AG, Germany), a njenim centrifugiranjem i separacijom ćelijskih elementa, stvara se 300 do 400% više trombocita u odnosu na punu krv²¹⁹.

Upotreba PRP-a je našla svoje mesto u savremenim granama stomatologije i medicine kao što su oralnohirurške, maksilofacijalne i parodontološke, u različitim postupcima ubrzanja zarastanja mekih i koštanih tkiva orofacijalne regije. Neki radovi pokazuju značajne prednosti prilikom koršćenja samog koncentrata, dok drugi potvrđuju njegov pozitivni efekat u kombinaciji sa različitim biomaterijalima, kao što su koštani transplantati ili kolagene membrane²²⁰. Jedan od prijavljenih nedostataka PRP je negativan uticaj antikoagulantnog sredstva na fiziloške procese regeneracije ili reparacije tkiva PRP²¹³.

Razvoj tehnologije proizvodnje PRP preparata je pružio odlične preliminarne rezultate u oftalmologiji, neurohirurgiji i opštoj hirurgiji. Sve do 1997. godine, kada su objavljeni radovi Vitman-a (*Whitman*) i Mark-a (*Mark*) i saradnika u oralnoj i maksilofacijalnoj hirurgiji, dolazi do razvoja novih proizvoda koji su se različito označavali, a zapravo konceptualno i fundamentalno bili slični²¹⁷. Krajem dvadesetog veka su tako svi oni nazvani PRP, bez razmatranja njihovog sadržaja ili arhitekture i ovaj nedostatak terminologije je trajao mnogo godina.

Prateći brojne studije koje su istraživale PRP, javila se potreba za unapređenjem koncentrata trombocita izvedenih iz pune krvi bez upotrebe antkoagulanata^{9, 221}.

U Francuskoj je početkom 21.-og veka razvijen drugi oblik koncentrata trombocita i nazvan fibrin bogat trombocitima (PRF), zbog jake polimerizacije fibrinskog gela u preparatu i specifične stukture fibrinske mreže koja obezbeđuje postepeno oslobađanje faktora rasta^{14, 222}. Ova tehnika je bila tako očigledno različita od drugih PRP preparata, da je odmah bila nazvana "druga generacija" koncentrata trombocita⁶.

PRP je frakcija krvne plazme koja za aplikovanje u parodontalnu ranu zahteva primenu nosača, dok PRF sam po sebi predstavlja autogenu biomembranu. Nedavna istraživanja su pokazala da se u prvim trenucima nakon aplikacije PRP u tretiranu regiju dolazi do otpuštanja signifikantno veće koncentracije faktora rasta u odnosu na PRF i druge njegove forme (A-PRF). Međutim, značajno je da se faktori rasta poreklom iz PRF detektuje otpuštanje i nakon 10 dana, što značajno doprinosi procesu regeneracije²²³.

Janković sa saradnicima i Aleksić sa saradnicima su pokazali da primena plazme bogate trombocitima zajedno sa transplantatom vezivnog tkiva u toku hirurške terapije recesija gingive, može dovesti do njihovog statistički značajno smanjenja^{16, 224}.

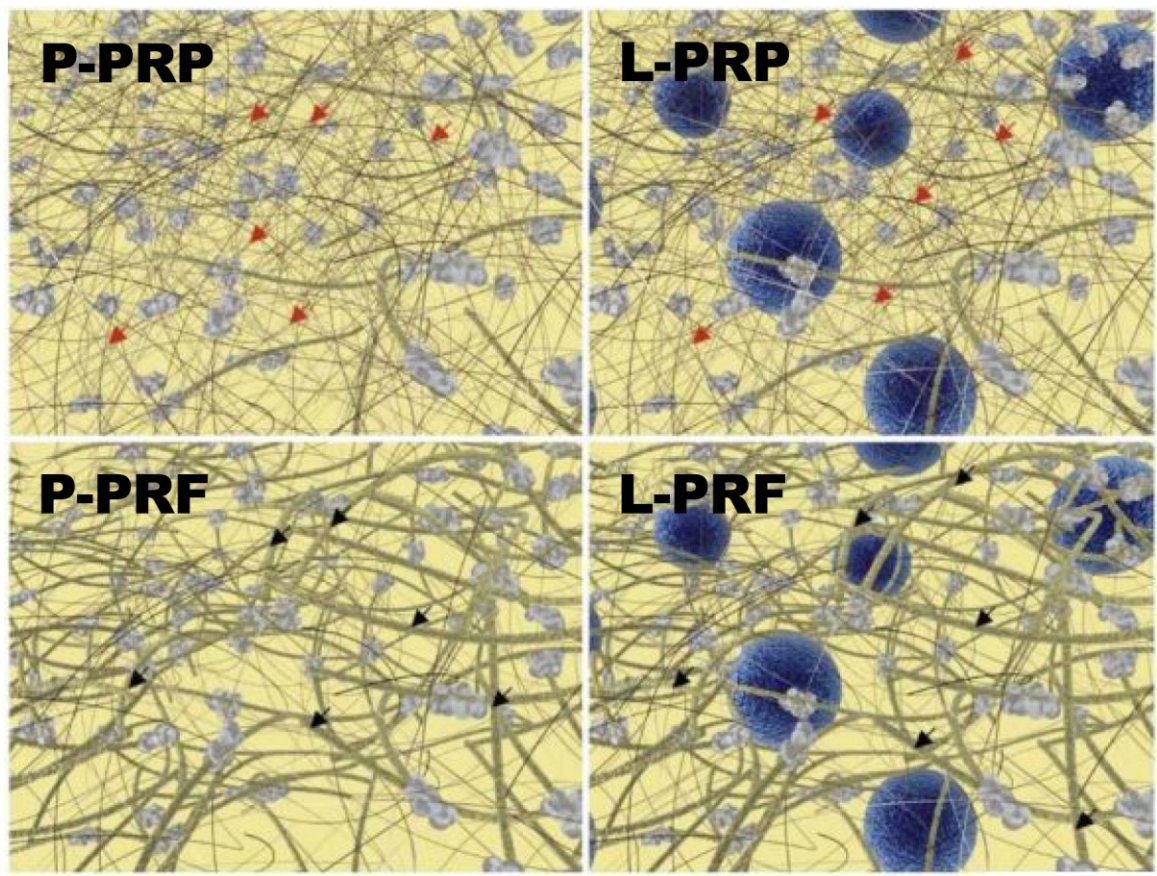
1.12.3. Fibrin bogat trombocitima (PRF)

Fibrin bogat trombocitima (PRF), je trombocitni koncentrat druge generacije ¹². Kompleksna trodimenzionalna struktura fibrinske mreže pokazuje bolje mehaničke osobine od drugih koncentrata trombocita zbog mogućnosti zadržavanja gotovo svih trombocita i faktora rasta u PRF ugrušku ⁹. Do danas, dragoceni efekti PRF-a pokazani su u različitim regenerativnim procedurama mekih i koštanih tkiva, kao što je augmentacija viličnog sinusa, augmentacija grebena nakon vađenja zuba, plastična hirurgija lica, takođe i kao dodatak regenerativnoj hirurškoj terapiji parodontalnog tkiva u toku zbrinjavanja infrakoštanih defekata (IBD) i furkacionih defekata ^{14, 225, 226}.

Klasifikacija koncentrata trombocita

Dohan i sar. su 2009. godine klasifikovali dotadašnje koncentrate trombocita, i u zavisnosti od primene tehnoloških postupaka, sadržaja fibrina i leukocita izdvojili, su 4 kategorije:

- 1) čista plazma bogata trombocitima (P-PRP),
- 2) plazma bogata leukocitima i trombocitima (L-PRP),
- 3) čisti fibrin bogat trombocitima (P-PRF),
- 4) fibrin bogat leukocitima i trombocitima (L-PRF) ¹⁰.



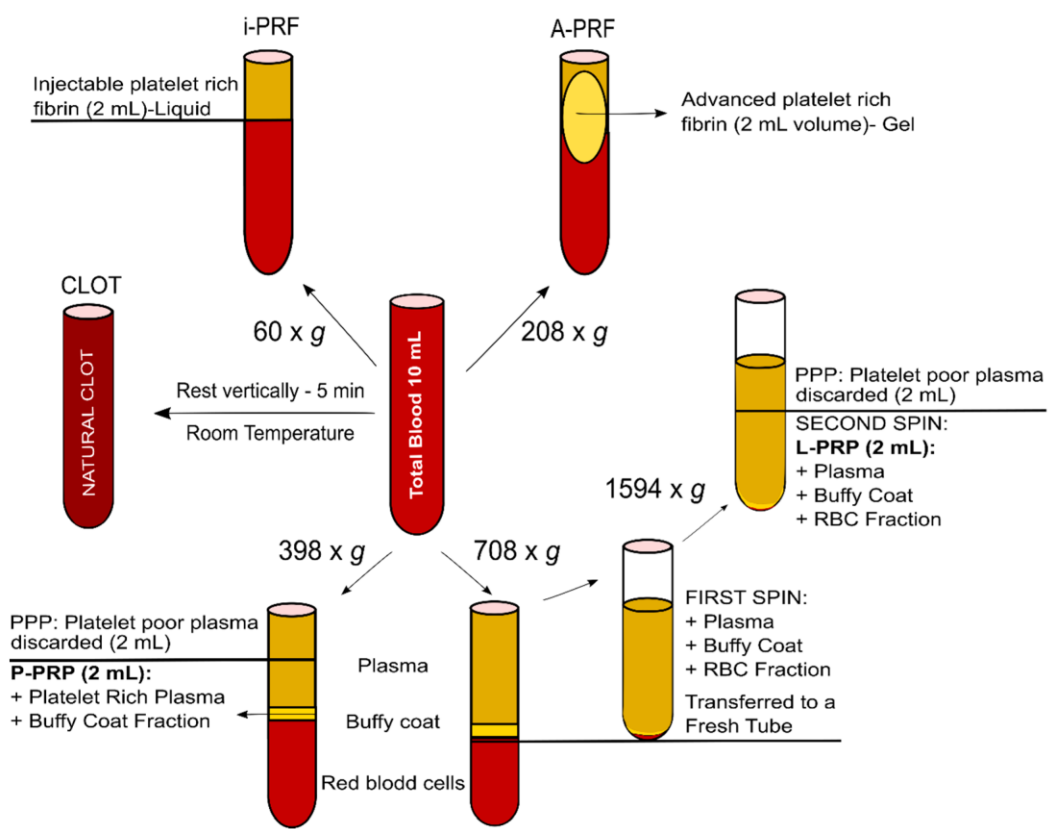
1.4. Šematski prikaz ćelija inkorporiranih u fibrinski matriks, četiri vrste koncentrata trombocita. Uočava se fibrinski matriks PRF preparata veće gustine (svetlo smeđa vlakna) i veća koncentracija leukocita (ljubičaste ćelije) u preparatima L-forme. (preuzeto iz rada Dohan i sar.¹⁰ i modificovano)

1. Čista plazma bogata trombocitima (P-PRP) – je preparat koji nakon aktivacije sadrži osim trombocita i nisku koncentraciju leukocita u fibrinskoj mreži male gustine. Prema definiciji, svi proizvodi ove porodice mogu se koristiti kao tečni rastvori ili u aktiviranom obliku – obliku gela. Otežavajuća je sama tehnika pripreme i potreba za većim brojem pipetiranja²²⁷.

2. Leukocitima i trombocitima bogata plazma (L-PRP) je preparat koji se posle aktivacije karakteriše i sa leukocitima i sa fibrinskom mrežom niske gustine. Po definiciji, kao što je P-PRP, svi proizvodi ove porodice mogu da se koriste kao tečni rastvori ili u aktiviranom obliku gela²²⁸.

3. Čisti fibrin bogat trombocitima (P-PRF) ili leukocit-siromašni fibrin bogat trombocitima - su preparati bez leukocita i sa mrežom fibrina visoke gustine. Zbog svoje konzistencije gela u aktiviranom obliku, ne mogu se ubrizgavati ili koristiti kao tradicionalni fibrinski lepkovi. Preparati iz ove kategorije se takođe dobijaju dvostrukim centrifugiranjem. Za prvo centrifugiranje koriste se epruvete sa dodatim antikoagulansom i gelom za separaciju. Gornja dva sloja se nakon prvog ciklusa centrifuge odvajaju pipetiranjem i prebacuju u epruvete sa kalcijum-hloridom, u čijem prisustvu se obavlja drugo centrifugiranje. Nakon završetka drugog ciklusa, lako se odvaja stabilni PRF ugrušak. Protokol je sličan Anituinom PRGF protokolu, ali je finalni produkt gušći i stabilniji. Visoka cena ga čini neprivlačnim za svakodnevnu kliničku primenu²²⁹.

4. Leukocitima i trombocitima bogati fibrin (L-PRF) predstavlja preparat bogate i leukocitima i fibrinskom mrežom visoke gustine. Po definiciji, ovi proizvodi postoje samo u jako aktiviranom obliku gela i ne mogu se ubrizgavati ili koristiti kao tradicionalni fibrinski lepkovi²³⁰.



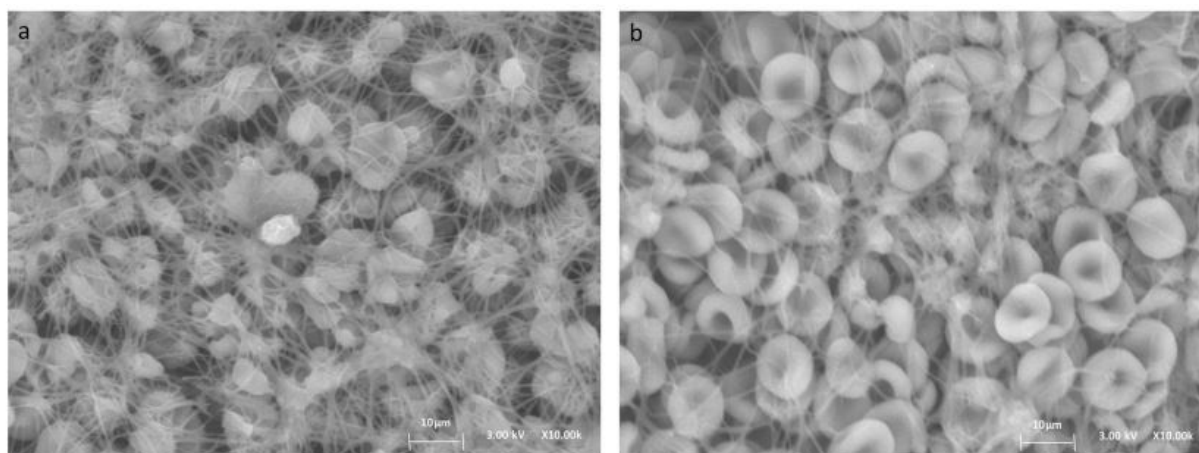
Slika 1.4. – Šematski prikaz različitih vrsta koncentrata trombocita u zavisnosti od protokola centrifugiranja

(preuzeto: https://www.mdpi.com/ijms/ijms-20-06243/article_deploy/html/images/ijms-20-06243-g008.png)

1.12.4. Injektabilni fibrin bogat trombocitima (i-PRF)

Injektabilni fibrin bogat trombocitima (engl. *injectable platelet rich fibrin* – i-PRF) je posebna, tečna forma PRF razvijena 2014.godine²³¹. Zbog mogućnosti aplikacije u injekcionom obliku nosi prefiks injektabilni. Prema savremenim konceptima koncentrat krvi koji se dobija pri manjem broju obrtaja poseduje veću količinu leukocita, trombocita i poseduje kompleksniju fibrinsku mrežu, koja nije guste strukture. Smanjenje centrifugalne sile je određeno na samo 60g, a protokol centrifugiranja traje samo 3 minuta. Za razliku od L-PRF-a koji se centrifugira 12minuta na 2700 obrtaja (708g –g-sila) i A-PRFA-a koji se centrifugira 14 minuta na 1300 obrtaja (200g sila po jedinici površine) i 8 minuta sa 1300 obrtaja za A-PRF+, ovaj protokol za i-PRF od 700 obrtaja u trajanju od 3 minuta donosi brojne prednosti. U svom tečnom obliku nakon centrifugiranja može ostati i do 15 min. Protokol pripreme podrazumeva protokol bez dodavanja antikoagulantnog sredstva koje može usporavati proces zarastanja rane.

Trombociti u svojim alfa granulama (α -granule) sadrže preko 30 različitih faktora rasta²³². Fibrinska mreža se odlikuje fibrinskim vlaknima koja su manja od 100 nm i svojom kompleksnom tetragonalnom mrežom obezbeđuju povoljne uslove za formiranje matrice u kojoj mogu opstati trombociti i leukociti, kao i svi eksprimirani faktori rasta i medijatori zapaljenja u dužem vremenskom periodu. Njene povoljne biomehaničke osobine i elastičnost omogućavaju laku manipulaciju i aplikaciju²³³. Fibrinska mreža je mnogo gušća u i-PRF ugrušku nego u ugrušku krvi kada se posmatra pod SEM, pošto u i-PRF fibrinska vlakna potiču iz čitave plazme i fibronektina trombocita, dok se u krvnom ugrušku on oslobađa samo iz trombocita²³⁴.



Slika 1.5. SEM prikaz i-PRF-a (a) i krvi (b); (a) trodimenzionalna struktura fibrinskog matriksa i trombocita, leukocita i eritrocita - (b) izrazito tanja fibrinska vlakna krvi u odnosu na i-PRF (preuzeto, izvor: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00784-018-2555-2>)

Zabeleženo je da koncentracije faktora rasta u i-PRF-u imaju veće vrednosti nego one koje se mogu dobiti u PRP-u, a koje su 6-8 puta veće nego u krvi. Prvenstveno se odnosi na PDGF, VEGF i TGF- β 1²³⁵. Ovo indukuje veću migraciju fibroblasta, angiogenezu i uspešniju regeneraciju kosti. U prva 24 sata ovaj fibrinski koncentrat može indukovati i do 300% veću migraciju fibroblasta na mesto povrede. Isto tako, on utiče na proliferaciju fibroblasta i na iRNK ekspresiju novih faktora rasta poreklom iz fibroblasta parodontijuma. U *in vitro* uslovima u kulturi tkiva, broj fibroblasta povećava se nakon 3 i nakon 5 dana²³⁶. Ekspresija kolagena-I je veća nakon 10 dana u ugrušku i-PRF-a nego krvnom ugrušku.

Uz ove faktore, postoji i veća koncentracija i FGF, IGF-1 i EGF i epidermalnog faktora rasta dobijen iz trombocita (PDEGF). Na taj način je osigurano bolje okruženje za regeneraciju i saniranje povrede²³⁷.

Neki autori su pokazali da PDGF-BB, najpotentniji izomer PDGF-a, iz PRF-a ima sposobnost da stimuliše prijanjanje matičnih ćelija periodontalnog ligamenta za površinu dentina, kao i ubrzanje mitogene aktivnosti mezenhimnih ćelija. Tome se pridružuje njegov inhibitorski uticaj na proliferaciju ćelija sulkusnog epitela i urastanje između ćelija periodontalnog ligamenta i cementa korena zuba.

U kulturi ćelija osteoblasta, i-PRF i PRP pokazuju dobru biokompatibilnost. Migracija osteoblasta je bila veća 280% u i-PRF grupi, dok je u PRP grupi bila 200% veća u odnosu na kontrolnu grupu (kultura tkiva). Adhezivnost osteoblasta je bila približno jednaka u prvim satima nakon aplikacije. Međutim, njihova proliferacija je signifikantno bila veća nakon 3 i 5 dana i za PRP i za i-PRF grupu u odnosu na kontrolnu grupu, s tim što je nakon 5 dana i-PRF grupa pokazivala još potentniju proliferaciju osteoblasta²³⁸. Ekspresija ALP-a od strane osteoblasta nakon 7 i 14 dana bila je signifikantno veća u odnosu na grupu bez PRF-a, što da je i nakon 7 i nakon 14 dana ova ekspresija bila još veća u i-PRF grupi nego u PRP grupi. I na kraju, posmatrana produkcija osteokalcina je bila signifikantno veća samo za i-PRF grupu u odnosu na kontrolu, što može navesti na zaključak da i-PRF ipak ima veći uticaj na diferencijaciju osteocita u odnosu na PRP^{237, 239}.

Druge studije su zabeležile da je prednost PRF što sadrži leukocite, koji sprečavaju infekciju upravo svojim uticajem na imuni odgovor domaćina imedijatnom produkcijom citokina nakon aplikacije²⁴⁰. Sposobnost hemotakse leukocita tkiva se ispoljava pod dejstvom leukocita iz koncentrata, njihovom aktivacijom i oslobađanjem citokina poput IL-1, IL-4, IL-6 i TNF- α . U *in vitro* uslovima je takođe pokazano da PRF ima inhibitorski uticaj na rast kolonija *A. a.* i *P. g.*¹³.

Sumirano posmatrano, glavne karakteristike koncentrata trombocita i njihovi povoljni uticaji tokom tkivnog zarastanja su sledeći:

1. biokompatibilnost: PRF nudi biološki aktivnu supstancu sa oslobađanjem faktora rasta
2. povećanje vaskularizacije tkiva povećanom angiogenezom
3. regeneracija tkiva: PRF omogućava regeneraciju tkiva uz oslobađanje faktora rasta
4. poboljšanje sinteze kolagena
5. poboljšanje osteogeneze
6. ubrzanje proliferacije epitela i granulacionog tkiva
7. antimikrobni efekat
8. reakcija sa drugim materijalima: PRF ne reaguje ili ne ometa bilo koji drugi restaurativni materijal.

1.13. INICIJALNA TERAPIJA

Značaj kontrole prisustva dentalnog plaka u etio-patogenezi parodontitisa je detaljno proučena i pokazana ¹⁴¹. Inicijalna terapija parodontitisa obuhvata: identifikaciju dentalnog plaka, uklanjanje čvrstih i mekih supragingivalnih naslaga, obradu parodontalnog džepa, uklanjanje jatrogenih faktora, proveru okluzo-artikulacionih odnosa gornje i donje vilice i održavanje postignutih rezultata terapije.

Nakon uklanjanja čvrstih naslaga ultrazvučnim instrumentima, poliranjem zuba odgovarajućim metodama, sledi obrada parodontalnih ili gingivalnih džepova ručnim instrumentima (*scaling and root planing-SRP*). Ona obuhvata uklanjanje svih naslaga sa površine zuba apikalno od ivice slobodne gingive i iz prostora džepa, a može obuhvatiti i uklanjanje nekrotičnog cementa sa površine korena zuba kontaminiranog mikroorganizmima ili njihovim produktima. Upala gingive smatra se neophodnim preduslovom za naredni razvojni stadijum: parodontitis i progresivni gubitak vezivno-tkivnog pripoja ⁶⁷. Menadžment gingivitisa, dakle, ključna je primarna preventivna strategija za parodontitis i sekundarna preventivna strategija za recidiv parodontitisa ²⁴¹.

Sistematski pregledi retrospektivnih studija pokazuju da je tokom vremena redovnog praćenja i održavanja oboljenja parodonticijuma u što dužim intervalima remisije, gubitak zuba značajno manji. Gubitak zuba zbog parodontitisa kreće se od 1,5% do 9,8%, umesto od 36 do 89% kod netretiranih osoba ²⁴².

Međutim, postoje indicije da određenom procentu pacijenata ovakav vid terapije nije dovoljan i da se nakon kratke faze remisije faza egzacerbacije ubrzo vraća još burnijeg toka. Zbog toga postoji potreba za unapređenjem ovog terapijskog postupka, metodama koje nisu invazivne poput hirurških. U toku inicijalne faze terapije ili nakon završene terapije pored upotrebe antiseptičnih rastvora ili antiseptika u obliku gela, ispitivana je lokalna i sistemska upotreba antibiotika, tetraciklina, metformina, asorvastatina, NSAID, dodatna terapija laserom ili fotodinamska terapija.

Izvesno je da su prednosti primene PRF-a svakako brže zarastanje rane i regeneracija tkiva uslovljena faktorima rasta, brža angiogeneza, niski materijalni troškovi i kompletna imunokompatibilnost sa tkivom domaćina²⁴³.

Antimikrobni efekat zbog prisustva i leukocita u koncentratu trombocita kao i anti-inflamatornih citokina (pogotovo IL-4), negativno mogu uticati na stepen inflamacije parodonticijuma, pogotovo u prvim nedeljama kada je neophodno obezbediti povoljne uslove za dominaciju procesa regeneracije tkiva nad destruktivnim procesima.

Zbog rezultata koji su dobijeni dosadašnjom primenom dodatnih postupaka u inicijalnoj terapiji, sa malim razlikom koja u većini slučajeva nije statistički značajna, prevelikih materijalnih troškova za pacijenta ili pojave rezistencije na antibiotike, istražuju se nove terapijske mogućnosti.

Po ugledu na regenerativne procedure u parodontalnoj hirurgiji, a nakon sagledavanja svih bioloških osobina i-PRF-a, može se postaviti hipoteza o pozitivnom efektu i-PRF-a na proces regeneracije parodonticijuma, ali u toku inicijalne faze terapije parodontitisa.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Radna hipoteza: i-PRF ima uticaj na inicijalnu fazu terapije hroničnog parodontitisa u vidu ubrzanja regeneracije svih tkiva parodoncijuma, smanjenja inflamacije i koncentracije mikroorganizama.

Ciljevi istraživanja:

- Evaluacija efekta primene injektabilnog fibrina bogatog trombocitima na kliničke parametre u toku inicijalne terapije hroničnog parodontitisa.
- Komparativna analiza kliničkih rezultata nakon primene fibrina bogatog trombocitima u kombinaciji sa inicijalnom terapijom parodontitisa u odnosu na samostalnu inicijalnu terapiju.
- Procena kliničkih rezultata i značajnost unapređenja rezultata terapije.
- Procena kvantitativne promene koncentracije parodontopatogenih mikroorganizama u gingivalnoj tečnosti, dokazivanjem bakterijskog molekula DNK, nakon primene jedne ili obe vrste terapije.
- Procena promene kvalitativnog sastava parodontopatogenih mikroorganizama u gingivalnoj tečnosti, dokazivanjem bakterijskog molekula DNK, nakon primene jedne ili obe vrste terapije.
- Utvrđivanje promena koncentracije pojedinih biomolekula gingivalne tečnosti, koji su referentni markeri patogeneze hroničnog parodontitisa, nakon primene jedne i obe vrste terapije.
- Utvrđivanje faktora predikcije za različit terapijski ishod nakon primene oba terapijska postupka.

3. METODOLOGIJA

3.1. ETIČKI STANDARD

Studija je sprovedena na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, nakon dobijanja odobrenja Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta u martu 2015. godine, pod rednim brojem 36/11. Protokol studije je u skladu sa Edinburškom revizijom Helsinške deklaracije. Nakon detaljnog predstavljanja i jasnog objašnjenja protokola istraživanja, neophodan je bio pisani pristanak svakog pacijenta i saglasnost radi uključenja u studiju. Pacijenti su bili u mogućnosti da u bilo kojoj fazi na sopstveni zahtev prekinu učešće u istraživanju.

3.2. SELEKCIJA PACIJENATA

U studiji je učestvovalo 30 pacijenata sa hroničnim parodontitisom koji su se lečili na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Ispitivanje je pratilo takozvani dizajn „podeljenih usta” (engl. *split mouth*). Metodom slučajnog izbora bacanjem novčića, kod svakog ispitanika je određeno koja će strana biti studijska, a koja kontrolna (leva ili desna). Kliničko istraživanje obuhvatilo je preciznu verifikaciju ispitivanih parametara pre inicijalne terapije, kao i 1 mesec, 3 meseca i 6 meseci nakon terapije.

Kriterijumi za izbor pacijenata koji su učesvovali u studiji bili su sledeći:

- starost ≥ 18 godina;
- odsustvo sistemskih oboljenja;
- postavljena dijagnoza hroničnog parodontitisa;
- terapija oboljenja parodoncijuma poslednji put sprovedena najmanje 6 meseci ranije;
- prisustvo najmanje 6 zuba u svakom ispitivanom kvadrantu;
- izmerena dubina sondiranja (engl. *periodontal pocket depth* - PPD) ≥ 4 mm i nivo pripojnog epitela (engl. *clinical attachment level* - CAL) ≥ 3 mm u regiji najmanje jednog zuba po kvadrantu, uz prisustvo horizontalne koštane resorpcije, potvrđene radiografskim nalazom;
- izostanak furkacionih defekata klase II i III, potvrđen kliničkim pregledom i radiografskim nalazom;
- indeks krvarenja na provokaciju (engl. *bleeding on probing* - BOP) veći $\geq 40\%$ sa obe strane vilice;
- postojanje bar dva parodontalna džepa iste dubine sondiranja u dva različita kvadranta.

Kriterijumi za isključenje pacijenta iz studije:

- o sistemska oboljenja koja menjaju inflamatorni odgovor parodontijuma, neposredno ili posredno kao posledica primenjene terapije;
- o antibiotska terapija primenjena u poslednjih 6 meseci;
- o kauzalna faza terapije sprovedena u poslednjih 6 meseci;
- o hirurška terapija parodontijuma sprovedena u poslednjih 12 meseci;
- o sistemska terapija lekovima koji imaju uticaj na imuni odgovor (kortikosteroidi, imunosupresivi):
- o upotreba lekova koji direktno utiču na stanje gingive (npr.hiperplazija);
- o upotreba psihoaktivnih supstanci;
- o nepotpisan informisani pristanak;
- o trudnice i dojilje;
- o pušači.

3.3. PARODONTALNI STATUS PACIJENTA

Nakon popunjavanja evidencionog kartona i potpisivanja informisanog pristanka, sproveden je klinički pregled stanja parodontijuma. Dvadeset i četiri sata nakon ovog pregleda zakazan je termin za uzimanje uzoraka i sprovođenje predviđene terapije. Uzorak gingivalne tečnosti je uziman u regiji dva kontralateralna zuba aplikacijom sterilnih papirnih poena (Periopaper Strip®) u prostor parodontalnog džepa u trajanju od 30 sekundi.

Pre početka terapije, prema utvrđenoj metodologiji, evaluacija stanja parodontalnih tkiva sprovedena u 4 ili 6 definisanih tačaka u regiji svakog zuba (mezi - bukalna, medijalno - bukalna, disto - bukalna, ²⁴⁴mezio - lingvalna, medijalno - lingvalna i disto - lingvalna), određivanjem sledećih kliničkih parametara:

-PPD – engl. *periodontal pocket depth* – dubina sondiranja

-LGM – engl. *level of gingival margin* – nivo ivice gingive

-CAL – engl. *clinical attachment level* – nivo propojnog epitela

- BOP – engl. *bleeding on probing* – indeks krvarenja na provokaciju (*Mühlemann – Son*)²⁴⁴
- PI – engl. *plaque index* – plak indeks po *Silness – Loe*-u²⁴⁵.

Evaluacijom navedenih kliničkih parametara utvrđivano je stanje parodontalnih tkiva i nivoa oralne higijene.

Dubina sondiranja – PPD je klinički parametar koji definiše rastojanje od ivice slobodne gingive do koronarnog kraja pripojnog epitela. Određuje se parodontalnom građuisanom sondom, zaobljenog vrha. PPD parametar je određivan u 6 tačaka. Prosečna vrednost je izračunavana deljenjem ukupne zbirne vrednosti sa brojem 6.

Nivo ivice gingive – LGM predstavlja rastojanje od slobodne ivice gingive do gleđno - cementne granice zuba. Ovom parodontalnom indeksu se može dodeljivati pozitivna vrednost, ukoliko je ivica gingive koronarnije pozicionirana od gleđno – cementne granice, dok se negativna vrednost dodeljuje ukoliko je položaj ivice gingive apikalnije od nje. Ovaj parametar je takođe bio određivan u 6 tačaka i na isti način je dobijana njegova srednja vrednost.

Nivo pripojnog epitela – CAL je najznačajniji parametar za određivanje parodontalnog statusa pacijenta. Ovaj parametar direktno ukazuje na stepen destrukcije čitavog parodonticijuma. Određuje se merenjem rastojanja od gleđno – cementne granice do koronarnog kraja pripojnog epitela. Ukoliko se prilikom sondiranja ne može detektovati gleđno – cementna granica to znači da je pripojni epitel i dalje na ovom nivou i vrednosti nivoa pripojnog epitela se tada pripisuje nula. Za sva druga odstojanja pripojnog epitela od ove referentne tačke na zubu, CAL parametar dobija pozitivne vrednosti. Takođe je meren u 6 tačaka na različitim stranama zuba i srednja vrednost izračunavana sabiranjem svih vrednosti i deljenjem sa brojem 6.

Krvarenje na provokaciju – BOP je parametar koji prvi ukazuje na postojanje inflamacije u parodonticijumu. Prisustvo krvarenja nakon sondiranja u vidu jedne tačke, kapljice, linijskog ili profuznog krvarenja je mereno u 4 tačke na različitim površinama zuba (3 sa vestibularne strane zuba i 1 sa oralne strane zuba) i dodeljivana je odgovarajuća vrednost ovog parametra. Zbirna vrednost je na kraju deljena sa brojem 4.

Plak indeks – PI predstavlja indeks naslaga na površini zuba. Vrednosti ovog parametra su bile srazmerene količini mekih, odnosno čvrstih naslaga. Takođe je određivan u 4 različite tačke na jednom zubu i dobijene srednje vrednosti su izračunavane deljenjem ukupnog zbira sa brojem 4.

3.4. TERAPIJSKI POSTUPAK

Inicijalna terapija sprovedena je po protokolu ustanovljenom na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu. Pacijentima je pre početka uklanjanja supragingivalnih naslaga ultrazvučnim instrumentom detaljno objašnjen postupak pravilnog održavanja higijene uz vizuelnu detekciju postojećih naslaga na površini zuba. Preporučena tehnika pranja zuba je bila Bas-ova (*Bass*) metoda. Ova tehnika omogućava uklanjanje mekih naslaga sa vestibularnih, oralnih i okluzalnih površina zuba, iz subgingivalne regije, kao i delimičnog uklanjanja iz interdentalnih prostora. Podrazumeva horizontalne vibracione pokrete četkicom. Meke naslage iz interdentalnih prostora je savetovano uklanjati interdentalnim četkicama ili zubnim koncem.

Terapijski postupak je podrazumevao uklanjanje supragingivalnih mekih i čvrstih naslaga. Nakon završetka debridmana ultrazvučnim instrumentom piezoelektričnog efekta (EMS miniPiezon, EMS Swiss), zubi su polirani četkicama i pastom za poliranje zuba pri malom broju obrtaja nasadnim instrumentom. Ukoliko je bilo potrebno u uslovima lokalne anestezije, sprovedena je obrada parodontalnih džepova specijalnim Grejsi (*Gracey*) kiretama (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). Debridman je urađen od strane obučenog lekara specijaliste parodontologije i oralne medicine, koji nije bio upoznat sa daljim protokolom istraživanja.

Po završetku inicijalne terapije, randomizovanim odabirom jenog kvadranta, aplikovan je i-PRF kroz perforacije na individualno izrađenom silikonskom splintu u regiji parodontalnih džepova sa jedne strane vilice, dok je sa suprotne strane aplikovan fiziološki rastvor. Pacijenti su zamoljeni da 15 min sačekaju završetak koagulacije i-PRF-a u stomatološkoj stolici, otvorenih usta i sa obostrano postavljenim vaterolnama i saugeroma za skupljanje pljuvačke, nakon čega je tretman bio završen.

3.5. PROTOKOL ZA PRIPREMU i-PRF-a

Za pripremu i-PRF-a je neophodno bilo prikupiti oko 9ml venske krvi u dve sterilne vakuumirane plastične epruvete, bez antikoagulantnog sredstva. Epruvete su postavljane u laboratorijsku centrifugu - A Duo centrifuge (Process for PRF, Nice, France) Klinike za parodontologiju i oralnu medicinu, za izdvajanje fibrinskog ugruška bogatog trombocitima iz periferne krvi. Centrifugiranjem brzinom od 700 obrtaja u minuti u trajanju od 3 minuta, izdvajala su se tri sloja krvi. Gornji sloj predstavlja acelularnu krvnu plazmu, srednji sloj injektabilni fibrin bogat trombocitima i donji sloj u kome su istaloženi eritrociti. Gornji i srednji sloj aspirirani su brizgalicom sa iglom 31G. Nakon prikupljanja i-PRF, neophodno je bilo vrlo brzo i spretno ga aplikovati u prostore parodontalnih džepova jednog, odabranog kvadranta. Uspeh ove terapije u potpunosti zavisi od vremena proteklog od izdvajanja venske krvi do postavljanja u parodontalne džepove. Iako u manjem procentu nego u staklenim epruvetama, u kontaktu trombocita i sa površinom plastične epruvete dolazi do njihove aktivacije i kaskade reakcija uključenih u koagulaciju krvi. Iz tog razloga i-PRF perzistira oko 15 minuta u tečnom obliku do prelaska u formu gela.



Slika 3.1. Izdvojen i-PRF svetlo smeđe boje u gornjem delu epruvete nakon centrifugiranja krvi (700 obrtaja/min u toku 3 minuta)

3.6. UZORKOVANJE GINGIVALNE TEČNOSTI

Uzorkovanje gingivalne tečnosti pre terapije i nakon jednog meseca, 3 meseca i 6 meseci od sprovedene terapije bilo je potrebno radi ispitivanja uticaja čitavog postupka na kvalitativan i kvantitativan mikrobiološki sastav gingivalne tečnosti, kao i koncentraciju odabranih biomolekula.

Uzorci su uzimani 24h nakon pregleda pacijenta da bi se izbegla kontaminacija krvlju. U istoj seansi se otpočinjalo sa terapijom. Uzorci su uzimani sterilnim papirnim poenom (Periopaper Strip®) iz najdubljeg parodontalnog džepa. Mesto uzorkovanja je izolovano od pljuvačke vaterolnoma i blago posušeno vazduhom iz pustera. Supragingivalni plak je pažljivo uklanjao sterilnim kuglicama vate. Po 4 papirna poena su postavljana u parodontalni džep do blagog otpora u trajanju od 30 sekundi. Papirni poeni koji su evidentno kontaminirani krvlju nisu korišćeni za analize. Uzorci su stavljani u sterilne tube zapremine 1,5 ml (Eppendorf) i čuvane na temperaturi -70°C do otpočinjavanja laboratorijskih analiza.

3.7. LABORATORIJSKI POSTUPCI

3.7.1. Mikrobiološko ispitivanje

Dokazivanje prisustva bakterijske DNK je vršeno primenom metode lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) u Laboratoriji za molekularnu genetiku, Stomatološkog fakulteta u Beogradu.

DNK je izolovana iz ćelija bakterija dodavanjem $300\ \mu\text{l}$ $50\ \text{mM}$ NaOH u svaki uzorak. Potom je svaki uzorak vorteksovan 10 sekundi i postavljan u termoblok gde je zagrevan do $95\ ^{\circ}\text{C}$ uz zadržavanje od 5 minuta, nakon čega je dodato $30\ \mu\text{l}$ $1\ \text{M}$ TrisHCl ($\text{pH}=8$) i uzorci us centrifugirani 2 minuta na 1300 obrtaja.

Nakon ovakve pripreme uzoraka, primenom PCR metode dokazano je postojanje specifičnih segmenata bakterijskog genoma. Osnovni princip PCR-a je umnožavanje kratke ciljne sekvence iz male količine početnog uzorka, pomoću enzima DNK polimeraze (Taq polimeraza, stabilna i otporna na visoke temperature).

Standardna PCR reakcija sastoji se od sledećih faza:

- 1) Inicijalna denaturacija – faza tokom koje dolazi do aktivacije enzima DNK polimeraze, koja se odvija na 95°C u trajanju od 5 minuta,
- 2) Amplifikacija – faza koja se sastoji od 30-40 istih ciklusa. Svaki ciklus amplifikacije sastoji se od tri koraka:

- a. Denaturacije – odvajanje dvolančanog u dva jednolančana molekula DNK (95°C u trajanju od 1 minut),
 - b. hibridizacije – vezivanje prajmera za specifičan region bakterijske DNK (55°C u trajanju od 1 minut) i
 - c. ekstenzije – novi lanci DNK su sintetisani komplementarno sa matričnim, a u nastavku vezanih prajmera (72°C u trajanju 3 minuta).
- 3) Ekstenzija – faza koja traje 7 minuta na pomenutoj temperaturi.

Ovo rezultuje eksponencijalnim amplifikacijama početnog niza tokom ranih ciklusa, kada su PCR komponente uglavnom dostupne. Kako vreme odmiče proizvod reakcije se nakuplja, koncentracija supstrata se smanjuje, što dovodi do inhibicije reakcije (Fraga et al. 2014; Valasek i Repa 2005). Reakcionu smešu za PCR, zapremine 25 µl PCR činili su: 2,5 µl 10 x koncentrovanog PCR pufera (radi postizanja finalne koncentracije, MBI Fermentas, Lithuania), 0,2 mM dezoksinukleotid trifosfata (dNTPs), 1 µl rastvora MgCl₂, jedna jedinica (1U) odnosno 0,2 µl DNK Taq polimeraze (MBI Fermentas, Lithuania), po 1 µl svakog prajmera (radne koncentracije 5µM, čime je postizana finalna koncentracija od 0,2µM), 13,5 µl destilovane vode i 5 µl uzorka.

Prajmeri koji su korišćeni u PCR reakcijama specifični su za svaku ispitivanu bakteriju:

za *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*:

Fwd 5'-GCTAATACCGCGTAGAGTCGG-3' i

Rv 5'-ATTCACACCTCACTTAAAGGT-3';

za *Porphyromonas gingivalis*:

Fwd 5'-AGGCAGCTTGCCATACTGCG-3' i

Rv 5'-ACTGTTAGCAACTACCGATGT-3';

za *Prevotella intermedia*-u:

Fwd 5'-CGTGGACCAAAGATTCATCGGTGGA-3' i

Rv 5'-CCGCTTTACTCCCCAACAAA-3';

i za *Tannerella forsythia*-u:

Fwd 5'-GCGTATGTAACCTGCCCCGCA-3' i

Rv 5'-TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT-3'.

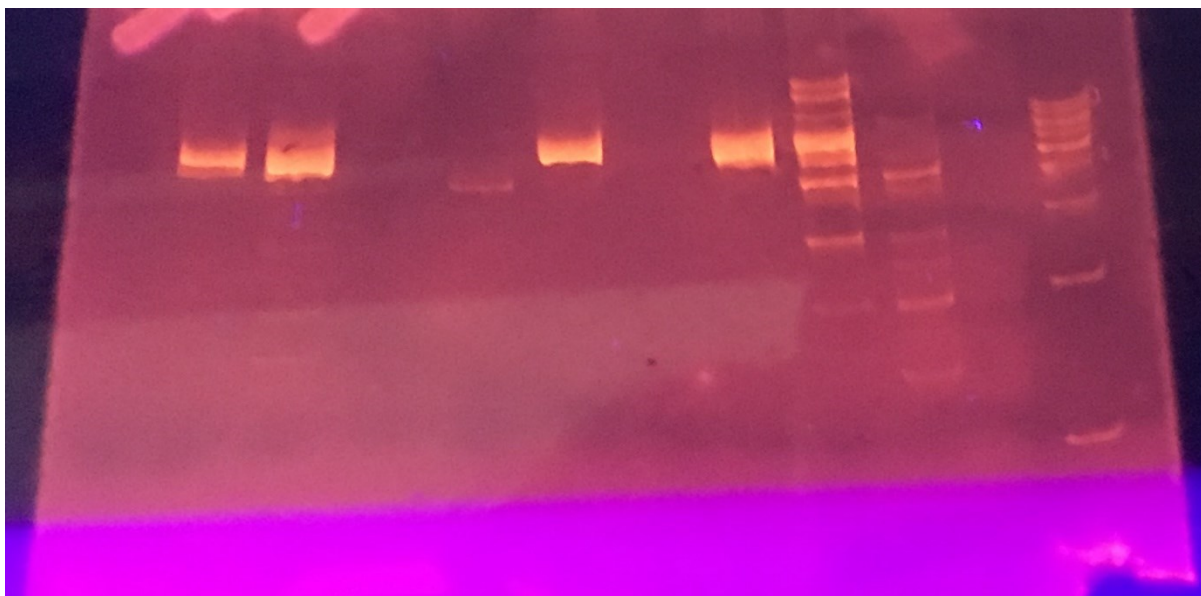
Umnožavanje bakterijske DNK u materijalu sprovedeno je u PCR aparatu (PeqStar; PeqLab, Erlangen, Nemačka).

U svakoj PCR reakciji, osim uzoraka, korišćene su pozitivna i negativna kontrola. Pozitivna kontrola je izolovana iz potvrđenog uzorka određenog bakterijskog genoma. Pozitivne kontrole su bile sledeće ćelijske linije:

- *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 33384),
- *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277),
- *Prevotella intermedia* (ATCC 33563) i
- *Tannarella forsythia* (ATCC 43037).

Negativna kontrola je bila destilovana voda.

Nakon umnožavanja, provera PCR reakcije odnosno vizuelizacija dobijenih produkata je postignuta primenom poliakrilamidne gel elektroforeze (engl. polyacrylamide gel electrophoresis – PAGE). Metoda se bazira na primeni polimerne smeše akrilamida i bisakrilamida, polimerizovane dodavanjem rastvora TEMED (tetrametiletilendiamina) i APS (amonijum persulfata), koja omogućava da se DNK molekuli vođeni strujom, razdvajaju prema svojoj molekulskoj masi, odnosno dužini DNK fragmenata. Elektroforeza je izvođena na 8% gelu u 1x TBE puferu sa konstantnim naponom od 200 V tokom 30 minuta. Fragmenti dobijeni PCR amplifikacijom su dužine: *A. actinomycetemcomitans* 500 bp; *P. gingivalis* 400 baznih parova (bp); *P. intermedia* 259 bp i *T. Forsythia* 641 bp. Nakon separacije gel elektroforezom, gel je bojen potapanjem u rastvor etidijum bromida i dobijeni PCR produkti su detektovani na UV transiluminatoru (Power Station 300plus, Labnet International, INC, USA) i identifikovani na osnovu broja baznih parova umnožene sekvence, odnosno položaja trake na gelu (slika 3.2.).



Slika 3.2. Agarozna gel elektroforeza umnoženih delova genoma *A. a.*

3.7.2. Određivanje kvantitativnog sastava mikroorganizama u GCF

Za procenu ukupne koncentracije bakterija u GCF korišćena je metoda lančane reakcije polimeraze u „realnom vremenu” (engl. *real-time polymerase chain reaction – real time PCR*), takođe poznatu kao kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze (engl. *quantitative polymerase chain reaction – qPCR*). Metoda omogućava kvantifikovanje specifičnih nukleinskih kiselina u složenoj smeši, čak i ako je početna količina niske koncentracije. Metoda *real time PCR* često se primenjuje za kvantifikaciju bakterijskog i virusnog genoma, za procenu broja kopija onkogenih u malignim ćelijama, a najčešće se koristi za analizu nivoa genske ekspresije, nakon reakcije reverzne transkripcije.

Reakcija qPCR bazira se na istim principima kao i PCR, s tim što je količinu dobijenog produkta nakon svakog ciklusa amplifikacije moguće pratiti zahvaljujući primeni fluorescentnih boja i mogu se jasno razlikovati tri faze umnožavanja PCR produkta: eksponencijalna, linearna i plato. Prva faza reakcije je eksponencijalna faza, kada reakcija napreduje sa nešto manje od 100% efikasnosti (pažljivom optimizacijom uslova postiže se približno 100% efikasnost) i kada se količina PCR amplifikata udvostručava u svakom ciklusu. Dok se proizvod reakcije kontinuirano nakuplja, PCR sastojci se troše, efikasnost reakcije opada i ulazi se u drugu, linearnu fazu, a zbog daljeg smanjenja dostupnih reagenasa reakcija će se u nekom trenutku usporiti i ući u plato fazu.

Fluorescentne boje koje se uobičajeno koriste u real time PCR reakcijama su *SYBR Green* i *EvaGreen*®. Obe su po svojim karakteristikama interkalirajuće boje, što znači da se ugrađuju između

lanaca dvolančanih DNK struktura koje nastaju kroz proces amplifikacije. Kada su takve boje slobodne u rastvoru, pokazuju relativno nisku fluorescenciju, skoro nedetektabilnu, ali kada se vežu za dvolančanu DNK, njihova se fluorescencija povećava preko 1000 puta. PCR aparat u kome se izvodi reakcija ima pobuđivač i detektor fluorescence, pa na kraju svakog od ciklusa registruje količinu ugrađene boje što omogućava praćenje toka PCR reakcije. Kada fluorescentni signal ulazi u eksponencijalnu fazu, započne dupliranje PCR produkta i taj ciklus se označava kao Ct (engl. *Cycle threshold*). Što je više DNK u uzorku, kraće je vreme potrebno da se dostigne prag fluorescence, tj. Ct vrednost je manja. Uporedo sa uzorcima, u svaku reakciju je uključen niz desetstrukih razblaženja referentne DNK (soj *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845: 32,4 fg - 32,4 ng) da bi se generisala standardna kriva. Ukupni broj kopija gena bakterija određen je interpolacijom na standardnoj krivi, kao što je prethodno opisano (Brajović i dr. 2016).

U našem eksperimentu, reakciona smeša je sadržala 2 µl uzorka bakterijske DNK, 7,5 µl *real-time* - PCR master miksa (SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit - Biorline), po 1 µl EuF (5'TCCTACGGGAGCACAGT3') i EuR (5'GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT3') prajmera i 3,5 µl vode bez nukleaza. EuF i EuR predstavljaju univerzalne bakterijske prajmere koji se vezuju za visoko konzervirane regione 16S ribozomske DNK (rDNK).

Real time PCR analize su rađene u Gene-K Fluorescence PCR sistemu za detekciju (BIOER Technology, Šangaj, Kina) pod sledećim uslovima: Inicijalna denaturacija 95°C 3 minuta; 40 ciklusa denaturacije na 95°C 30 sekundi, vezivanje prajmera na 60°C 30 sekundi i elongacija na temperaturi 72°C 1 minut; završna elongacija na 72°C trajala je 5 minuta.

3.7.3. Ispitivanje biohemijskih parametara

Uzorkovanje GCF korišćeno je i za utvrđivanje koncentracije MMP-8, TNF-α i ALP upotrebom odgovarajućih ELISA. ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) omogućava detekciju i kvantifikaciju proteina u tečnom uzorku, a zasnovana je na reakciji antigen-antitelo. Uzorak sa nepoznatom količinom antigena imobilizira se na čvrstom nosaču (mikrotitar ploča od polistirena) ili nespecifično (adsorpcijom na površinu) ili specifično (tako što ga hvata prvo antitelo specifično za antigen; ovaj tip ELISA testa se označava kao "sendvič" ELISA). Zatim se na površinu dodaje antitelo sa kovalentno vezanim enzimom, a u poslednjem koraku dodaje se rastvor koji sadrži supstrat enzima. Reakcija koja usledi između enzima i supstrata daje vidljivu reakciju, najčešće rezultujući promenom boje rastvora. Nakon što je antigen imobilizovan, dodaje se antitelo za otkrivanje, formirajući kompleks sa antigenom. Između koraka ploča se obično pere blagim rastvorom deterdženta za uklanjanje svih proteina ili antitela koja se nisu specifično vezala, a nakon poslednjeg koraka pranja, ploča se razvija dodavanjem enzimatskog supstrata za proizvodnju vidljivog signala.

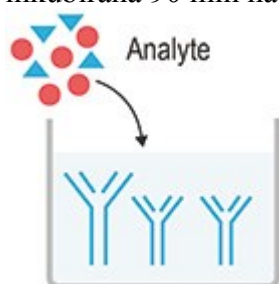
Kvantifikacija proteina izvedena je prema preporukama proizvođača korišćenjem sledećih ELISA setova: Human Total MMP-8 Kvantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); Faktor

nekroze humanog tumora nekroze (TNF-a) i ELISA kompleti za ljudsku alkalnu fosfatazu (ALP) (Elabscience Biotechnologi, Vuhan, Kina). Uzorci nisu bili stariji od 3 meseca i čuvani su na -70°C . Priprema standarda i njegova razblaženja su sprovedena prema uputstvu proizvođača. Uzorci GCF su eluirani sa papirnih poena dodatkom $1000\ \mu\text{l}$ rastvora fosfatnog pufera ($\text{pH}=7,4$), nakon čega su uzorci centrifugirani 20 minuta na 3000 obrtaja u minutu.

Neposredno nakon centrifugiranja, supernatant je sakupljen i korišćen za dalje ispitivanje.

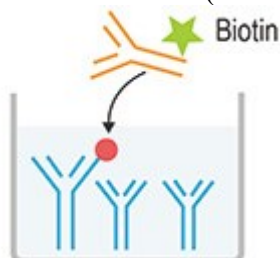
Postupak je bio sledeći:

1. Dodavano je $100\ \mu\text{l}$ standarda i svakog uzorka u bunariće mikrotitar ploče koja je nakon toga inkubirana 90 min na 37°C (Slika 12).



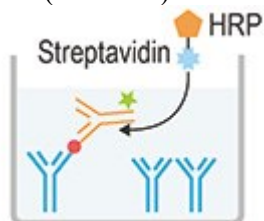
Slika 3.3.

2. Potom je tečnost uklanjana iz svakog bunarića mikrotitar ploče i dodavan Biotinirani rastvor za detekciju Ab pripremljenog na definisan način. Nakon pažljivog mešanja, inkubirano je sve na 37°C sat vremena (Slika 13).



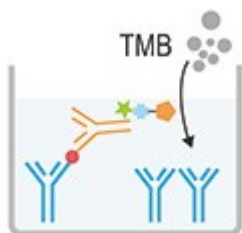
Slika 3.4.

3. I ovaj rastvor je aspiriran i uklonjen, a potom je dodato $350\ \mu\text{l}$ pufera za ispiranje i postupak ponovljen 3 puta. Nakon dodavanja $100\ \mu\text{l}$ HRP konjugata, ploča je inkubirana 30 minuta na 37°C (Slika 14).



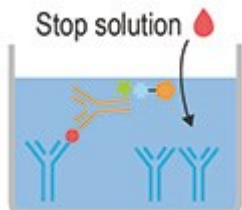
Slika 3.5.

4. Sadržaj svakog bunarića je aspiriran i bunarići su isprani još 5 puta. Sledilo je dodavanje $90\ \mu\text{l}$ supstratnog reagensa i inkubacija 15 minuta na 37°C (Slika 15).



Slika 3.6.

5. Poslednji korak je bio dodavanje 50 μ l STOP rastvora (Slika 16).



Slika 3.7.

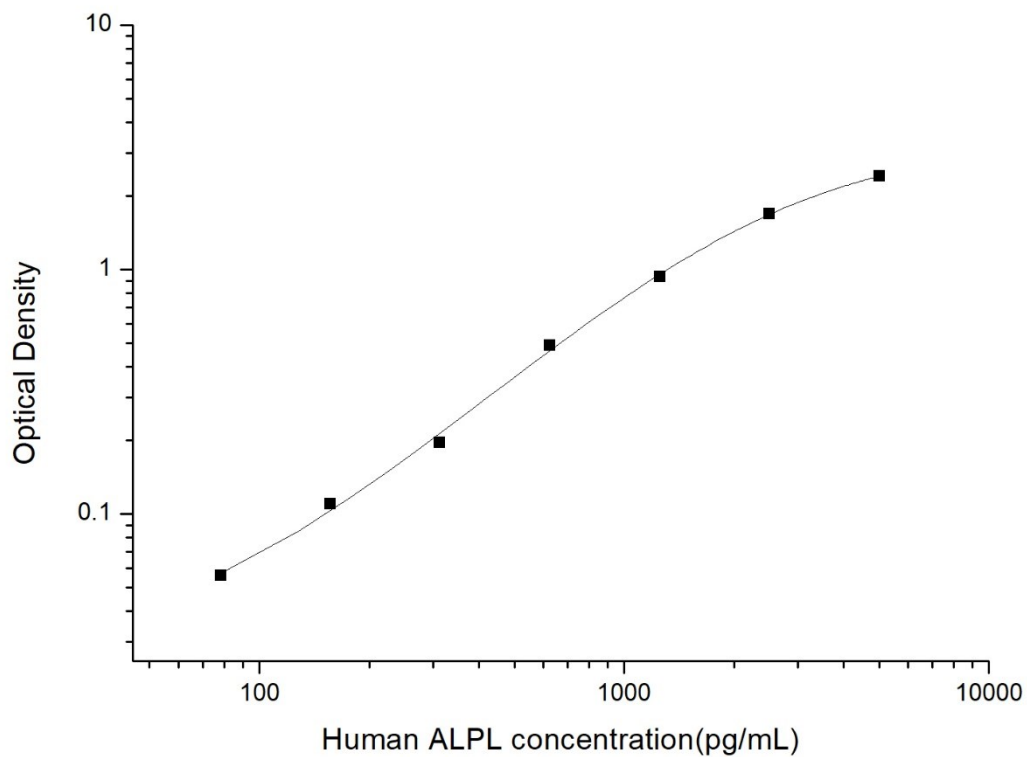
6. Postupak određivanja optičke gustine i koncentracije bio je sličan za ALP, MMP-8, kao i TNF- α (Slika 17).



Slika 3.8.

(Slike 3.3.-3.8.-preuzete i modifikovane : <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html>)

Upotrebom čitača za mikrotitar ploče (RT 2100C, Raito Life i Analitičke nauke, Shenzhen, Kina) podešenog na 450 nm i 570 nm, određena je optička gustina, a koncentracije testiranih proteina su određene iz generisane standardne krive (Slika 18).



Slika 3.9. – Koncentracija ALP-a (pg/mL) (izvor: [https://www.elabscience.com/phuman_alpl\(alkaline_phosphatase_liver_bone_kidney\)_elisa_kit-19907.html](https://www.elabscience.com/phuman_alpl(alkaline_phosphatase_liver_bone_kidney)_elisa_kit-19907.html))

3.8. RIZIK

U literaturi ne postoje podaci o rizicima vezanim za ovakvu vrstu procedure.

3.9. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statističkom analizom obuhvaćeni su svi parametri uključeni u klinička i laboratorijska ispitivanja. Korišćen je statistički programski paket SPSS za Windows (verzija 20.0). Posmatrane numeričke varijable su opisane klasičnim merama centralne tendencije: aritmetičkom sredinom i medijanom, kao i merama varijabiliteta: standardnom devijacijom, minimalnom i maksimalnom vrednošću. Procena vrednosti posmatranih varijabli izmerenih u uzorku je opisana 95% intervalom poverenja. Dobijeni rezultati predstavljeni su tabelarno. Raspodele svih vrednosti rezultata ispitivane su korišćenjem testa normalnosti Kolmogorov-Smirnov i u zavisnosti od distribucije, vrednosti dobijene u dve studijske grupe upoređivane su korišćenjem Student-ovog t-testa ili Vilkokson-ovog (Wilcoxon) testa. Poređenja svih merenja unutar svake praćene grupe izvršena su ANOVA testom ponovljenih merenja sa Bonferoni (Bonferroni) korekcijom ili Fridman (Friedman) i Vilkokson testom rangiranja. Univarijantni i multivarijantni logistički regresioni modeli korišćeni su za procenu prediktora razlike između kontrolne i studijske grupe. Razlike su smatrane značajnim kada je p vrednost bila $< 0,05$. Snaga studije izračunata je korišćenjem *DSS Research*, za primarni ishod (CAL) nakon 6 meseci i bila je iznad 90%. Granična vrednost za prihvatanje hipoteze o postojanju razlike između testiranih grupa u analiziranim varijablama, kao i unutar grupa između posmatranih vremena merenja, postavljena je na $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA

U odabranoj grupi ispitanika, metodom „podeljenih usta” su posmatrani efekti dva terapijska postupka primenjena u toku lečenja parodontitisa. Posmatrani su efekti inicijalne terapije u kombinaciji sa aplikacijom i-PRF-a u odnosu na efekte samo inicijalne terapije parodontitisa.

Tabela 4.1. Demografske karakteristike ispitanika

Posmatrani parametri	Dobijene vrednosti
Starost X±SD godina (Med; min-max)	38,00±10,12 (36,50; 22-64)
Pol	
Ženski	17 (56,7%)
Muški	13 (43,3%)
Ukupan broj ispitanika	30 (100,0%)

Prosečna starost pacijenata uključenih u studiju bila je 38.0±10.1 godina, od kojih je nešto više bilo osoba ženskog pola 56,7%, dok je osoba muškog pola bilo 43,3%.

DUBINA SONDIRANJA (engl. *periodontal pocket depth* – PPD)

Tabela 4.2.1. Međugrupno i unutargrupno poređenje srednjih vrednosti PPD ± standardna devijacija (SD) izražene u milimetrima (Med; min-max)

PPD $\bar{x} \pm SD$ mm (Med; min-max)	Grupa		Značajnost ^b
	P	C	
Vreme merenja			
0 meseci	3,735±0,863 (3,800; 1,63- 5,13)	3,696±0,851 (3,820; 1,67-4,96)	^c p=0,429
1 mesec	2,398±0,792 (2,2700; 1,21-3,65)	2,876±0,804 (2,930; 1,32-4,28)	^c p=0,000*
3 meseca	1,990±0,640 (1,910; 1,09-3,03)	2,567±0,701 (2,4300; 1,22-3,88)	^c p=0,000*
6 meseci	1,778±0,542 (1,720; 1,08-2,68)	2,409±0,640 (2,250; 1,20-3,72)	^c p=0,000*
Značajnost ^a	^d p=0,000*	^d p=0,000*	

P- ispitavana grupa; C – kontrolna grupa

^a – Unutargrupno poređenje između vremena posmatranja; jednofaktorska analiza varijanse sa ponovljenim merenjem

^b – Poređenje između grupa

^c – T-test za vezane uzorke

^d – Wilcoxon-ov test za vezane uzorke

* – Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

Poređenjem vrednosti dubine sondiranja (PPD) pre početka inicijalne terapije nije uočena statistički značajna razlika između ispitivane (P) i kontrolne (C) grupe (Tabela 4.2.1). Daljom analizom vrednosti

PPD između navedenih grupa u vremenima posmatranja: 1 mesec, 3 meseca i 6 meseci nakon sprovedene inicijalne terapije, uočava se statistički značajna razlika u vrednostima PPD i to tako da su ove vrednosti bile statistički značajno veće u C grupi u odnosu na P grupu (Grafikon 4.3). Unutargrupnim poređenjem uočena je statistički značajna razlika među vrednostima PPD između svih vremena šestomesečnog perioda posmatranja (Tabela 4.2.2.), tokom koga su se vrednosti ovog parametra statistički značajno smanjivale (Grafikon 4.1. i 4.2.).

Tabela 4.2.2. Unutargrupno poređenje vrednosti PPD u svakom pojedinačnom intervalu merenja

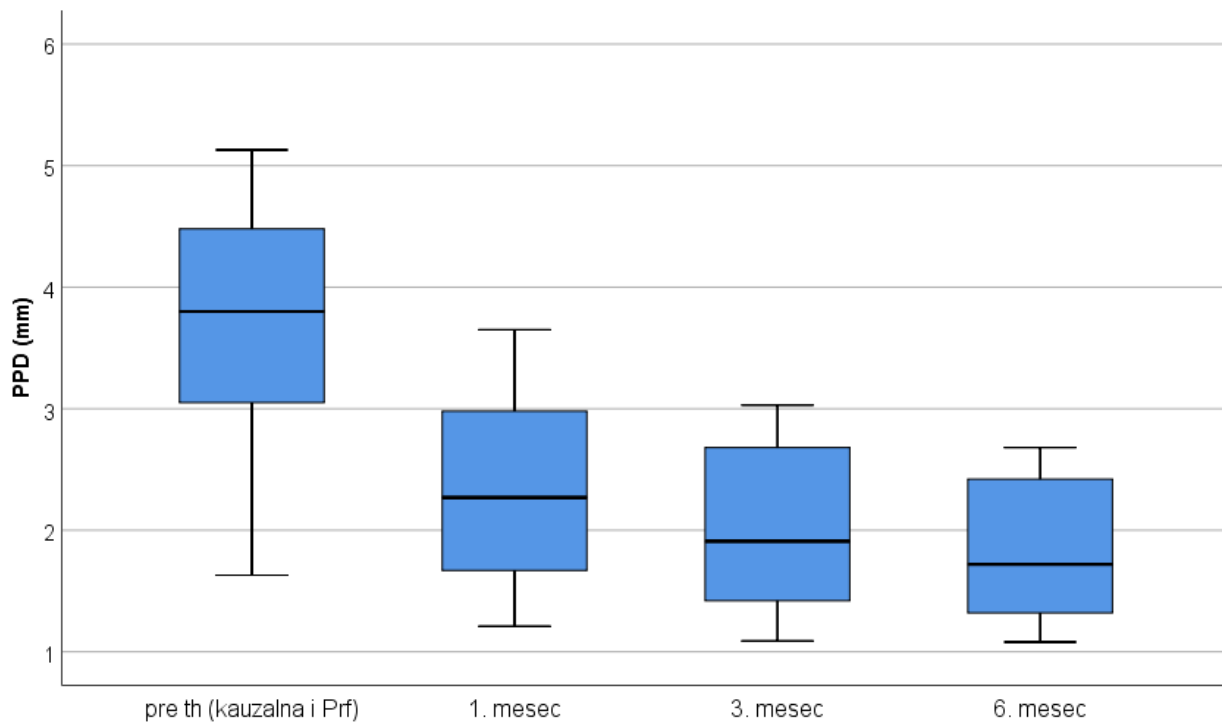
PPD				
Grupe	Vreme merenja (meseci)	0m	1m	3m
P	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,000*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	^a p=0,000*
C	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,000*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	^a p=0,000*

^a-Bonferoni test: unutargrupno poređenje

P- ispitavana grupa; C – kontrolna grupa

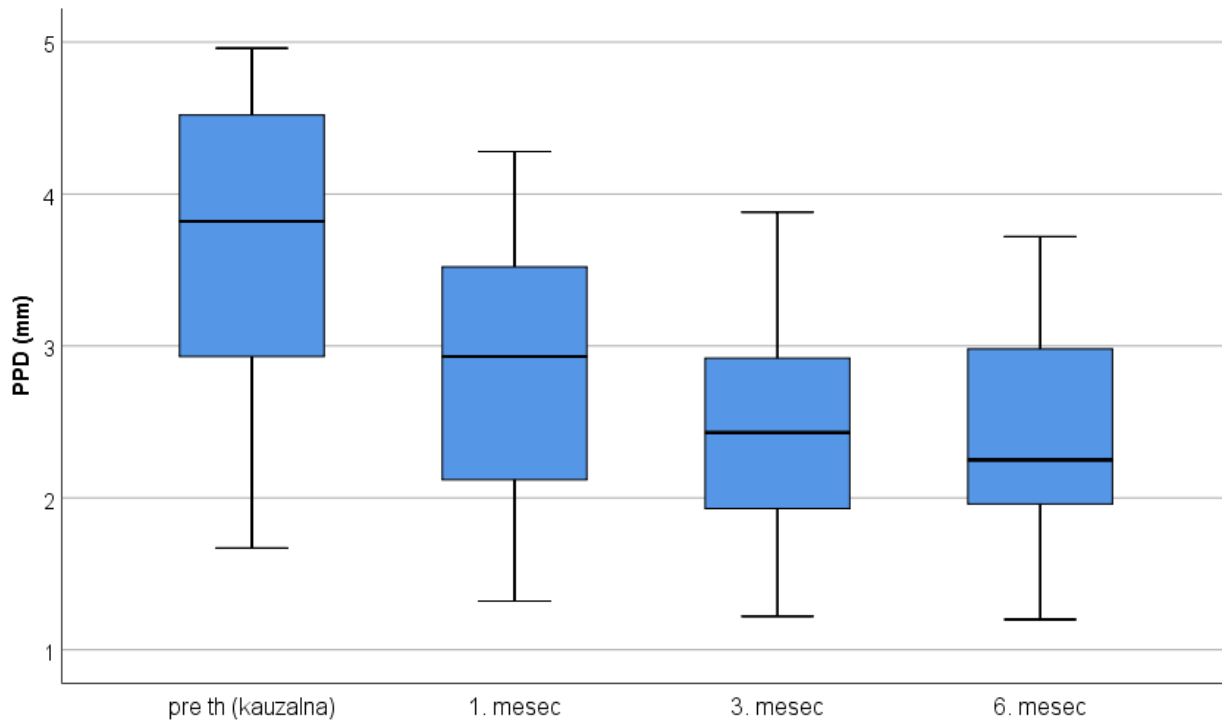
Dubina sondiranja - PPD u P grupi

Grafikon 4.1. Srednje vrednosti dubine sondiranja (PPD) \pm standardna devijacija (SD) izražene u milimetrima u odnosu na različita vremena posmatranja ovog parametra u P grupi sa intervalom poverenja od 95%.



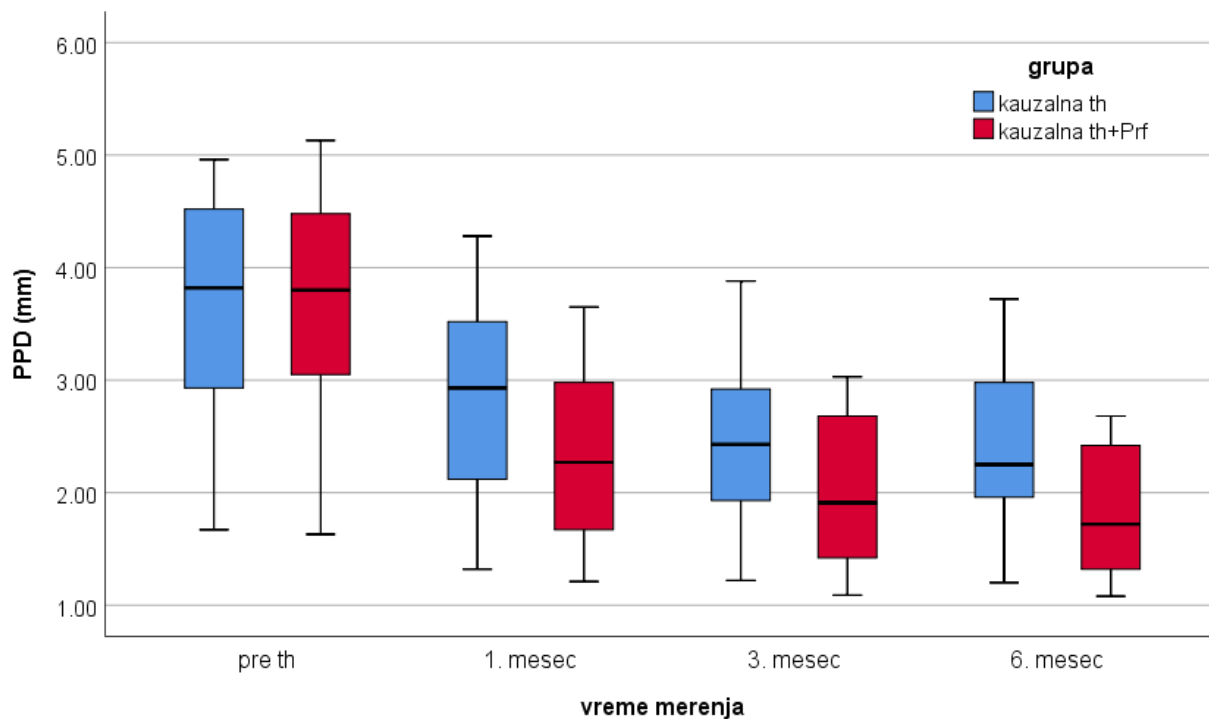
Dubina sondiranja - PPD u kontrolnoj C grupi

Grafikon 4.2. Srednje vrednosti dubine sondiranja (PPD) \pm standardna devijacija (SD) izražene u milimetrima u odnosu na različita vremena posmatranja ovog parametra u kontrolnoj (C) grupi sa intervalom poverenja od 95%



Međugrupno poređenje dubine sondiranja – PPD

Grafikon 4.3. Srednje vrednosti dubine sondiranja (PPD) \pm standardna devijacija (SD) izražene u milimetrima u odnosu na različita vremena posmatranja ovog parametra u ispitivanoj (P) i kontrolnoj (C) grupi, sa intervalom poverenja od 95%



NIVO IVICE GINGIVE (engl. *level of gingival margin* – LGM)

Tabela 4.2.3. Međugrupno i unutargrupno poređenje srednjih vrednosti LGM ± standardna devijacija (SD) izražene u milimetrima (Med; min-max)

LGM x̄ ±SD mm (Med; min-max)	Grupa		Značajnost ^b
	P	C	
Vreme merenja			
0 m	1,737±0,567 (1,790; 0,02-2,50)	1,787±,589 (1,770; 0,62-2,54)	^c p=0,575
1 m	0,948±0,573 (1,040; -0,78-1,80)	1,150±0,462 (1,200; 0,27-1,85)	^c p=0,016*
3 m	0,782±0,580 (0,811; -0,72-1,66)	0,877±0,533 (0,880; -0,45-1,83)	^c p=0,249
6 m	0,808±0,518 (0,755; 0,08-2,38)	0,794±0,457 (0,805; -0,15-1,72)	^c p=0,871
Značajnost ^a	^d p=0,000*	^d p=0,000*	

P- ispitavana grupa; C – kontrolna grupa

^a – Unutargrupno poređenje između vremena posmatranja; jednofaktorska analiza varijanse sa ponovljenim merenjem

^b – Poređenje između grupa

^c – T-test za vezane uzorke

^d – Wilcoxon-ov test za vezane uzorke

* – Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

Tabela 4.2.4. Unutargrupno poređenje vrednosti LGM u svakom intervalu merenja

LGM				
Grupe	Vreme merenja (meseci)	0m	1m	3m
P	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,003*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,003*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,933	^a p=0,999
C	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,003*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,003*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	^a p=0,527

^a-Bonferoni (Bonferroni) test: unutargrupno poređenje

P- ispitavana grupa; C – kontrolna grupa

*– Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

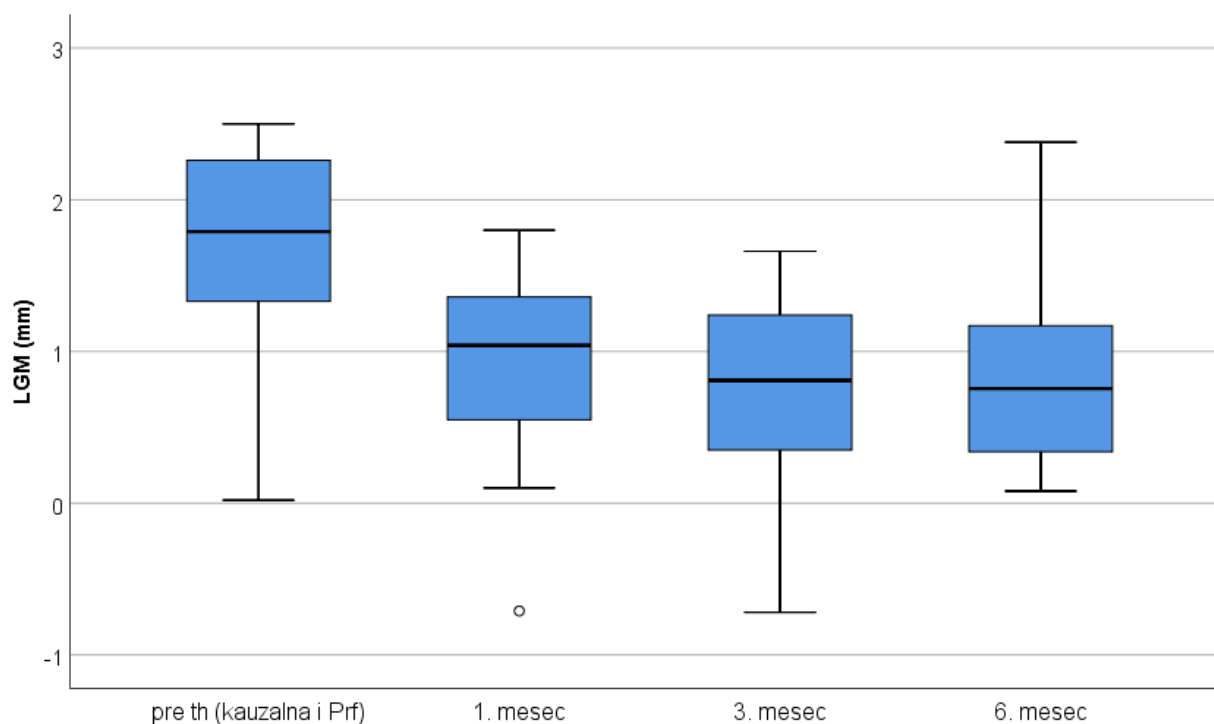
Vrednosti nivoa ivice gingive (LGM) izmerene pre inicijalne terapije nisu se statistički značajno razlikovale između ispitivane (P) i kontrolne (C) grupe (Tabela 4.2.3.). Nakon 1.-og meseca od sprovedene terapije statistički značajno veće vrednosti ovog parametra su uočene u C grupi (Tabela 4.2.3., Grafikon 4.6.). Daljim poređenjem vrednosti ovog parametra nakon 3 i 6 meseci od sprovedene terapije nije uočena statistički značajna razlika između P i C grupe (Tabela 4.2.3., Grafikon 4.6.).

Unutargrupnim poređenjem uočena je statistički značajna razlika u P i C grupi u vrednosti LGM-a merenih pre terapije i 1 mesec, 3 meseca i 6 meseci nakon terapije (Tabela 4.2.3.). Poređenjem vrednosti LGM-a između pomenutih vremena merenja u P grupi statistički značajna razlika nije nađena samo između 1. i 6. meseca merenja i 3. i 6. meseca merenja (Tabela 4.2.4.). Posmatranjem ovog parametra u C grupi statistički značajna razlika nije nađena samo između 3. i 6. meseca merenja

(Tabela 4.2.4.). Analizom dobijenih rezultata može se uočiti da je zabeležen statistički značajan pad vrednosti LGM-a 1 mesec nakon terapije i da je taj pad bio veći u P grupi, a da do kraja perioda praćenja nisu zabeležene statistički značajne promene vrednosti ovog parametra (Grafikon 4.4., 4.5. i 4.6.).

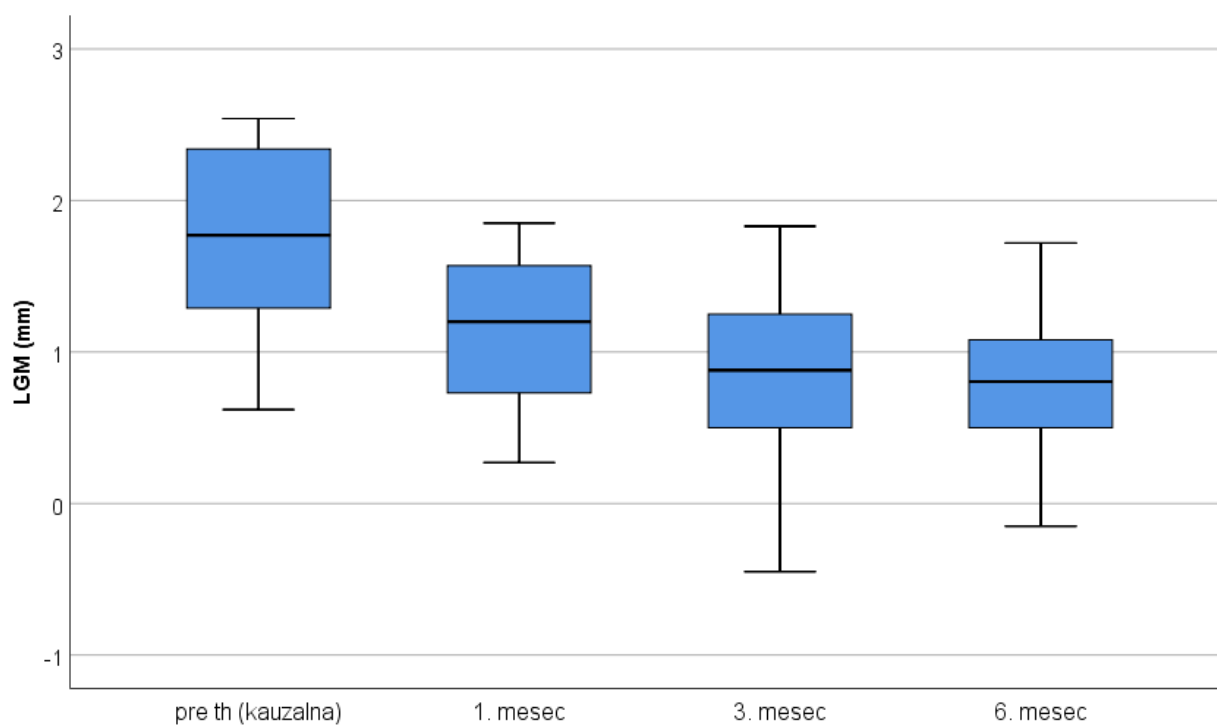
Nivo ivice gingive – LGM u ispitivanoj – P grupi

Grafikon 4.4. Srednje vrednosti LGM \pm standardna devijacija (SD) izražene u milimetrima u odnosu na različita vremena posmatranja ovog parametra u ispitivanoj (P) grupi sa intervalom poverenja od 95%.



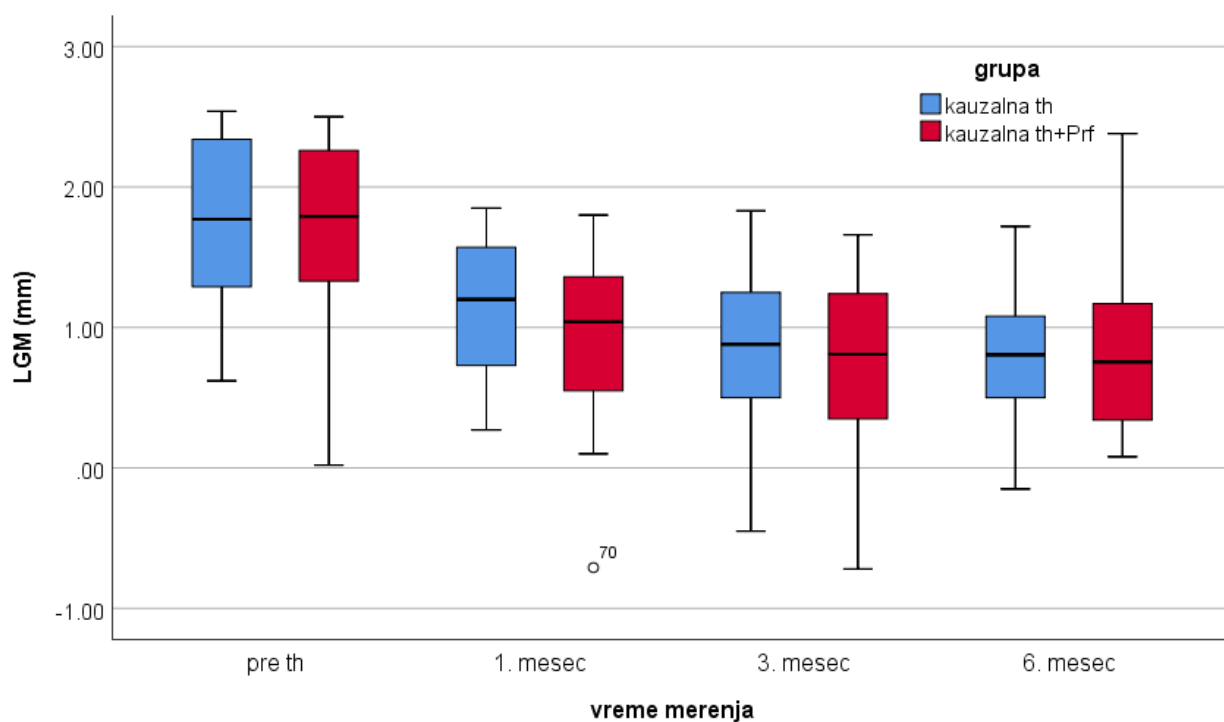
Nivo ivice gingive – LGM u kontrolnoj – C grupi

Grafikon 4.5. Srednje vrednosti LGM \pm standrardna devijacija (SD) izražene u milimetrima u odnosu na različita vremena posmatranja ovog parametra u kontrolnoj (C) grupi sa intervalom poverenja od 95%.



Međugrupno poređenje vrednosti nivoa ivice gingive - LGM

Grafikon 4.6. Srednje vrednosti LGM \pm standrardna devijacija (SD) izražene u milimetrima u odnosu na različita vremena posmatranja ovog parametra u ispistivanoj (P) i kontrolnoj (C) grupi, sa intervalom poverenja od 95%



NIVO PRIPOJNOG EPITELA (engl. *clinical attachment level* – CAL)

Tabela 4.2.5. Međugrupno i unutargrupno poređenje srednjih vrednosti CAL ± standardna devijacija (SD) izražene u milimetrima (Med; min-max)

CAL x±SD mm (Med; min-max)	Grupa		Značajnost ^b
	P	C	
Vreme merenja			
0meseci	2,009±0,724 (1,965; 0,25-3,31)	2,018±0,715 (2,045; 0,42-3,46)	^c p=0,773
1mesec	1,453±0,643 (1,420; 0,17-2,73)	1,755±0,654 (1,845; 0,29-3,02)	^c p=0,000*
3meseca	1,237±0,610 (1,165; 0,12-2,28)	1,619±0,618 (1,735; 0,22-2,83)	^c p=0,000*
6 meseci	1,226±0,580 (1,115; 0,12-2,41)	1,585±0,619 (1,655; 0,20-2,85)	^c p=0,000*
Značajnost ^a	^d p=0,000*	^d p=0,000*	

P- ispitavana grupa; C – kontrolna grupa

^a – Unutargrupno poređenje: između vremena posmatranja; Jednofaktorska analiza varijanse sa ponovljenim merenjem

^b – Poređenje između grupa

^c – T-test za vezane uzorke

^d – Vilkoksonov (Wilcoxon) test za vezane uzorke

* – Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

Posmatranjem nivoa pripojnog epitela (CAL) pre početka inicijalne terapije parodontopatije, nije uočena statistički značajna razlika između leve i desne strane u gornjoj ili donjoj vilici ispitivanih

pacijenata. Međugrupnim poređenjem nakon mesec dana, 3 meseca, ali isto tako i nakon 6 meseci od sprovedene terapije, u grupi P je zabeležen statistički značajan pad vrednosti ovog parametra u odnosu na grupu C. Može se uočiti pozitivan uticaj primene i-PRF-a na promenu vrednosti CAL i nakon celokupnog šestomesečnog intervala praćenja (Tabela 4.2.5. i Grafikon 4.9.).

Vrednost CAL posmatrana u toku vremena i u jednoj i u drugoj grupi se statistički značajno smanjivala (Grafikon 4.7. i 4.8.) i (Tabela 4.2.6.).

Tabela 4.2.6. Unutargrupno poređenje vrednosti CAL u svakom intervalu merenja

CAL				
Grupe	Vrememerenja	0m	1m	3m
P	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,000*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	^a p=0,000*
C	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,000*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	^a p=0,000*

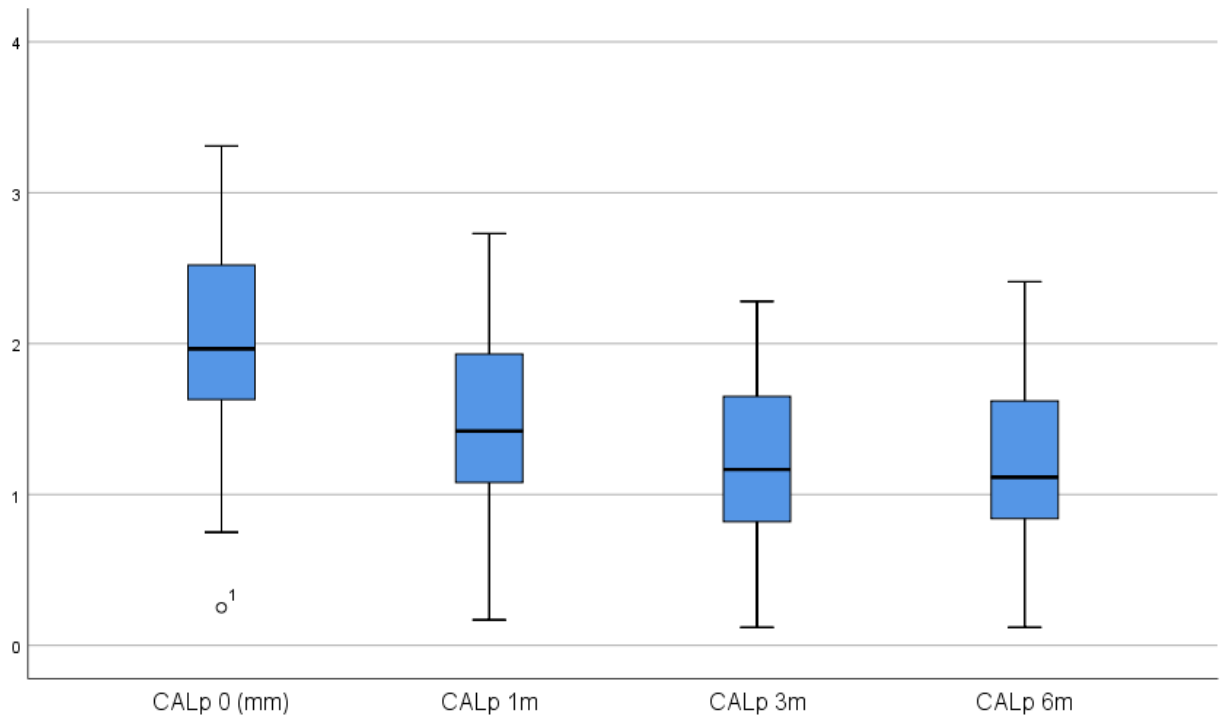
^a- Bonferoni (Bonferroni) test

P- ispitavana grupa; C – kontrolna grupa

*- Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

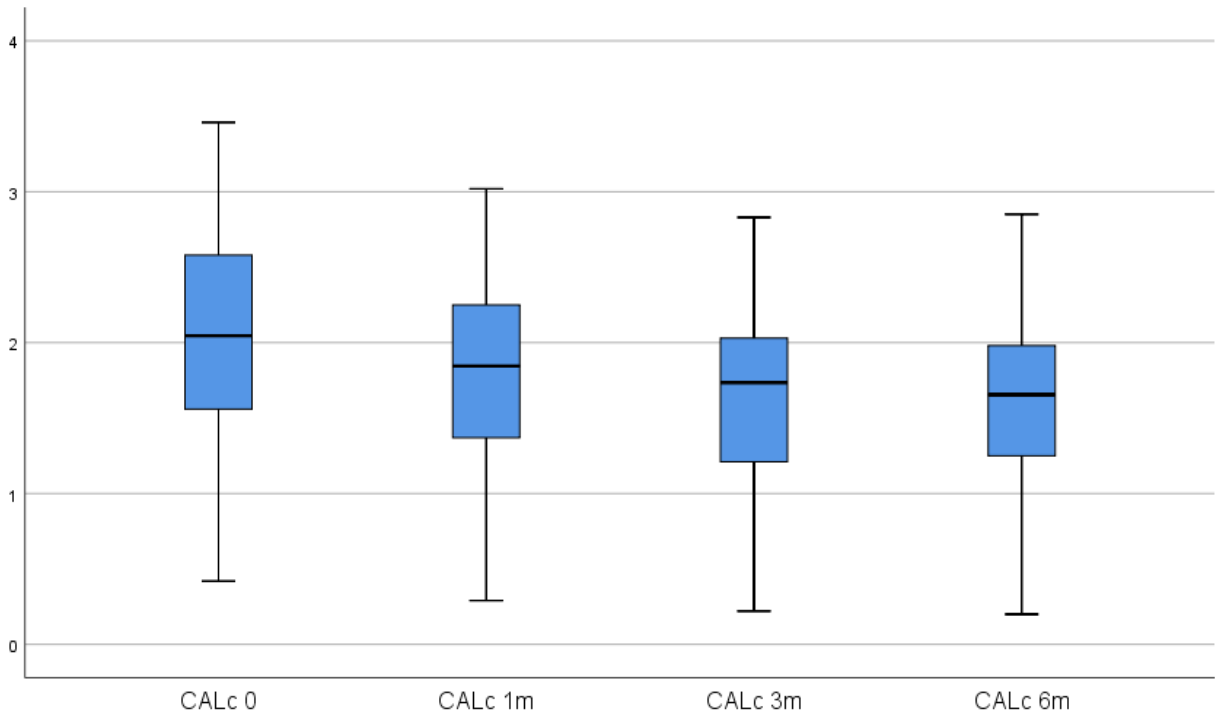
Nivo pripojnog epitela – CAL u ispitivanoj – P grupi

Grafikon 4.7. Srednje vrednosti CAL \pm standardna devijacija (SD) izražene u milimetrima u odnosu na različita vremena posmatranja ovog parametra u ispitivanoj (P) grupi sa intervalom poverenja od 95%.



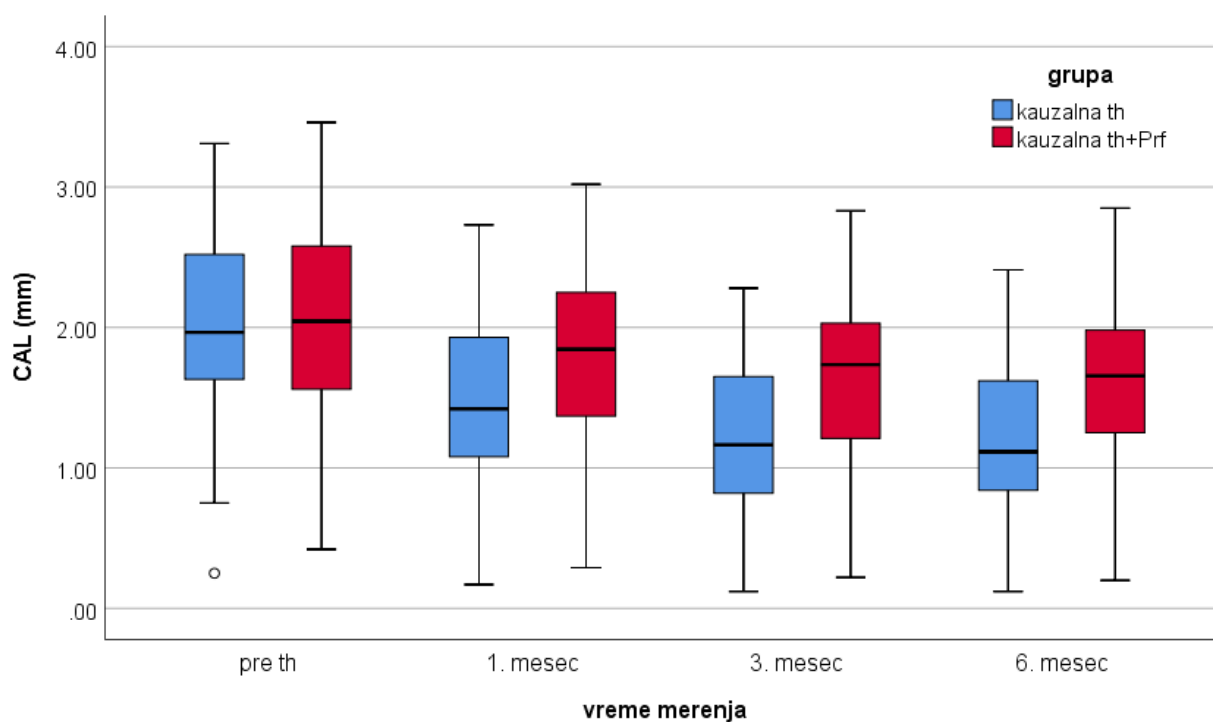
Nivo pripojnog epitela – CAL u kontrolnoj – C grupi

Grafikon 4.8. Srednje vrednosti CAL \pm standardna devijacija (SD) izražene u milimetrima u odnosu na različita vremena posmatranja ovog parametra u kontrolnoj (C) grupi sa intervalom poverenja od 95%.



Medugrupno poređenje vrednosti nivoa pripojnog epitela – CAL

Grafikon 4.9. Srednje vrednosti CAL \pm standardna devijacija (SD) izražene u milimetrima u odnosu na različita vremena posmatranja ovog parametra u ispitivanoj (P) i kontrolnoj (C) grupi, sa intervalom poverenja od 95%



KRVARENJE NA PROVOKACIJU (engl. *bleeding on probing* – BOP)

Tabela 4.2.7. Međugrupno i unutargrupno poređenje srednjih vrednosti BOP ± standardna devijacija (SD) ; medijana, minimalna i maksimalna vrednost (Med; min-max)

BOP $\bar{x} \pm SD$ (Med; min-max)	Grupa		
Vreme merenja	P	C	Značajnost ^b
0 meseci	1,418±0,714 (1,380; 0,25-2,68)	1,345±0,711 (1,345; 0,00-2,63)	^c p=0,063
1 mesec	0,649±0,454 (0,655; 0,00-1,55)	1,005±0,562 (1,065; 0,08-1,88)	^c p=0,000*
3 meseca	0,298±0,280 (0,195; 0,00-0,85)	0,601±0,392 (0,520; 0,00-1,38)	^c p=0,000*
6 meseci	0,098±0,090 (0,600; 0,00-0,26)	0,257±0,167 (0,235; 0,00-0,59)	^c p=0,000*
Značajnost ^a	^d p=0,000*	^d p=0,000*	

P- ispitavana grupa; C – kontrolna grupa

^a – Unutargrupno poređenje između vremena posmatranja; jednofaktorska analiza varijanse sa ponovljenim merenjem

^b – Poređenje između grupa

^c – T-test za vezane uzorke

^d – Vilkoksonov (Wilcoxon) test za vezane uzorke

* – Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

Pre početka terapije vrednost krvarenja na provokaciju (BOP), testirane između P i C grupe nije pokazivala statistički značajnu razliku. Kada su ove vrednosti upoređivane 1.-og meseca, 3.-eg meseca i 6.-og meseca uočena je statistički značajna razlika (Tabela 4.2.7.).

Unutargrupnim poređenjem, tj. poređenjem vrednosti BOP sa strane vilice koja je tretirana i-PRF-om u sklopu kauzalne terapije došlo je do statistički značajnog smanjenja vrednosti ovog parametra i to se

uočava upoređivanjem svih vremena praćenja (Tabela 4.2.8., Grafikoni 4.10. i 4.11.). Za razliku od ove grupe, vrednost BOP sa strane vilice koja je lečena samo kauzalnom terapijom nije pokazala statistički značajne promene nakon prvog meseca praćenja (Tabela 4.2.8.).

Tabela 4.2.8. Unutargrupno poređenje vrednosti BOP u svakom intervalu merenja

BOP				
Grupe	Vreme merenja (meseci)	0m	1m	3m
P	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,000*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	^a p=0,000*
C	1m	^a p=0,077	/	^a p=0,000*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	^a p=0,000*

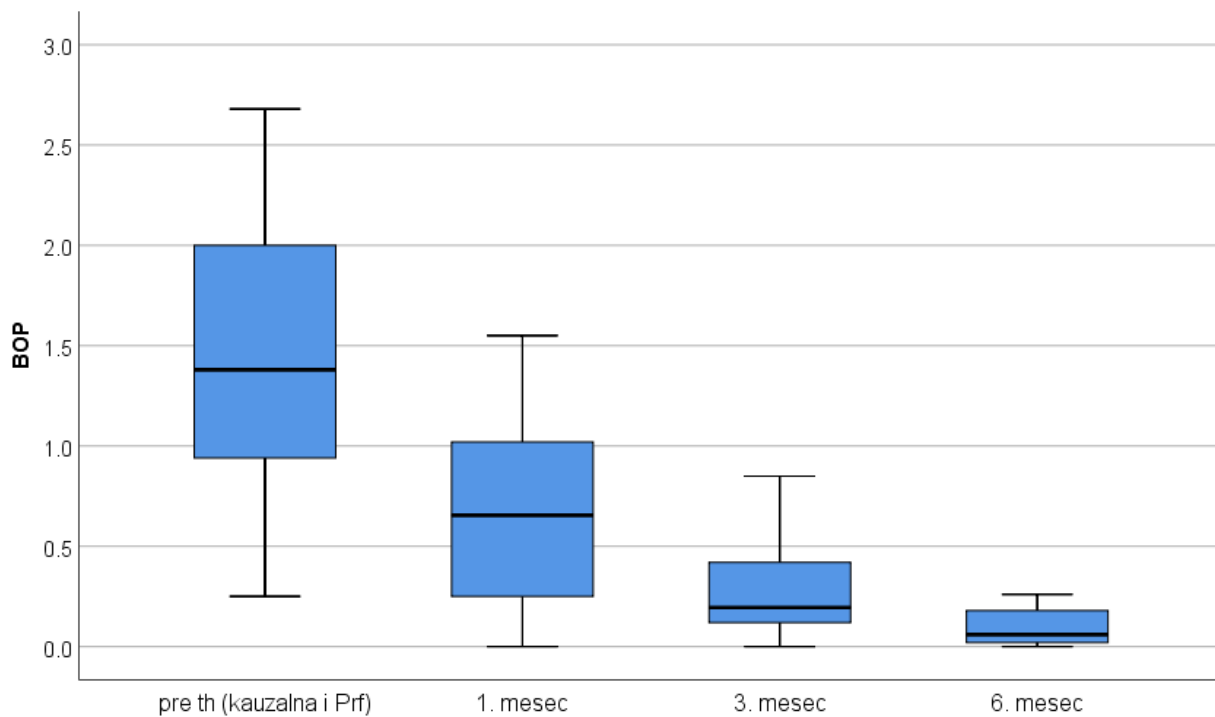
^a-Bonferoni (Bonferroni) test

P- ispitavana grupa; C – kontrolna grupa

*– Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

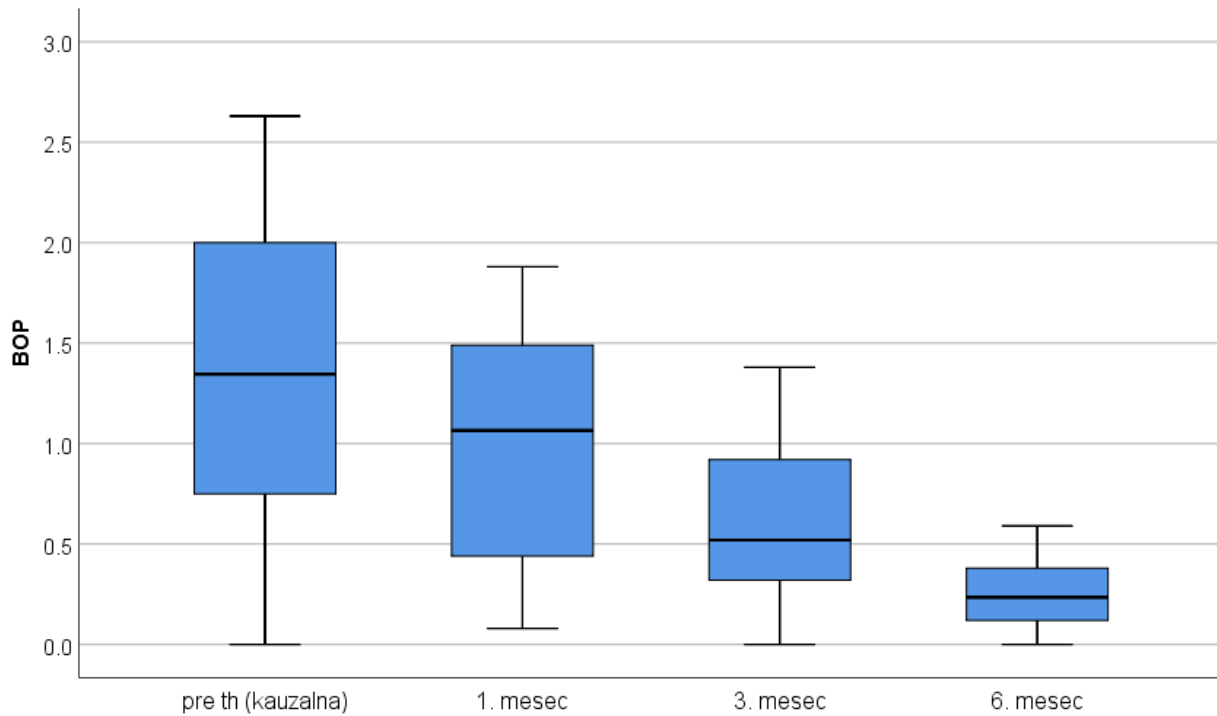
Krvarenje na provokaciju – BOP u ispitivanoj – P grupi

Grafikon 4.10. Srednje vrednosti BOP \pm standardna devijacija (SD) u odnosu na različita vremena posmatranja ovog parametra u ispitivanoj (P) grupi sa intervalom poverenja od 95%



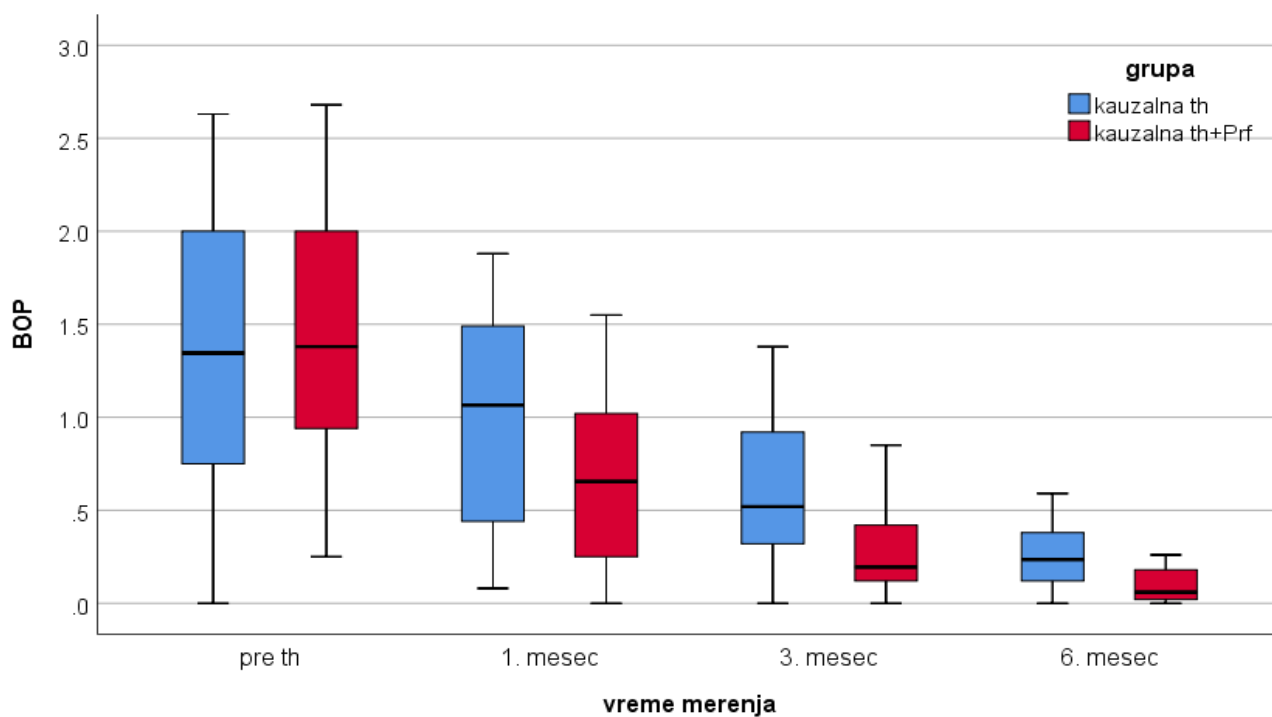
Krvarenje na provokaciju – BOP u kontrolnoj – C grupi

Grafikon 4.11. Srednje vrednosti BOP \pm standardna devijacija (SD) u odnosu na različita vremena posmatranja ovog parametra u kontrolnoj (C) grupi, sa intervalom poverenja od 95%



Međugrupno poređenje krvarenja na provokaciju – BOP

Grafikon 4.12. Srednje vrednosti BOP \pm standardna devijacija (SD) u odnosu na različita vremena posmatranja ovog parametra u ispitivanoj (P) i kontrolnoj (C) grupi, sa intervalom poverenja od 95%



PLAK INDEKS (engl. *plaque index* – PI)

Tabela 4.2.9. Međugrupno i unutargrupno poređenje srednjih vrednosti PI ± standardna devijacija (SD); medijana, minimalna i maksimalna vrednost (Med; min-max)

PI x±SD (Med; min-max)	Grupa		Značajnost ^b
	P-grupa	C-grupa	
Vreme merenja			
0meseci	1,231±0,559 (1,220; 0,31-2,38)	1,241±0,565 (1,220; 0,31-2,56)	^c p=0,895
1mesec	0,255±0,202 (0,250; 0,00-1,00)	0,250±0,185 (0,190; 0,00-1,00)	^c p=0,796
3meseca	0,236±0,254 (0,185; 0,00-1,15)	0,212±0,182 (0,190; 0,00-1,00)	^c p=0,597
6meseci	0,199±0,185 (0,180; 0,00-1,00)	0,203±0,184 (0,180; 0,00-1,00)	^c p=0,508
Značajnost ^a	^d p=0,000*	^d p=0,000*	

P- ispitavana grupa; C – kontrolna grupa

^a – Unutargrupno poređenje između vremena posmatranja; jednofaktorska analiza varijanse sa ponovljenim merenjem

^b – Poređenje između grupa

^c – T-test za vezane uzorke

^d – Vilkoksonov (Wilcoxon) test za vezane uzorke

* – Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

Tabela 4.2.10. Unutargrupno poređenje vrednosti PI u svakom intervalu merenja

PI				
Grupe	Vreme merenja (meseći)	0m	1m	3m
P	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,016*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,016*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,006*	^a p=0,023*
C	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,006*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,006*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,001*	^a p=0,004*

^a–Bonferoni (Bonferroni) test: međugrupno poređenje

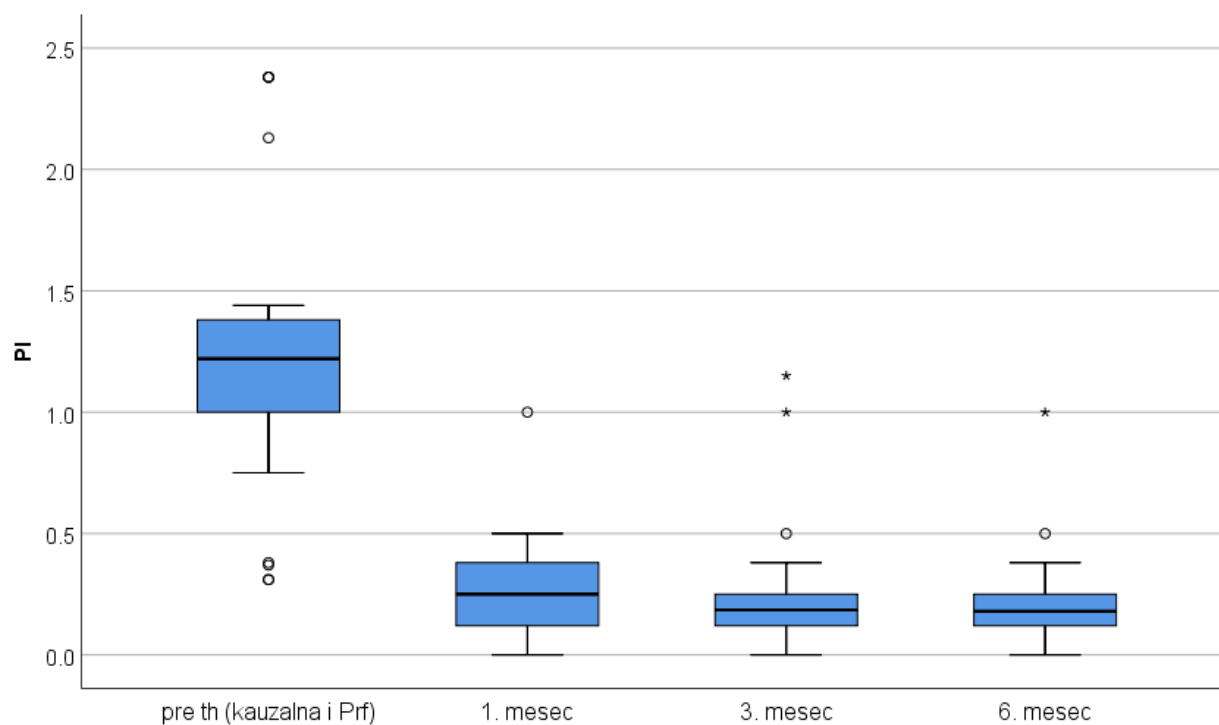
P- ispitavana grupa; C – kontrolna grupa

*– Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

Na početku terapije, kao ni tokom celokupnog terapijskog postupka, nije postojala statistički značajna razlika između izmerenog plak indeksa (PI) između ispitivane (P) i kontrolne (C) strane vilice pacijenata (Tabela 4.2.9., Grafikon 4.15.). Nakon sprovedena obe terapijske metode, tokom šestomesečnog perioda praćenja u svakom merenom intervalu, uočava se statistički značajno smanjenje vrednosti plak indeksa (Tabela 4.2.10., Grafikon 4.13 i 4.14.).

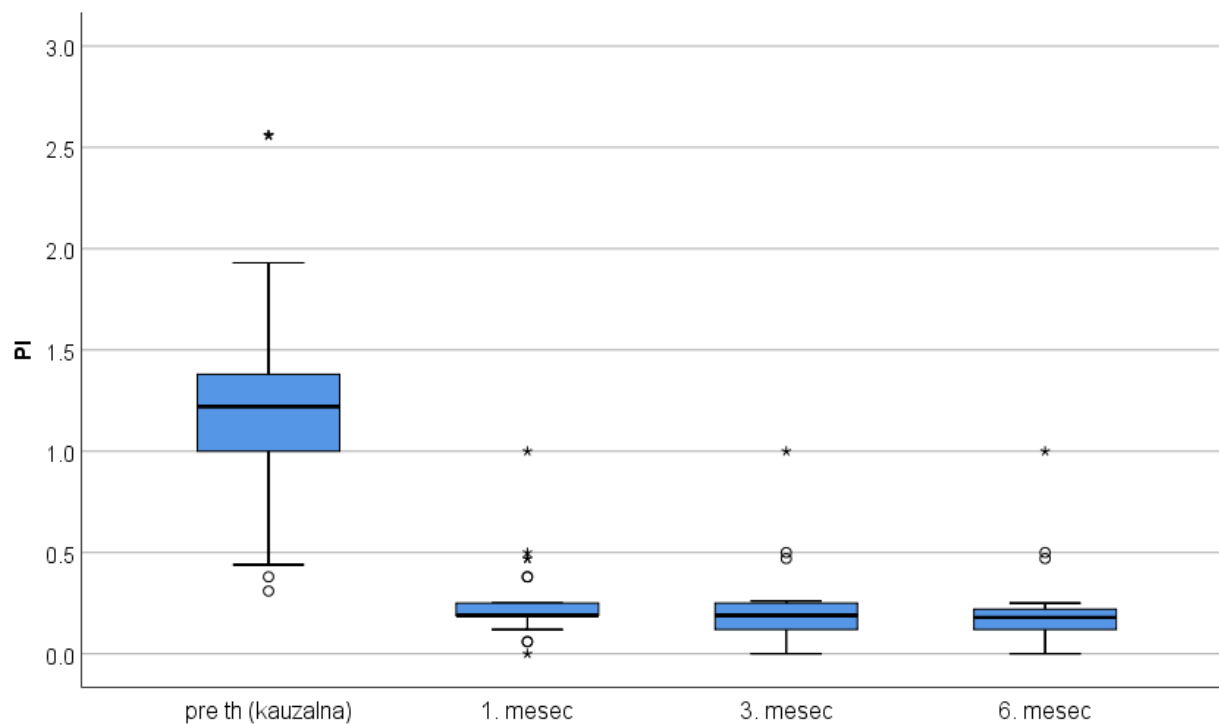
Plak indeks – PI u ispitivanoj – P grupi

Grafikon 4.13. Srednje vrednosti PI \pm standrardna devijacija (SD) izražene u milimetrima u odnosu na različita vremena posmatranja ovog parametra u ispitivanoj (P) grupi, sa intervalom poverenja od 95%



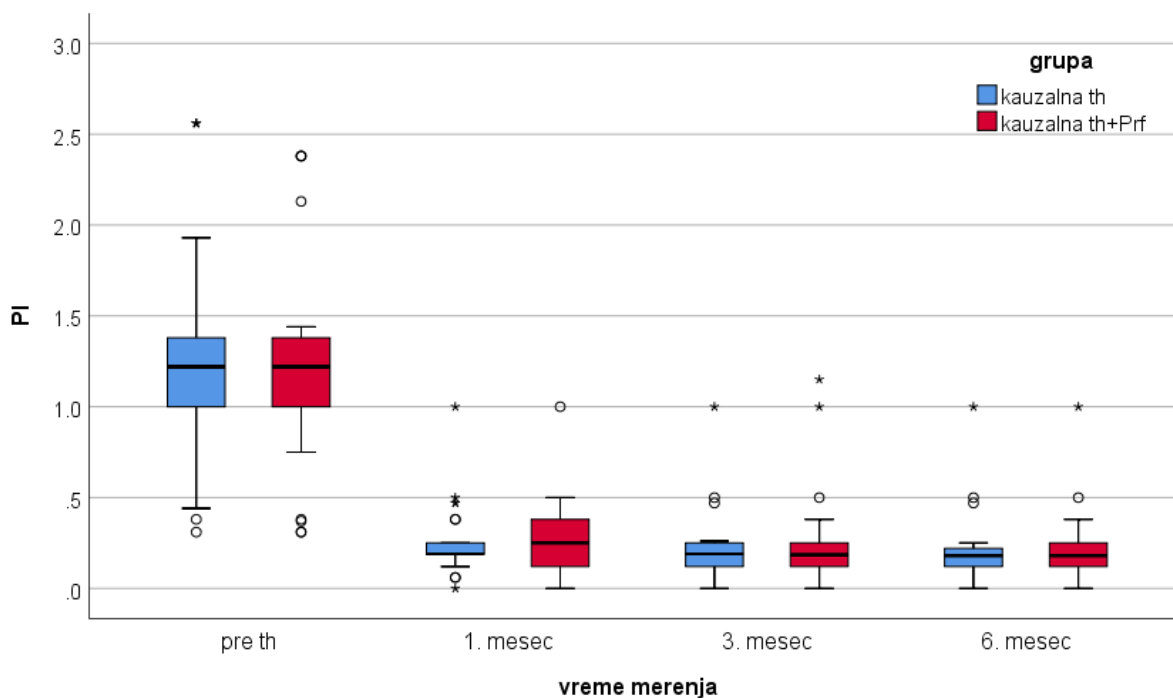
Plak indeks – PI u kontrolnoj – C grupi

Grafikon 4.14. Srednje vrednosti PI \pm standardna devijacija (SD) izražene u milimetrima u odnosu na različita vremena posmatranja ovog parametra u kontrolnoj (C) grupi, sa intervalom poverenja od 95%



Međugrupno poređenje plak indeksa – PI

Grafikon 4.15. Srednje vrednosti PI \pm standardna devijacija (SD) izražene u milimetrima u odnosu na različita vremena posmatranja ovog parametra u ispitivanoj (P) i kontrolnoj (C) grupi, sa i intervalom poverenja od 95%



PARODONTOPATOGENI MIKROORGANIZMI

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A. a.)

Tabela 4.3.1. Procentualna zastupljenost pozitivnih i negativnih uzoraka u ispitivanoj P grupi

Aggregatibacter actinomycetemcomitans- u PRF-grupa (P)					
VREME MERENJA		-	+	Ukupno	Značajnost ^a
1m					
0m	-	6 (20,0%)	0 (0,0%)	6 (20,0%)	^a p=0,000*
	+	19 (63,3%)	5 (16,7%)	24 (80,0%)	
	Ukupno	25 (83,3%)	5 (16,7%)	30(100,0%)	
3m					
1m	-	21 (70,0%)	4 (13,3%)	25 (83,3%)	^a p=0,375
	+	1 (3,3%)	4 (13,3%)	5 (16,7%)	
	Ukupno	22 (73,3%)	8 (26,7%)	30(100,0%)	
6m					
3m	-	13 (43,3%)	9 (30,0%)	22 (73,3%)	^a p=0,004*
	+	0 (0,0%)	8 (26,7%)	8 (26,7%)	
	Ukupno	13 (43,3%)	17 (56,7%)	30(100,0%)	
6m					
0m	-	6 (20,0%)	7 (23,3%)	13 (43,3%)	^a p=0,016*
	+	0 (0,00%)	17 (56,7%)	17 (56,7%)	
	Ukupno	6 (20,00%)	24 (80,0%)	30(100,0%)	

P- ispitavana grupa;

^a Maknemarov (*McNemar*) test –unutargrupno poređenje između različitih vremena, binominalna distribucija;

^b *- Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

Pre početka terapije u P grupi, u koj je sprovedena inicijalna terapija u kombinaciji sa i-PRF-om, u 24 ispitivane regije (80,0%) je uzorak GCF pokazivao prisustvo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.), dok je u 6 (20,0%) slučajeva uzorak bio negativan (Tabela 4.3.1.). Na kraju prvog meseca 25 (83,3%) uzoraka je bilo negativno, dok je 5 (16,7%) uzoraka bilo pozitivno. Zapaža se smanjenje broja pozitivnih uzoraka u P grupi mesec dana nakon sprovedene terapije, ali nije pokazana statistička značajnost.

Između prvog i trećeg meseca praćenja postterapijskih rezultata, uočava se dalje smanjenje broja pozitivnih uzoraka na A. a. koje takođe nije statistički značajno u odnosu na prvi mesec. Na kraju 3.-eg meseca u 8 (26,7%) uzoraka je potvrđeno prisustvo A. a., dok je 22 (73,3%) uzorka nije detektovana DNK ovog mikroorganizma.

Između 3. i 6. meseca primećuje se porast uzoraka pozitivnih na *A. a.*, koji sada pokazuje statističku značajnost. Na kraju 6. meseca više od polovine ispitanih uzoraka, tj. 17 (56,7%) je bilo pozitivno na *A. a.*, a samo preostalih 13 (43,3%) bilo je negativno. Ukoliko uporedimo broj pozitivnih uzoraka pre terapije (24 ili 80,% uzoraka) i nakon 6 meseci 17 (56,7%), videćemo da postoji statistički značajno smanje u broju obolelih mesta kod kojih je prisutna *A. a.*

Tabela 4.3.2. Procentualna zastupljenost pozitivnih i negativnih uzoraka u C grupi

Aggregatibacter actinomycetemcomitans- C kontrolna grupa (AaC)					
VREME MERENJA		-	+	Ukupno	Značajnost ^a
		1m			
0m	-	6 (20,0%)	0 (0,0%)	6 (20,0%)	^a p=0,031*
	+	6 (20,0%)	18 (60,0%)	24 (80,0%)	
	Ukupno	12 (40,0%)	18 (60,0%)	30(1000,0%)	
3m					
1m	-	10 (33,3%)	2 (6,7%)	12 (40%)	^a p=0,687
	+	4 (13,3%)	14 (46,7%)	18 (60,0%)	
	Ukupno	14 (46,7%)	16 (53,3%)	30(1000,0%)	
6m					
3m	-	11 (36,7%)	3 (10,,0%)	14 (46,7%)	^a p=0,250
	+	0 (0,0%)	16 (53,3%)	16 (53,3%)	
	Ukupno	11 (36,7%)	19 (63,3%)	30(1000,0%)	
6m					
0m	-	6 (20,0%)	5 (16,7%)	11 (36,7%)	^a p=0,063
	+	0 (0,00%)	19 (63,3%)	19 (63,3%)	
	Ukupno	6 (20,0%)	24 (80,0%)	30 (100,0%)	

C – kontrolna grupa

^a Maknemarov (*McNemar*) test –unutargrupno poređenje između različitih vremena, binominalna distribucija

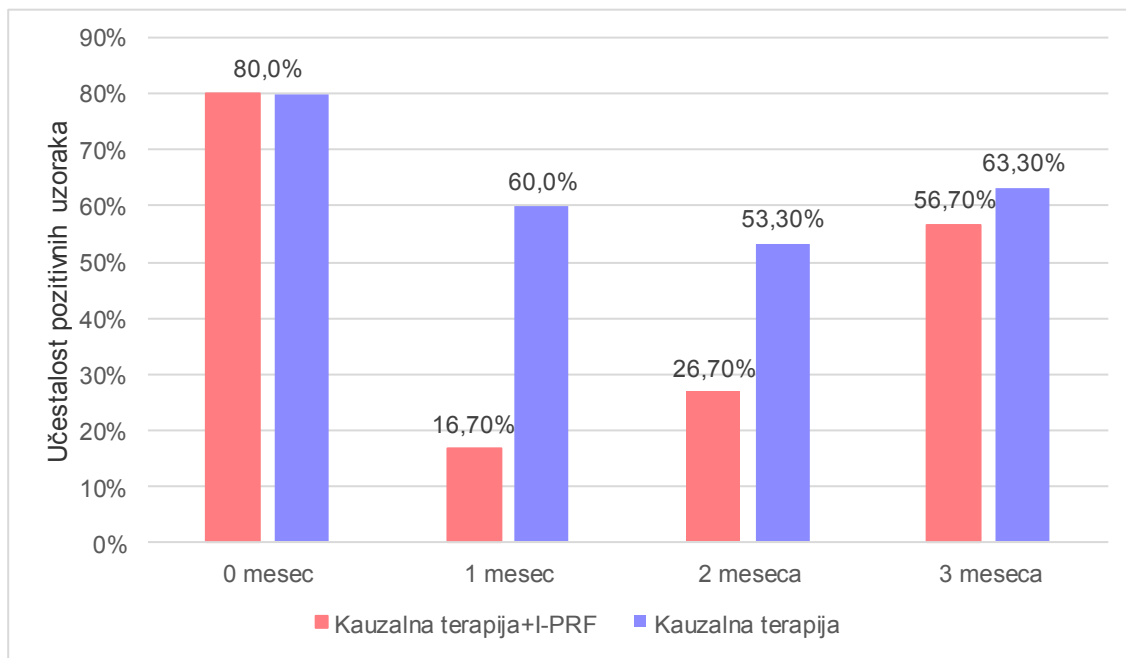
^b *– Statistički značajna razlika $p \leq 0,05$

U C-grupi uzoraka nije uočena statistički značajna razlika u broju uzoraka pozitivnih na *A. a.* tokom šestomesečnog perioda praćenja (Tabela 4.3.2.). Na samom početku praćenja, pre sprovedene inicijalne terapije, u 24 (80,0%) uzorka je potvrđeno prisustvo *A. a.*. Na kraju prvog meseca praćenja 18 (60,0%) uzoraka je bilo pozitivno na *A. a.*, što je pokazalo statistički značajno smanjenje koncentracije ove bakterije. Nakon 3 meseca 16 (53,3%), a nakon 6 meseci 19 (63,3%) pozitivnih uzoraka ukazivali su na promene koncentracije ove bakterije koje potom nisu bile statistički značajne, u smislu smanjenja ii povećanja ovih vrednosti.

Na početku istraživanja nije bilo statistički značajne razlike u broju uzoraka pozitivnih na *A. a.* u P i C grupi po 80,0% (Tabela 4.3.3., Grafikon 4.16.). Posle mesec dana u svakoj grupi postojala je statistički značajna razlika u broju pozitivnih uzoraka između C i P: 18 (60,0%) uzoraka kontrolne grupe bilo je pozitivno na *A. a.*, a svega 5 (16,7%) uzoraka P grupe. Preostalo je svega 5 pozitivni uzoraka od početnih 18. Takođe, posle 3 meseca statistički značajna razlika se uočava u broju pozitivnih nalaza na *A. a.* između grupa i prisutno je statistički značajno manje pozitivnih uzoraka u P grupi. Svega 8 (26,7%) uzoraka je bilo pozitivno na *A. a.* u P grupi, dok je duplo više uzoraka 16 (53,3%) bilo u C grupi. Na kraju 6. meseca nije uočena statistički značajna razlika u broju uzoraka GCF uzetih sa C ili P strane u kojima je pronađena *A. a.* U 17 (56,7%) uzoraka je potvrđena sa P strane, a u 19 uzoraka (63,3%) sa kontrolne strane usta pacijenata koji su učestvovali u ovoj studiji.

Tabela 4.3.3. Međugrupno poređenje procentualno zastupljenih pozitivnih i negativnih uzoraka *A. a.* u P i C grupi

Aggregatibacter actinomycetemcomitans P versus C grupa					
Vreme merenja		-	+	Ukupno	p
AaP-0m					
AaC-0m	-	6 (20,0%)	0 (0,0%)	6 (20,0%)	^a p=0,999
	+	0 (0,0%)	24 (80,0%)	24(80,0%)	
	Ukupno	6 (20,0%)	24 (80,0%)	30 (100%)	
AaP-1m					
AaC-1m	-	12 (40,0%)	0 (0,0%)	12(40,0%)	^a p=0,000*
	+	13 (43,3%)	5 (16,7%)	18 (60,0%)	
	Ukupno	25 (83,3%)	5 (16,7%)	30 (100%)	
AaP-3m					
AaC-3m	-	14 (46,7%)	0 (0,0%)	14 (46,7%)	^a p=0,008*
	+	8 (26,7%)	8 (26,7%)	16 (53,3%)	
	Ukupno	22 (73,3%)	8 (26,7%)	30 (100%)	
AaP-6m					
AaC-6m	-	11 (36,7%)	0 (0,0%)	11 (36,7%)	^a p=0,500
	+	2 (6,7%)	17 (56,7%)	19 (63,3%)	
	Ukupno	13 (43,3%)	17 (56,7%)	30 (100%)	

Grafikon 4.16. Međugrupno poređenje koncentracije *A. a.* (P i C grupa)

Porphyromonas gingivalis (*P. g.*)

Analizom uzoraka GCF pre početka terapije u svim uzorcima (100,0%) je pronađeno prisustvo *P. g.* Nakon mesec dana od sprovedene inicijalne terapije u kombinaciji sa i-PRF-om prisustvo *P. g.* je potvrđeno u samo 12 (40,0%) uzoraka. Nakon tri meseca je došlo do povećanja ovog broja 21 (70,0%).

Tabela 4.3.4. Procentualna zaspuljenost pozitivnih i negativnih uzoraka *P. g.* u P grupi

<i>Porphyromonas gingivalis</i> -P grupa					
Vreme merenja		-	+	Ukupno	p
		1m			
0m	-	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	^a p=0,999
	+	18 (60,0%)	12 (40,0%)	30(100,0%)	
	Ukupno	18 (60,0%)	12 (40,0%)	30(100,0%)	
3m					
1m	-	7 (23,3%)	11 (36,7%)	18 (60,0%)	^a p=0,022*
	+	2 (6,7%)	10 (33,3%)	12 (40,0%)	
	Ukupno	9 (30,0%)	21 (70,0%)	30(100,0%)	
6m					
3m	-	1 (3,3%)	8 (26,7%)	9 (30,0%)	^a p=0,039*
	+	1(3,3%)	20 (66,7%)	21 (70,0%)	
	Ukupno	2 (6,7%)	28 (93,3%)	30(100,0%)	
6m					
0m	-	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	^a p=0,999
	+	2 (6,7%)	28 (93,3%)	30(100,0%)	
	Ukupno	2 (6,7%)	28 (93,3%)	30(100,0%)	

Maknemarov (*McNemar*) test –unutargrupno poređenje između različitih vremena, binominalna distribucija

^a * – Statistički značajna razlika $p \leq 0,05$

Tabela 4.3.5. Procentulana zastupljenost pozitivnih i negativnih uzoraka u C grupi

<i>Porphyromonas gingivalis</i> - C grupa					
VREME MERENJA		-	+	Ukupno	p
		1m			
0m	-	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	^a p=0,999
	+	2 (6,7%)	28 (93,3%)	30(100,0%)	
	Ukupno	2 (6,7%)	28 (93,3%)	30(100,0%)	
3m					
1m	-	0 (0,0%)	2 (6,7%)	2 (6,7%)	^a p=0,999
	+	3 (10,0%)	25 (83,3%)	28 (93,3%)	
	Ukupno	3 (10,0%)	27 (90,0%)	30(100,0%)	
6m					
3m	-	1 (3,3%)	2 (6,7%)	3 (10,0%)	^a p=0,500
	+	0 (0,0%)	27 (90,0%)	27 (90,0%)	
	Ukupno	1 (3,3%)	29 (96,7%)	30(100,0%)	
6m					
0m	-	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	^a p=0,999
	+	1 (3,3%)	29 (96,7%)	30(100,0%)	
	Ukupno	1 (3,3%)	29(96,7%)	30(100,0%)	

^a- Maknemarov (*McNemar*) test –unutargrupno poređenje između različitih vremena, binominalna distribucija

^b- *– Statistički značajna razlika $p \leq 0,05$

U kontrolnoj C grupi, je nakon početnog detektovanja prisustva *P. g* u svim GCF uzorcima, posle mesec dana bilo 28 (93,3%) pozitivnih uzoraka, a nakon 3 meseca 27 (90,0%) uzoraka. Promene u koncentraciji ovog mikroorganizma nisu pokazivale statistički značajnu razliku (Tabela 4.3.5.).

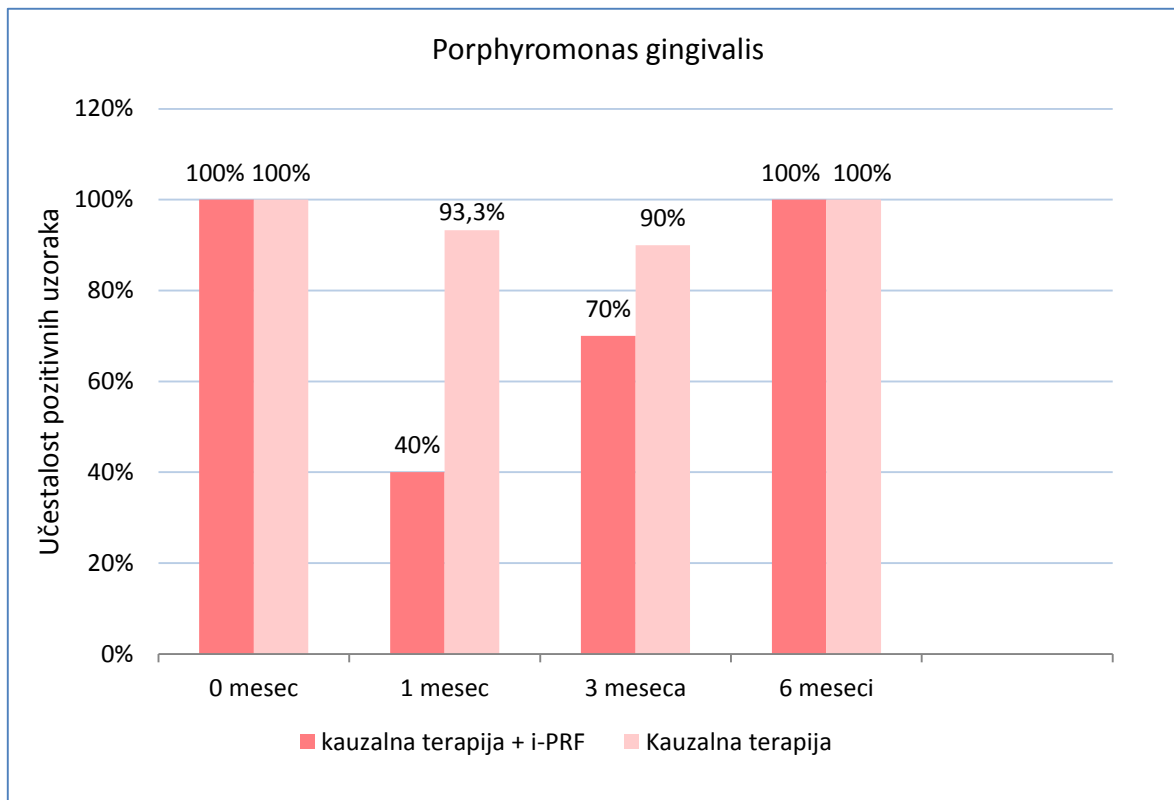
Na početku istraživanja nije bilo statistički značajne razlike u broju uzoraka pozitivnih na *P. g*. u P i C grupi po 100,0% (Tabela 4.3.6., Grafikon 4.17.), niti tokom čitavog perioda ispitivanja između C i P grupe. Nakon 6 meseci može se uočiti da je *P. g*. ponovo detektovana kod svih uzoraka kako u C grupi, tako i u P grupi.

Tabela 4.3.6. Međugrupno poređenje koncentracije *P. g.* (P i C grupa)

Porphyromonas gingivlis - P versus C grupa					
Vreme merenja		-	+	Ukupno	Značajnost ^a
		PgP-0m			
PgC-0m	-	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	^a p=0,999
	+	0 (0,0%)	30 (100,0%)	30 (100,0%)	
	Ukupno	0 (0,0%)	30 (100,0%)	30(100,0%)	
PgP-1m					
PgC-1m	-	1 (3,3%)	1 (3,3%)	2(6,7%)	^a p=0,000*
	+	17 (56,7%)	11 (36,7%)	28 (93,3%)	
	Ukupno	18 (60,0%)	12 (40,0%)	30 (100%)	
PgP-3m					
PgC-3m	-	2(6,7%)	1 (3,3%)	3 (10,0%)	^a p=0,040*
	+	7 (23,3%)	20 (66,7%)	27 (90,0%)	
	Ukupno	9 (30,0%)	21 (70,0%)	30 (100%)	
PgP-6m					
PgC-6m	-	1 (3,3%)	0 (0,0%)	1 (3,3%)	^a p=0,999
	+	1 (3,3%)	28 (93,3%)	29 (96,7%)	
	Ukupno	2 (6,7%)	28 (93,3%)	30 (100%)	

^a- Maknemarov (*McNemar*) test –unutargrupno poređenje između različitih vremena, binominalna distribucija

^b- *– Statistički značajna razlika $p \leq 0,05$

Grafikon 4.17. Međugrupno poređenje uzoraka *P. g.* u svim vremenskim intervalima

Prevotella intermedia – *P. i.*

Tabela 4.3.7. Unutargrupno poređenje u P grupi

<i>Prevotella intermedia</i> -P grupa					
VREME MERENJA		-	+	Ukupno	Značajnost ^a
		1m			
0m	-	3 (10,0%)	0 (0,0%)	3 (10,0%)	^a p=0,000*
	+	15 (50,0%)	12 (40,0%)	27(90,0%)	
		18 (60,0%)	12 (40,0%)	30(100%)	
3m					
1m	-	11 (36,7%)	7 (23,3%)	18(60,0%)	^a p=0,180
	+	2 (6,7%)	10 (33,3%)	12(40,0%)	
		13 (43,3%)	17 (56,7%)	30(100%)	
6m					
3m	-	8 (26,7%)	5 (16,7%)	13(43,3%)	^a p=0,063
	+	0 (0,0%)	17 (56,7%)	17(56,7%)	
		8 (26,7%)	22 (73,3%)	30(100%)	
6m					
0m	-	3 (10,0%)	0 (0,0%)	3 (10,0%)	^a p=0,063
	+	5 (16,7%)	22 (73,3%)	27(90,0%)	
		8 (26,7%)	22 (73,3%)	30(100%)	

^a Maknemarov (*McNemar*) test –unutargrupno poređenje između različitih vremena, binominalna distribucija

^b *- Statistički značajna razlika $p \leq 0,05$

Pre početka terapije u P grupi, u koj je sprovedena inicijalna terapija u kombinaciji sa i-PRF-om, u 27 ispitivanih regija (90,0%) je uzorak GCF pokazivao prisustvo *P. i.* (Tabela 4.3.7.). Na kraju prvog meseca 12 (40,0%) uzoraka je bilo pozitivno, dok je 18 (60,0%) uzoraka bilo negativno. Zapaža se smanjenje broja pozitivnih uzoraka u P grupi mesec dana nakon sprovedene terapije, ali nije pokazana statistička značajnost. Na kraju 3.-eg meseca u 17 (56,7%) uzoraka je potvrđeno prisustvo *P. i.*, dok je 13 (43,3%) uzorka nije detektovana DNK ovog mikroorganizma. Između 3. i 6. meseca primećuje se porast uzoraka pozitivnih na *P. i.* Ukoliko uporedimo broj pozitivnih uzoraka pre terapije (27 ili 90,0% uzoraka) i nakon 6 meseci 22 (73,3%), ipak ne postoji statistički značajno smanje u broju obolelih mesta kod kojih je prisutan mikroorganizam *P. i.*

Tabela 4.3.8. Unutargrupno poređenje koncentracije *P. i.* – C grupa

<i>Prevotellaintermedia</i> -C-grupa					
Vreme merenja		-	+	Ukupno	p
		1m			
0m	-	3 (10,0%)	0 (0,0%)	3 (10,0%)	^a p=0,125
	+	4 (13,3%)	23 (76,7%)	27 (90,0%)	
	Ukupno	7 (23,3%)	23 (76,7%)	30(100,0%)	
3m					
1m	-	7 (23,3%)	0 (0,0%)	7 (23,3%)	^a p=0,250
	+	3 (10,0%)	20 (66,7%)	23 (76,7%)	
	Ukupno	10 (33,3%)	20 (66,7%)	30(100,0%)	
6m					
3m	-	6(20,0%)	4 (13,3%)	10 (33,3%)	^a p=0,125
	+	0 (0,0%)	20(66,7%)	20(66,7%)	
	Ukupno	6 (20,0%)	24 (80,0%)	30(100,0%)	
6m					
0m	-	3 (10,0%)	0 (0,0%)	3 (10,0%)	^a p=0,250
	+	3 (10,0%)	24 (80,0%)	27 (90,0%)	
	Ukupno	6 (20,0%)	24 (80,0%)	30(100,0%)	

^a Maknemarov (*McNemar*) test –unutargrupno poređenje između različitih vremena, binominalna distribucija

^b *– Statistički značajna razlika $p \leq 0,05$

U kontrolnoj C grupi je nakon početnog detektovanja prisustva *P. i.* u 27 (90,0%) uzoraka, posle mesec dana bilo 23 (76,7%) pozitivnih uzoraka, a nakon 3 meseca 20 (66,7%) uzoraka. Promene u koncentraciji ovog mikroorganizma nisu pokazivale statistički značajnu razliku ni posle 6 meseci (24 ili 80,0% pozitivnih uzoraka) (Tabela 4.3.8.).

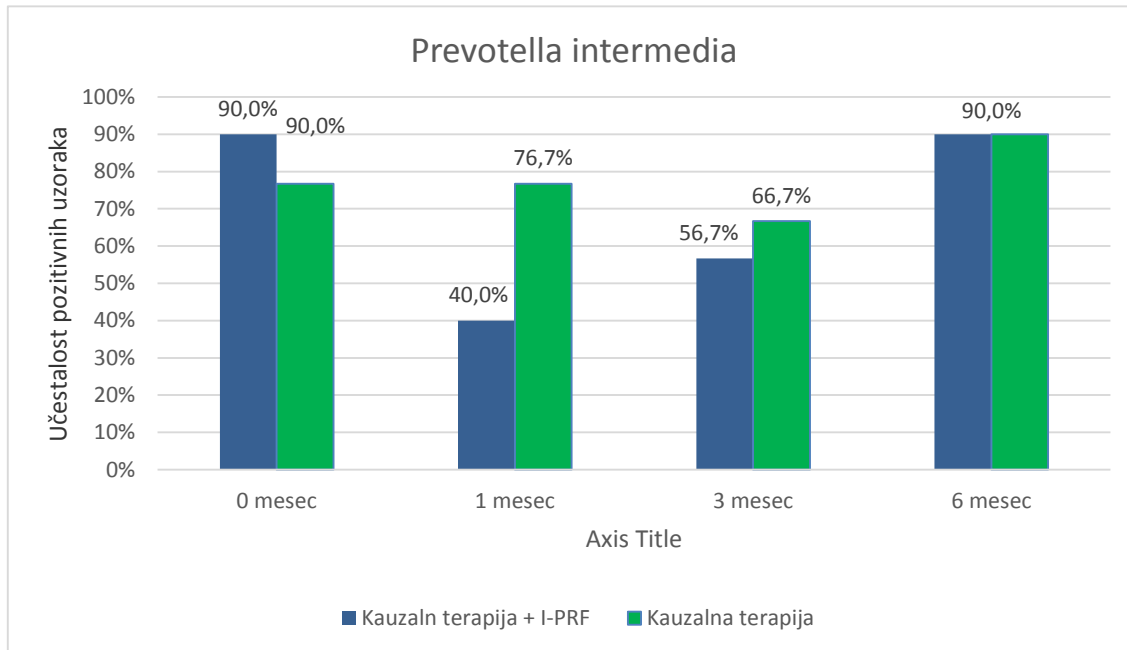
Na početku istraživanja nije bilo statistički značajne razlike u broju uzoraka pozitivnih na *P. i.* u P i C grupi po 27 (90,0%) pozitivnih uzoraka (Tabela 4.3.9., Grafikon 4.18.). Nakon mesec dana zabeležena je statistički značajna razlika između P (40,0%) i C grupe (76,0%). Nakon 3 i 6 meseci ne može se uočiti statistički značajna razlika između ovih grupa u broju pozitivnih uzotaka.

Tabela 4.3.9. - Međugrupno poređenje koncentracije *P. i.* – P I C grupa

Prevotellaintermedia- P versusC-grupa					
Vreme merenja		-	+	Ukupno	p
		Pip-0m			
Pic-0m	-	3 (10,0%)	0 (0,0%)	3 (10,0%)	^a p=0,999
	+	0 (0,0%)	27 (90,0%)	27 (90,%)	
	Ukupno	3 (10,0%)	27 (90,0%)	30 (100,0%)	
Pip-1m					
Pic-1m	-	7 (23,3%)	11 (36,7%)	18(60,0%)	^a p=0,001*
	+	0 (0,0%)	12 (40,0%)	12(40,0%)	
	Ukupno	7 (23,3%)	23 (76,7%)	30 (100,0%)	
Pip-3m					
Pic-3m	-	8 (26,7%)	5 (25,0%)	13 (43,3%)	^a p=0,453
	+	2(6,7%)	15 (50,0%)	17 (56,7%)	
	Ukupno	10 (33,3%)	20 (66,7%)	30 (100,0%)	
Pip-6m					
Pic-6m	-	5 (16,7%)	3 (10,0%)	8 (26,7%)	^a p=0,625
	+	1 (3,3%)	21 (70,0%)	22 (73,3%)	
	Ukupno	6 (20,0%)	24 (80,0%)	30 (100,0%)	

^a Maknemarov (*McNemar*) test –unutargrupno poređenje između različitih vremena, binominalna distribucija

^b *- Statistički značajna razlika $p \leq 0,05$

Grafikon 4.18. Međugrupno poređenje *P. i.* u svim vremenima praćenja

Tannerella forsythia – *T. f.*Tabela 4.3.10. Unutargrupno poređenje koncentracije *T. f.* – P grupa

<i>Tannerella forsythia</i> - P grupa					
Vreme merenja		-	+	Ukupno	p
		1m			
0m	-	6 (24,0%)	0 (0,0%)	6 (20,0%)	^a p=0,000*
	+	17 (56,7%)	7 (23,3%)	24(80,0%)	
	Ukupno	23 (76,7%)	7 (23,3%)	30(100,0%)	
3m					
1m	-	18 (60,0%)	5 (16,7%)	23 (76,7%)	^a p=0,219
	+	1 (3,3%)	6 (20,0%)	7 (23,3%)	
	Ukupno	19 (63,3%)	11 (36,7%)	30(100,0%)	
6m					
3m	-	12 (40,0%)	7 (23,3%)	19 (63,3%)	^a p=0,070
	+	1 (3,3%)	10 (33,3%)	11 (36,7%)	
	Ukupno	13 (43,3%)	17 (56,7%)	30(100,0%)	
6m					
0m	-	6 (24,0%)	0 (0,0%)	6 (24,0%)	^a p=0,016
	+	7 (23,3%)	17 (56,7%)	24 (80,0%)	
	Ukupno	13 (43,3%)	17 (56,7%)	30(100,0%)	

^a Maknemarov (*McNemar*) test –unutargrupno poređenje između različitih vremena, binominalna distribucija

^b *– Statistički značajna razlika $p \leq 0,05$

U P grupi je analizom GCF pre početka terapije u 24 (80,0%) uzorka pronađeno prisustvo *T. f.* . Nakon mesec dana od sprovedene inicijalne terapije u kombinaciji sa i-PRF-om prisustvo *T. f.* je potvrđeno u samo 7 (23,3%) uzoraka. Nakon tri meseca je došlo do povećanja ovog broja 11 (36,7%), dok se nakon 6 meseci ovaj mikroorganizam detektuje kod svih pacijenata kod kojih je pronađen pre početka terapije (Tabela 4.3.10.).

Tabela 4.3.11.- Unutargrupno poređenje koncentracije *T. f.* – C grupa

<i>Tannerellaforsythia</i> - Cgrupa					
Vreme merenja		-	+	Ukupno	p
		1m			
0m	-	4 (13,3%)	2 (6,7%)	6 (20,0%)	^a p=0,999
	+	3 (10,0%)	21 (70,0%)	24(80,0%)	
	Ukupno	7 (23,3%)	23 (76,7%)	30(100,0%)	
3m					
1m	-	5 (16,7%)	2 (6,7%)	7 (2,3%)	^a p=0,999
	+	1 (3,3%)	22 (73,3%)	23 (76,7%)	
	Ukupno	6 (20,0%)	24 (80,0%)	30(100,0%)	
6m					
3m	-	4 (13,3%)	2 (6,7%)	6 (20,0%)	^a p=0,999
	+	2 (6,7%)	22 (73,3%)	24 (80,0%)	
	Ukupno	6 (20,0%)	24 (80,0%)	30(100,0%)	
6m					
0m	-	4 (13,3%)	2 (6,7%)	6 (20,0%)	^a p=0,999
	+	2 (6,7%)	22 (73,3%)	24 (80,0%)	
	Ukupno	6 (20,0%)	24 (80,0%)	30(100,0%)	

^a Maknemarov (*McNemar*) test –unutargrupno poređenje između različitih vremena, binominalna distribucija

^b *- Statistički značajna razlika $p \leq 0,05$

U kontrolnoj C grupi je nakon početnog detektovanja prisustva *P. i.* u 24 (80,0%) uzoraka, posle mesec dana bilo 23 (76,7%) pozitivnih uzoraka. Broj pozitivnih uzoraka se vratio na početnu vrednost već nakon 3 meseca i zadržao i nakon 6 meseci 24 (80,0%) (Tabela 4.3.11.).

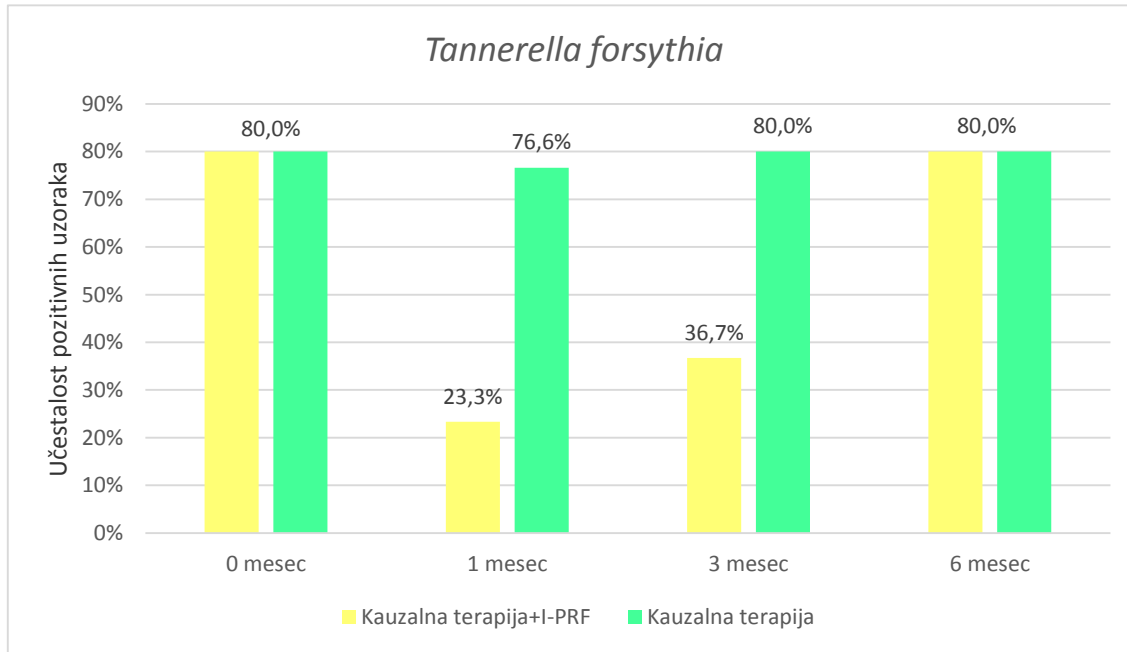
Na početku istraživanja nije bilo statistički značajne razlike u broju uzoraka pozitivnih na *T. f.* u P i C grupi po 24 (80,0%) pozitivnih uzoraka (Tabela 4.3.12., Grafikon 4.19.). Nakon mesec dana zabeležena je statistički značajna razlika između P (23,3%) i C grupe (76,7%), kao i nakon 3 meseca: P (36,7%) i C (80,0%). Nakon 6 meseci ne može se uočiti statistički značajna razlika između ovih grupa u broju pozitivnih uzoraka, jer su identične početnim vrednostima.

Tabela 4.3.12. Međugrupno poređenje *T. f.* – P i C grupa

<i>Tannerellaforsythia</i> – P versus C grupa					
Vreme merenja		-	+	Ukupno	Značajnost ^a
		Tfp-0m			
Tfc-0m	-	6 (20,0%)	0 (0,0%)	6 (20,0%)	^a p=0,999
	+	0 (0,0%)	24 (80,0%)	24 (80,0%)	
	Ukupno	6 (20,0%)	24 (80,0%)	30 (100%)	
Tfp-1m					
Tfc-1m	-	7 (16,7%)	16 (53,3%)	23 (76,7%)	^a p=0,000*
	+	0 (0,0%)	7 (16,7%)	7 (16,7%)	
	Ukupno	7 (16,7%)	23 (76,7%)	30(100,0%)	
Tfp-3m					
Tfc-3m	-	5 (16,7%)	14 (46,7%)	19 (63,3%)	^a p=0,001*
	+	1 (3,3%)	10 (33,3%)	11 (36,7%)	
	Ukupno	6 (20,0%)	24 (80,0%)	30(100,0%)	
Tfp-6m					
Tfc-p		4 (13,3%)	9 (30,0%)	13 (43,3%)	^a p=0,065
		2 (6,7%)	15 (50,0%)	17 (56,7%)	
	Ukupno	6 (20,0%)	24 (80,0%)	30(100,0%)	

^a- Maknemarov (*McNemar*) test – unutargrupno poređenje između različitih vremena, binominalna distribucija

^b- *– Statistički značajna razlika $p \leq 0,05$

Grafikon 4.19. Medugrupno poređenje *T. f.* – P i C grupa

4.4. Alkalna fosfataza (ALP), faktor nekroze tumora- α (TNF- α) i matriksna metaloproteinaza-8 (MMP-8)

Tabela 4.4.1. Koncentracija alkalne fosfataze (ALP) u pg/ml

ALP (pg/ml) $\bar{X} \pm SD$ mm (Med; min-max)	Grupa		
Vreme merenja	P	C	Značajnost ^b
0 meseci	280,496 \pm 95,941 (301,335; 106,456- 436,353)	280,852 \pm 96,263 (301,335; 107,146-436,352)	^c p=0,753
1 mesec	116,936 \pm 37,529 (109,707; 58,321-225,092)	199,666 \pm 76,413 (190,566; 76,413-100,642)	^c p=0,000*
3 meseca	145,716 \pm 49,959 (129,760; 77,266-274,844)	216,835 \pm 79,486 (202,401;99,764-379,115)	^c p=0,000*
6 meseci	237,554 \pm 79,872 (247,508; 87,058-397,300)	268,905 \pm 90,331 (283,667; 102,171-421,622)	^c p=0,000*
Značajnost ^a	^d p=0,000*	^d p=0,000*	

P– ispitavana grupa; C- kontrolna grupa

^a –Unutargrupno poređenje između vremena posmatranja; jednofaktorska analiza varijanse sa ponovljenim merenjem

^b – Poređenje između grupa

^c – T-test za vezane uzorke

^d – Vilkoksonov (Wilcoxon) test za vezane uzorke

*–Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

Poređenjem uzoraka GCF uzetih sa ispitivane P i kontrolne C strane usta u trenutku prvog pregleda, a pre otpočinjanja inicijalne terapije, nije bilo statistički značajne razlike u izmerenim koncentracijama alkalne fosfataze (ALP) (Tabela 4.4.1.). Nakon sprovedene terapije uočava se statistički značajno smanjenje koncentracije ALP između ovog vremena merenja i mesec dana nakon terapije u ispitivanoj grupi uzoraka (Tabela 4.4.2.). U sledećim merenjima dolazi do statistički značajnog povećanja koncentracije ALP-a, ali se na

kraju šestomesečnog perioda praćenja ne dostiže početna vrednost (Grafikon 4.20. i 4.21.). Slične vrste promena u koncentraciji se uočavaju i u kontrolnoj grupi, sa tom razlikom da se promena koncentracije ALP-a između prvog i trećeg meseca statistički ne razlikuje (Tabela 4.4.2.). I pored sličnosti u načinu promena vrednosti koncentracija ALP-a između grupa u svakom postterapijskom merenju ipak postoji statistički značajna razlika, koja se zadržava i do kraja 6.-og meseca (Tabela 4.4.1, Grafikon 4.22.).

Tabela 4.4.2. Unutargrupno poređenje u pojedinim vremenima merenja

ALP				
Grupe	Vreme merenja (meseci)	0m	1m	3m
P	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,000*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	^a p=0,000*
C	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,210
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,210	/
	6m	^a p=0,007*	^a p=0,000*	^a p=0,000*

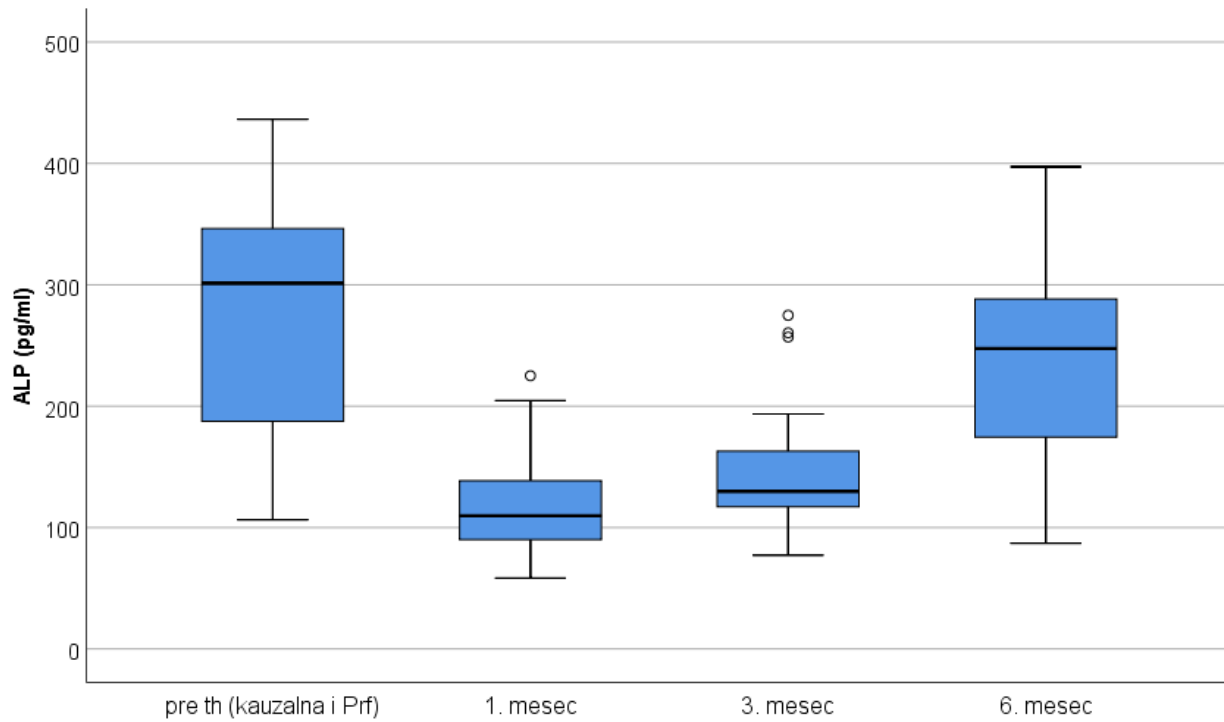
^a-Bonferoni (Bonferroni) test: unutargrupno poređenje

P-ispitivana grupa; C- kontrolna grupa

*-Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

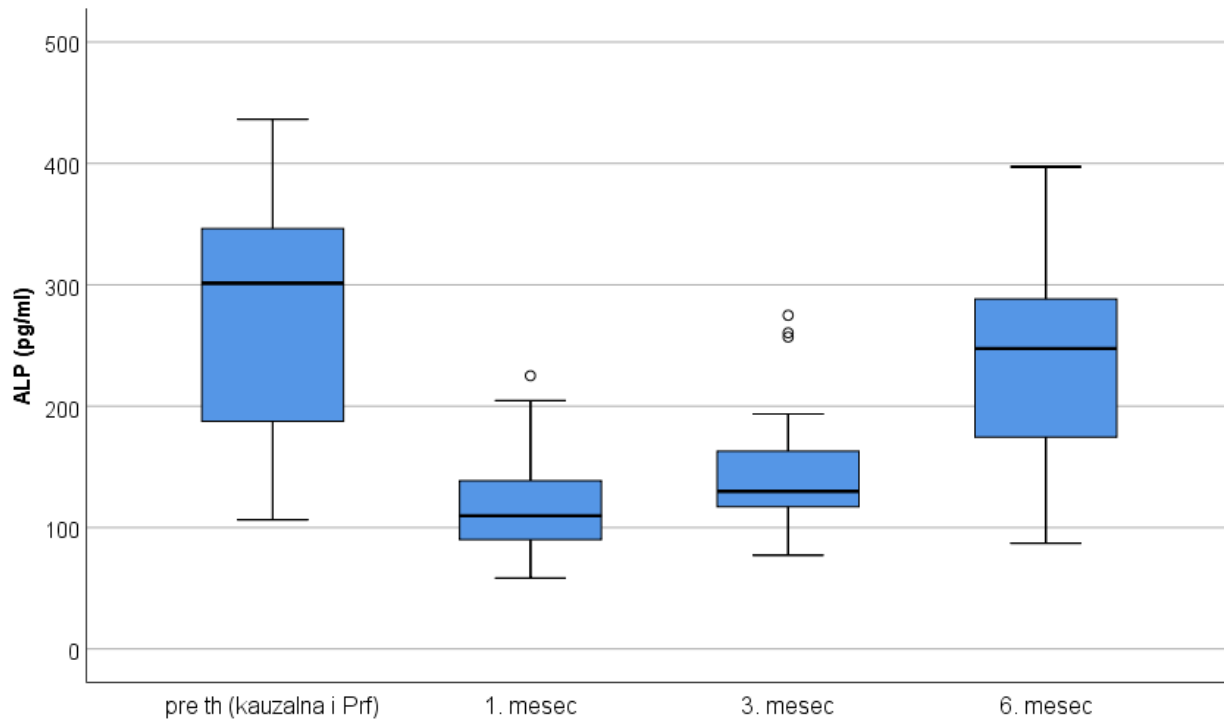
Grafikon 4.20. Srednje vrednosti koncentracije (Mean) alkalne fosfataze (ALP) pg/ml u ispitivanoj P grupi sa standardnim devijacijama (SD) u različitim vremenima merenja; interval poverenja 95%

ALP – P

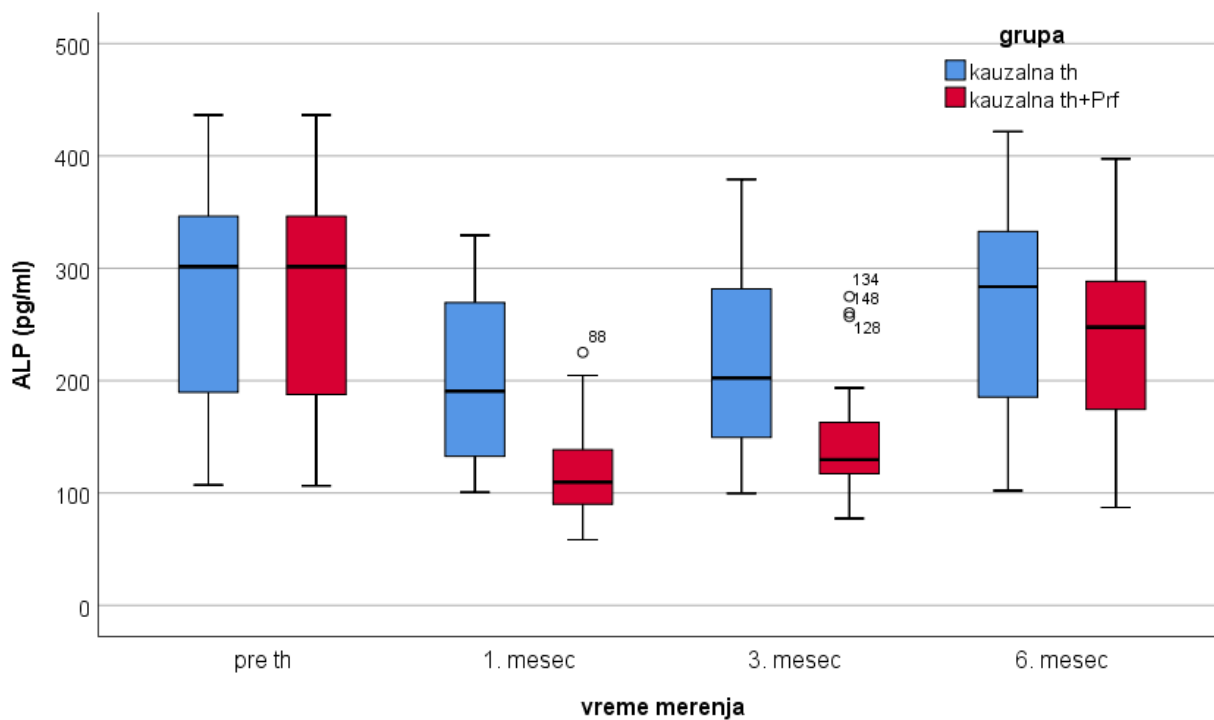


Grafikon 4.21. Srednje vrednosti koncentracije (Mean) alkalne fosfataze (ALP) pg/ml u kontrolnoj C grupi sa standardnim devijacijama (SD) u različitim vremenima merenja; interval poverenja 95%.

ALP – C



Grafikon 4.22. Međugrupno poređenje srednjih vrednosti koncentracije (Mean) alkalne fosfataze (ALP) pg/ml u ispitivanoj i kontrolnoj C grupi sa standardnim devijacijama (SD) u različitim vremenima merenja; interval poverenja 95%



MMP – 8

Tabela 4.4.3. Koncentracija matriksne-matelo proteinaze-8 (MMP-8) u pg/ml

MMP-8 (pg/ml) $\bar{X} \pm SD$ mm (Med; min-max)	Grupa		
Vreme merenja	P	C	Značajnost ^b
0 meseci	11,315±1,741 (10,525; 9,220- 15,248)	11,336±1,720 (10,706; 9,920-15,248)	^c p=0,671
1 mesec	7,906±1,356 (8,112; 4,388-10,441)	9,964±1,488 (10,220; 5,765-13,257)	^c p=0,000*
3 meseca	6,010±1,357 (5,872; 3,140-8,957)	9,061±1,364 (9,138; 6,593-12,685)	^c p=0,000*
6 meseci	4,681±1,465 (4,400; 2,433-7,895)	8,642±1,303 (8,900; 5,309-11,922)	^c p=0,000*
Značajnost ^a	^d p=0,000*	^d p=0,000*	

P – ispitavana grupa; C – kontrolna grupa

^a – Unutargrupno poređenje između vremena posmatranja; jednofaktorska analiza varijanse sa ponovljenim merenjem^b – Poređenje između grupa

c– T-test za vezane uzorke

d– Vilkoksonov (Wilcokson) test za vezane uzorke

*–Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

Analizom rezultata dobijenih merenjem koncentracije MMP-8 u uzorcima GCF uzetih sa ispitivane i kontrolne strane usta pre početka terapije, uočava se odsustvo statistički značajne razlike (Tabela 4.4.3.). Posmatranjem rezultata dobijenih merenjem nakon mesec dana, tri meseca i šest meseci, uočava se statistički značajno smanjenje u P grupi uzoraka (Tabela 4.4.4. i Grafikon 4.23). U kontrolnoj grupi uzoraka se isto tako uočava statistički značajno smanjenje koncentracije MMP-8, osim između trećeg i šestog meseca merenja (Tabela 4.4.4. i Grafikon 4.24.).

Između ove dve grupe postoji statistički značajna razlika u svakom vremen merenja unutar i nakon šestomesečnog perioda praćenja (Grafikon 4.25.). Može se reći da je aplikacija i-PRf-a imala uticaj na koncentraciju matriksne metalo proteinze 8 u GCF.

Tabela 4.4.4. Unutargrupno poređenje u pojedinim vremenima merenja

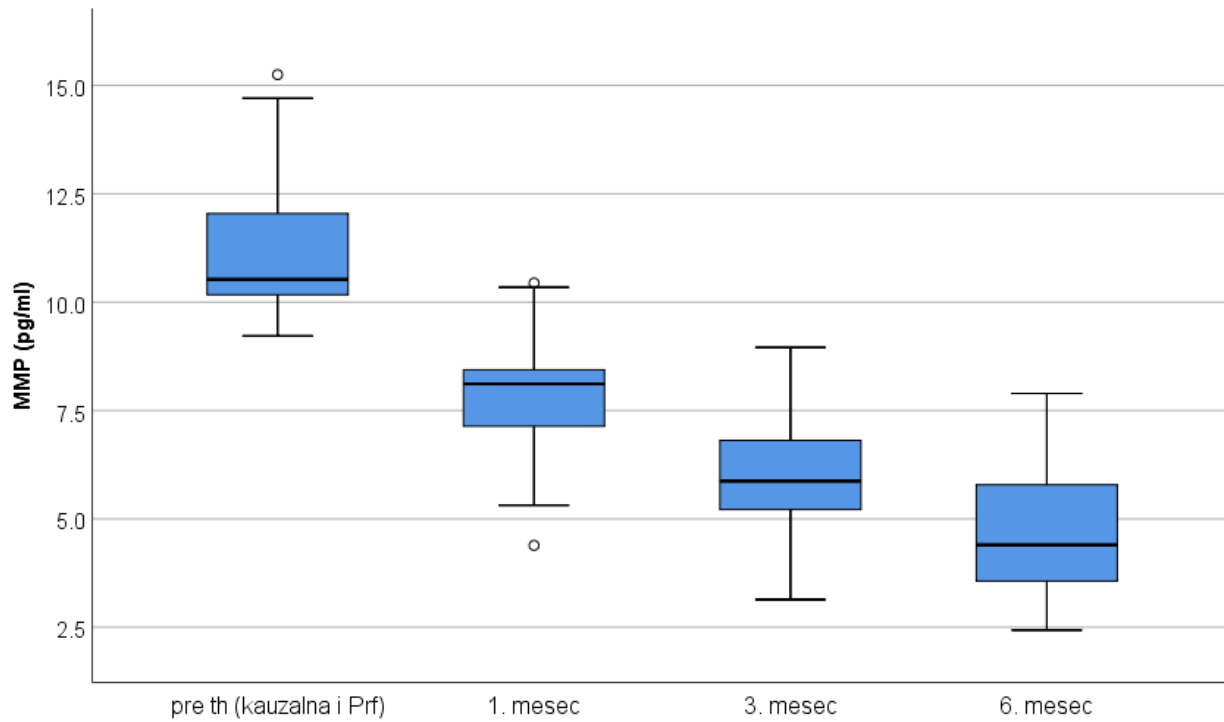
MMP-8				
Grupe	Vreme merenja (meseći)	0m	1m	3m
P	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,000*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	^a p=0,000*
C	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,000*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,001*	^a p=0,288

^a-Bonferoni test: unutargrupno poređenje

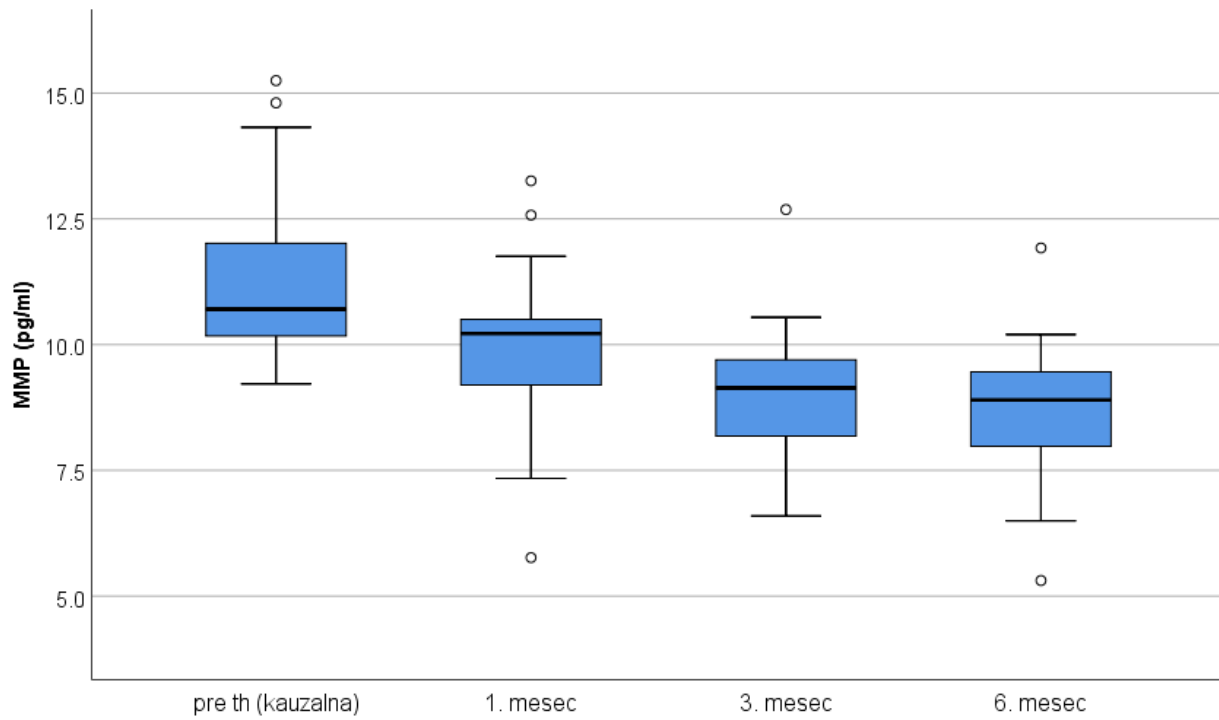
P-ispitivana grupa; C- kontrolna grupa

*-Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

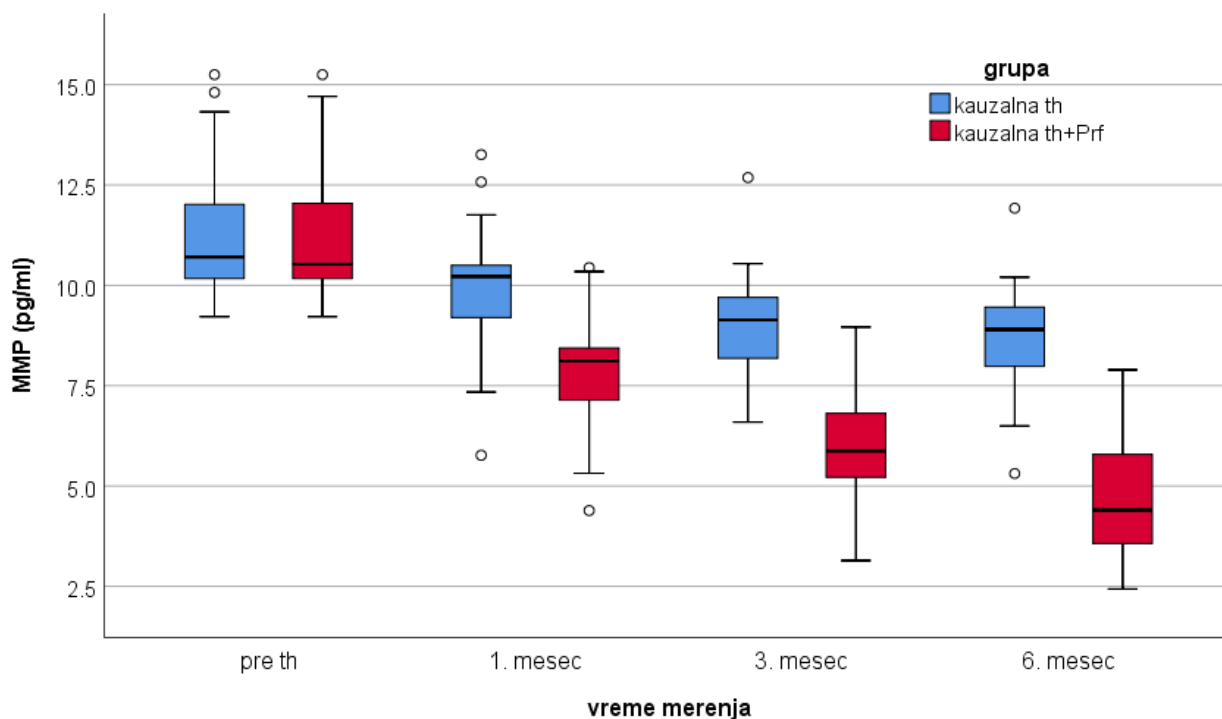
Grafikon 4.23. Srednje vrednosti koncentracije (Mean) matriksne-metaloproteinaze-8 (MMP-8) pg/ml u ispitivanoj P grupi sa standardnom devijacijom (SD) u različitim vremenima merenja; interval poverenja 95%.



Grafikon 4.24. Srednje vrednosti koncentracije (Mean) matriksne-metaloproteinaze-8 (MMP-8) pg/ml u kontrolnoj C grupi sa standardnim devijacijama (SD) u različitim vremenima merenja; interval poverenja 95%.



Grafikon 4.25. Međugrupno poređenje srednjih vrednosti koncentracije (Mean) matriksne-metaloproteinaze-8 (MMP-8) pg/ml u ispitivanoj i kontrolnoj C grupi sa standardnom devijacijom (SD) u različitim vremenima merenja; interval poverenja 95%.



Faktor nekroze tumora- α (TNF- α)

Tabela 4.4.5. Koncentracija faktora nekroze tumora- α (TNF- α) u pg/ μ l

TNF- α $\bar{X}\pm$ SD mm (Med; min-max)	Grupa		
Vreme merenja	P	C	Značajnost ^b
0 meseci	0,925 \pm 0,109 (0,955; 0,715- 0,103)	0,918 \pm 0,105 (0,957; 0,702- 1,103)	^c p=0,000*
1 mesec	0,382 \pm 0,040 (0,393; 0,297- 0,472)	0,782 \pm 0,092 (0,785; 0,596- 0,945)	^c p=0,000*
3 meseca	0,259 \pm 0,040 (0,247; 0,456- 0,353)	0,587 \pm 0,104 (0,594; 0,412- 0,880)	^c p=0,000*
6 meseci	0,238 \pm 0,034 (0,335; 0,208- 0,342)	0,456 \pm 0,072 (0,458; 0,316- 0,648)	^c p=0,000*
Značajnost ^a	^d p=0,000*	^d p=0,000*	

P– ispitavana grupa; C– kontrolna grupa

^a – Unutargrupno poređenje između vremena posmatranja; jednofaktorska analiza varijanse sa ponovljenim merenjem

^b – Poređenje između grupa

^c – T-test za vezane uzorke

^d – Vilkoksonov (Wilcoxon) test za vezane uzorke

*– Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

Merenjem vrednosti koncentracija TNF- α pre početka terapije u GCF ispitivane i kontrolne strane usta nije pronađena statistički značajna razlika. U ispitivanoj P grupi uzoraka uočava se statistički značajno smanjenje koncentracije ovog interleukina do kraja perioda praćenja (Tabela 4.4.5., Tabela 4.4.6. i Grafikon 4.26.), kao i u kontrolnoj grupi (Tabela 4.4.5., Tabela 4.4.6. i Grafikon 4.27.). Između pojedinih grupa uzoraka u prvom i trećem mesecu nakon sprovedene terapije se uočava statistički značajna razlika, dok nakon 6 meseci ta razlika više ne pokazuje statističku značajnost (Tabela 4.4.5.).

Tabela 4.4.6. Unutargrupno poređenje u pojedinim vremenima merenja

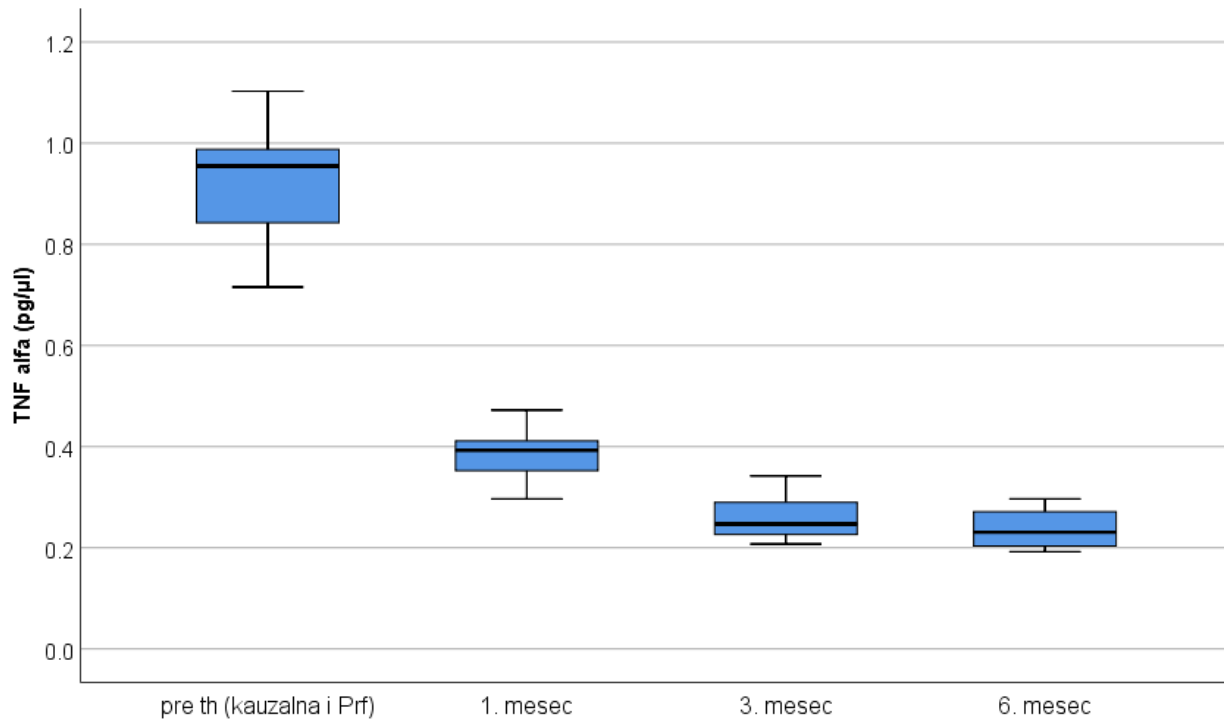
TNF- α				
Grupe	Vreme merenja (meseći)	0m	1m	3m
P	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,000*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	^a p=0,004*
C	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,000*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,000*	^a p=0,000*

^a-Bonferoni (Bonferroni) test: unutargrupno poređenje

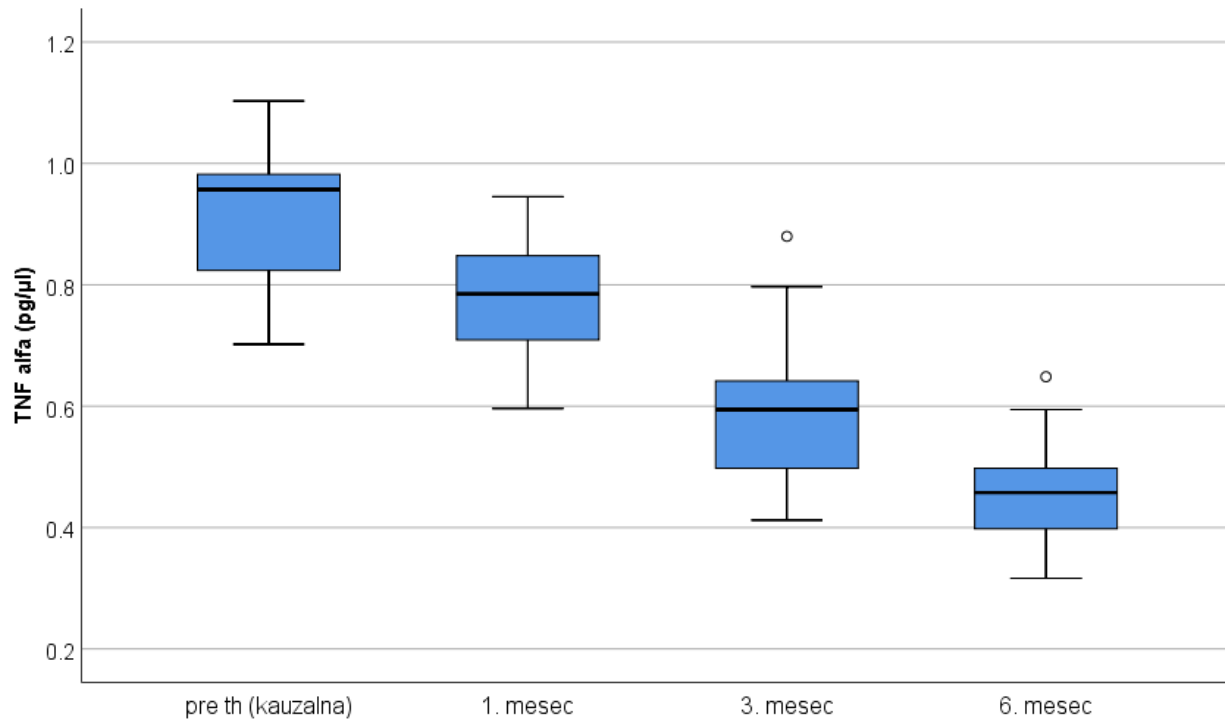
P-ispitivana grupa; C- kontrolna grupa

*-Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

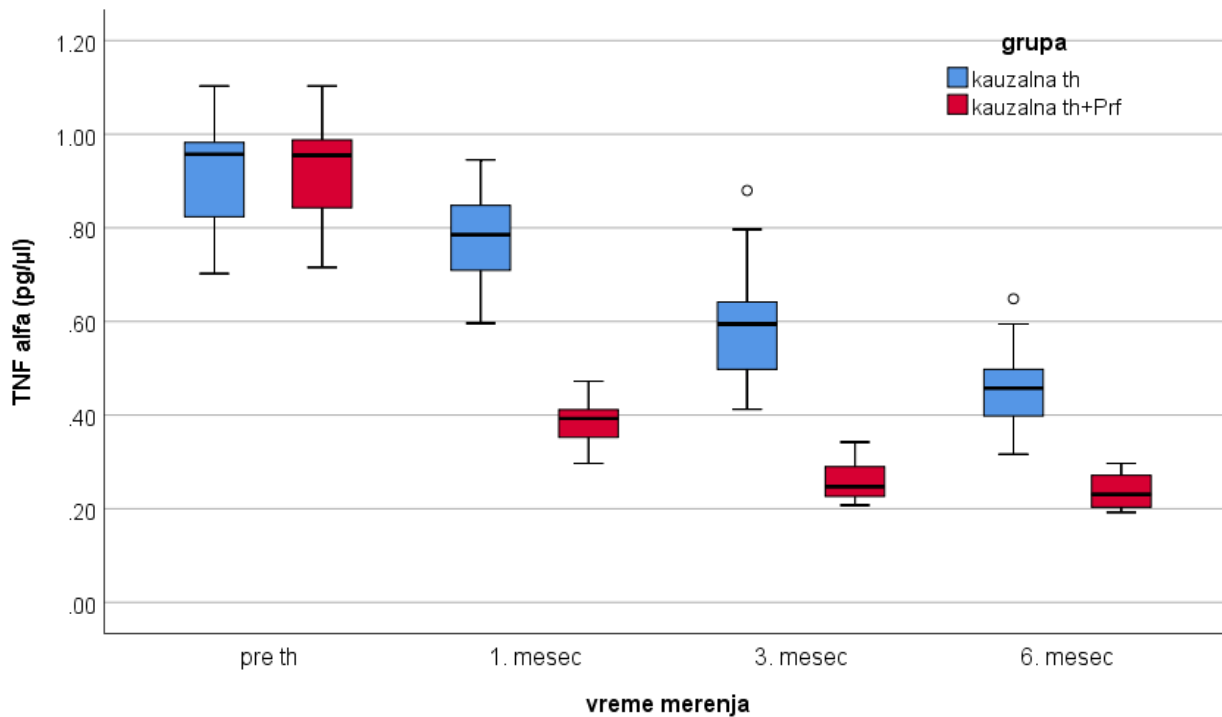
Grafikon 26. Srednje vrednosti koncentracije (Mean) faktora nekroze tumora- α (TNF- α) pg/ μ l u ispitivanoj P grupi sa standardnom devijacijom (SD) u razliĉitim vremenima merenja; interval poverenja 95%.



Grafikon 4.27. Srednje vrednosti koncentracije (Mean) faktora nekroze tumora- α (TNF- α) pg/ μ l u kontrolnojC grupi sa standardnom devijacijom (SD) u razliĉitim vremenima merenja; interval poverenja 95%.



Grafikon 4.28. Međugrupno poređenje srednjih vrednosti koncentracije (Mean) faktora nekroze tumora- α (TNF- α) pg/ μ l u ispitivanoj P i kontrolnoj C grupi sa standardnim devijacijama (SD) u različitim vremenima merenja; interval poverenja 95%.



4.5. Ukupna koncentracija mikroorganizama u GCF određena metodom PCR – realtime

Tabela 4.5.1.

PCR realtime $\bar{X} \pm SD$ mm (Med; min-max)	Grupa		Značajnost ^b
	P	C	
Vreme merenja			
0 meseci	2408369,00±3488796,726 (704500,00; 1240- 10640000)	2372881,00±3483340,472 (702500; 1220- 10480000)	^c p=0,821
1 mesec	27708,86±60036,838 (3625; 3604421864,781- 60036,838)	323142±458640 (106500; 0106- 1680000)	^c p=0,000*
3 meseca	825098,93±4246296,647 (11700,00; 143- 613000)	226048,10±680604 (75000,00; 183- 3760000)	^c p=0,001*
6 meseci	71493,73±95627,954 (61000,00; 732-528000)	336812,27±1057691 (93700; 938-5870000)	^c p=0,000*
Značajnost ^a	^d p=0,000*	^d p=0,000*	

P– ispitavana grupa; C– kontrolna grupa

^a –Unutargrupno poređenje između vremena posmatranja; jednofaktorska analiza varijanse sa ponovljenim merenjem

^b – Poređenje između grupa

^c – T-test za vezane uzorke

^d – Vilkoksonov (Wilcoxon) test za vezane uzorke

*– Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

Analizom rezultata dobijenih merenjem koncentracije ukupnih bakterija u uzorku GCF ispitivane i kontrolne strane, na početku studije se ne uočava statistički značajna razlika. U toku pojedinih vremena merenja se uočava statistički značajna promena ove koncentracije u ispitivanoj grupi uzoraka (Tabela 4.5.2., Grafikon 4.29.). U

kontrolnoj grupi se ove koncentracije statistički ne razlikuju poređenjem vrednosti šestog meseca nakon terapije sa merenjima dobijenim prvog i trećeg meseca nakon terapije (Tabela 4.5.2., Grafikon 4.30.). Međugrupnim posmatranjem dobijenih rezultata u svakom vremenu merenja se uočava statistički značajna razlika (Tabela 4.5.1., Grafikon 4.31.).

Tabela 4.5.2.

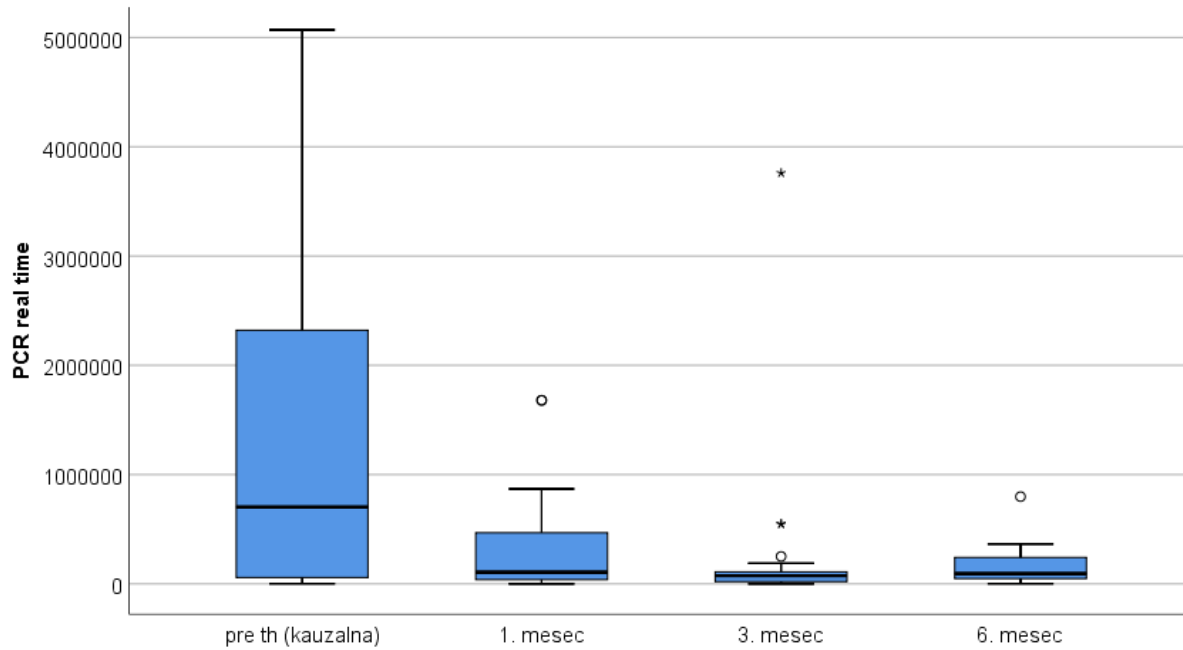
PCR real-time				
Grupe	Vreme merenja (meseći)	0m	1m	3m
P	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,000*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,005*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,002*	^a p=0,003*
C	1m	^a p=0,000*	/	^a p=0,000*
	3m	^a p=0,000*	^a p=0,013*	/
	6m	^a p=0,000*	^a p=0,147	^a p=0,072

^a–Bonferoni (Bonferroni) test: unutargrupno poređenje

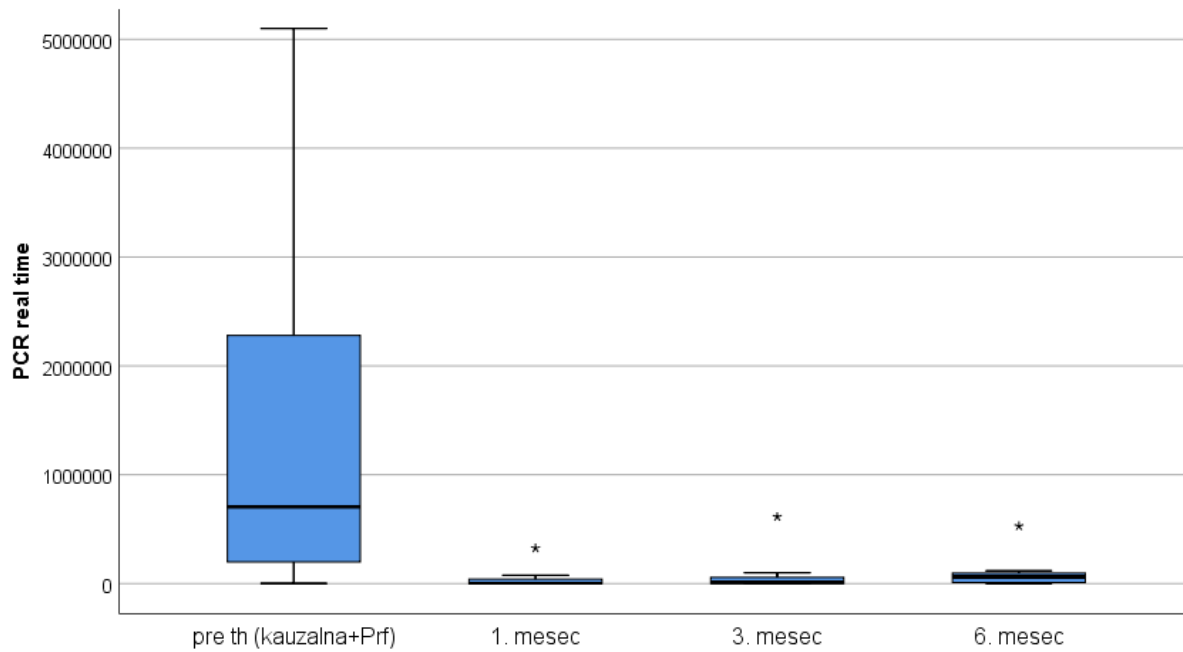
P– ispitavana grupa; C– kontrolna grupa

*– Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

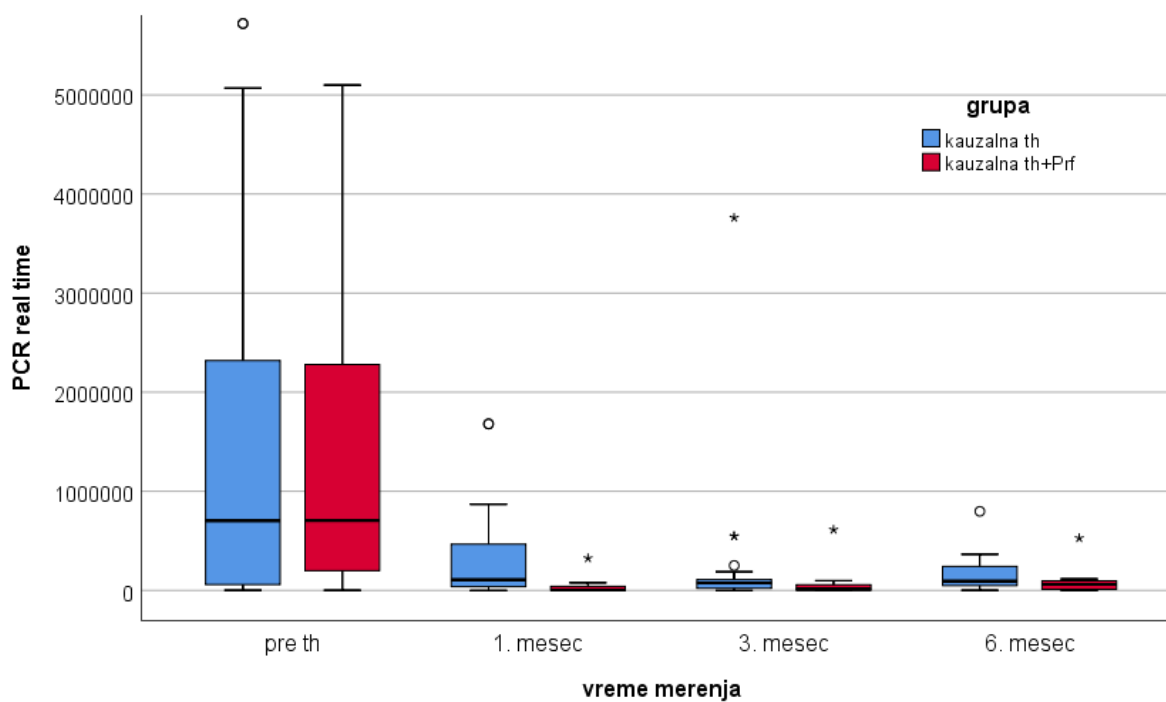
Grafikon 4.29. Srednje vrednosti koncentracije svih mikroorganizama u ispitivanoj P grupi sa standardnom devijacijom (SD) u različitim vremenima merenja; interval poverenja 95% - PCR-P grupa



Grafikon 4.30. Srednje vrednosti koncentracije svih mikroorganizama u ispitivanoj P grupi sa standardnom devijacijom (SD) u različitim vremenima merenja; interval poverenja 95% - PCR-P grupa PCR-C-grupa



Grafikon 4.31. Međugrupno poređenje srednjih vrednosti ukupne koncentracije mikroorganizama u GCF u ispitivanoj P i kontrolnoj C grupi sa standardnim devijacijama (SD) u različitim vremenima merenja; interval poverenja 95% - PVR P vs C grupa



4.6. REGRESIONA ANALIZA

Tabela 4.6.1. Regresiona analiza prediktora razlike između svih analiziranih parametara merenih pre početka terapije i tokom šestomesečnog perioda praćenja, koji će dovesti do razlike u ishodu SRP terapije i SRP terapije u kombinaciji sa i-PRF-om.

Parametri	Univarijantni model		Multivarijantni model	
	Exp(B) (95%CI) ^a	Sig.	Exp(B) (95%CI) ^a	Sig.
PPDp 0 m	1,057 (0,580 - 1,928)	p=0,857		
PPDp 1m	0,471 (0,240 - 0,924)	p=0,028*	731,320 (2,651 - 201775,563)	p=0,021*
PPDp 3m	0,278 (0,117 - 0,661)	p=0,004*	0,033 (0,000 - 123,398)	p=0,417
PPDp 6m	-0,167 (0,058 - 0,482)	p=0,001*	0,006 (0,000 - 1,931)	p=0,083
CALp 0 m	0,982 (0,480 - 2,008)	p=0,961		
CALp 1m	0,479 (0,209 - 1,097)	p=0,082		
CALp 3m	0,356 (0,144 - 0,877)	p=0,025*	0,658 (0,004 - 113,702)	p=0,873
CALp 6m	0,360 (0,143 - 0,906)	p=0,030*	2,241 (0,009 - 558,523)	p=0,774
BOPp 0	1,160 (0,563 - 2,392)	p=0,687		
BOPp 1m	0,258 (0,089 - 0,749)	p=0,013*	2,401 (0,098 - 58,986)	p=0,592
BOPp 3m	0,066 (0,011 - 0,413)	p=0,004*	0,072 (0,000 - 32,190)	p=0,398
BOPp 6m	0,000 (0,000 - 0,016)	p=0,001*	0,000 (0,000 - 0,054)	p=0,013*
PIp 0	0,967 (0,387 - 2,416)	p=0,942		
PIp 1m	1,148 (0,080 - 16,428)	p=0,919		
PIp 3m	1,661 (0,155 - 17,746)	p=0,675		
PIp 6m	0,895 (0,055 - 14,495)	p=0,938		
Tnf- α -p 0	1,854 (0,015 - 229,164)	p=0,802		
Tnf- α -p 1m	1,9313E-112 (0,000-0,000)	p=0,994		
Tnf- α -p 3m	2,567E-192 (0,000-0,000)	p=0,992		
Tnf- α -p 6m	0,000 (0,000-0,001)	p=0,985		
MMP-8-p 0	0,967 (0,714 - 1,309)	p=0,827		
MMP-8-p 1m	0,370 (0,218-0,626)	p<0,001*	1,620 (0,163-16,113)	p=0,681
MMP-8-p 3m	0,267 (0,144-0,496)	p<0,001*	0,588 (0,038-9,087)	p=0,704
MMP-8-p 6m	0,221(0,101-0,483)	p<0,001*	0,081 (0,008-0,881)	p=0,039
ALP-p 0	1,000 (0,995 - 1,005)	p=0,988		
ALP-p 1m	0,975 (0,961-0,989)	p=0,001*	0,950 (0,873-1,033)	p=0,232
ALP-p 3m	0,984 (0,974-0,993)	p=0,001*	1,000 (0,943-1,061)	p=0,988
ALP-p 6m	0,996 (0,990-1,002)	p=0,159		
PCR-p 0	1,0 (1,0 - 1,0)	P=0,968		
PCR-p 1m	1,0 (1,0 - 1,0)	p=0,028*	1,00 (0,684 - 1,462)	p=0,128
PCR-p 3m	1,0 (1,0 - 1,0)	p=0,142		
PCR-p 6m	1,0 (1,0 - 1,0)	p=0,064		

-p – ispitavana grupa

*Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

^aNestandardizovani koeficijent B

Na osnovu dobijenih rezultata u regresionom modelu, možemo zaključiti da ćemo dodavanjem i-PRF-a uvek imati bolje ishodišne rezultate, tj. manje vrednosti parametra PPD mesec dana nakon sprovedene terapije i manje vrednosti indeksa BOP 6 meseci nakon terapije. Sve ovo dovodi do zaključka da će dodatna aplikacija i-PRF-a dovesti do poboljšanja kliničkih parametara nakon ovog terapijskog postupka.

Tabela 4.6.2. Analiza uticaja posmatranih kliničkih i laboratorijskih parametara na vrednosti PPD izmerene mesec dana nakon sprovedene terapije: univarijantna i multivarijantna regresiona analiza

Parametri	Univarijantni model		Multivarijantni model ^b R ² adj = 0,969	
	B (95%CI)	Sig.	B (95%CI)	Sig.
PPDp 0 (m)	0,878 (0,767 - 0,988)	p<0,001*	0,394 (0,044-0,744)	p=0,030*
PPDp 3m	1,092 (1,008 - 1,177)	p<0,001*	0,618 (0,037 - 1,199)	p=0,038*
PPDp 6m	1,127 (0,993-1,261)	p<0,001*	-0,157 (-0,844 - 0,530)	p=0,636
LGMp 0 (m)	0,770 (0,450-1,090)	p<0,001*	-0,161 (-0,471-0,149)	p=0,289
LGMp 1 m	0,988 (0,666-1,310)	p<0,001*	0,351 (0,045-0,657)	p=0,027*
LGMp 3 m	0,737 (0,395-1,078)	p<0,001*	-0,011 (-0,393-0,370)	p=0,950
LGMp 6 m	0,495 (0,065-0,925)	p=0,025*	0,066 (-0,220-0,0352)	p=0,632
CALp 0 (m)	0,806 (0,587-1,025)	p<0,001*	-0,790 (-1,585-0,006)	p=0,051
CALp 1m	0,919 (0,696-1,143)	p<0,001*	0,815 (-0,231-1,861)	p=0,119
CALp 3m	0,962 (0,743-1,190)	p<0,001*	0,557 (0,058 - 1,057)	p=0,031*
CALp 6m	1,017 (0,792-1,243)	p<0,001*	-0,343 (-1,178 - 0,492)	p=0,398
BOPp 0	0,564 (0,295-0,833)	p<0,001*	0,049 (-0,097-0,195)	p=0,488
BOPp 1m	1,009 (0,703-1,314)	p<0,001*	-0,005 (-0,258 - 0,248)	p=0,967
BOPp 3m	1,457 (1,012-1,902)	p<0,001*	0,145 (-0,225 - 0,514)	p=0,420
BOPp 6m	2,878 (1,699-4,056)	p<0,001*	0,470 (-0,506 - 1,445)	p=0,324
Pip 0	0,515 (0,149-0,881)	p=0,007*	0,115 (-0,055-0,285)	p=0,171
Pip 1m	0,955 (-0,150-2,060)	p=0,089		
Pip 3m	0,374 (-0,614-1,362)	p=0,451		
Pip 6m	0,360 (-0,822-1,542)	p=0,544		
Aap 0 m	0,848 (0,358-1,339)	p=0,001*	-0,002 (-0,251-0,2446)	p=0,985
Aap 1m	0,411 (-0,019-0,841)	p=0,061		
Aap 3m	0,549 (0,133-0,965)	p=0,011*	-0,055 (-0,227-0,116)	p=0,504
Aap 6m	0,546 (0,130-0,962)	p=0,011*	0,022 (-0,261-0,304)	p=0,874
Pgp 0m				
Pgp 1m	0,553 (0,119-0,986)	p=0,013*	-0,034 (-0,199-0,130)	p=0,664
Pgp 3m	0,621 (0,108-1,135)	p=0,019*	0,057 (-0,097-0,211)	p=0,449
Pgp 6m	0,313 (-0,673-1,299)	p=0,528		
Pip 0m	0,565 (-0,138-1,268)	p=0,113		
Pip 1m	0,775 (0,387-1,162)	p<0,001*	-0,086 (-0,271-0,100)	p=0,343
Pip 3m	0,527 (0,106-0,949)	p=0,015*	-0,230 (-0,510-0,050)	p=0,102
Pip 6m	0,645 (0,165-1,126)	p=0,009*	0,073 (-0,137-0,284)	p=0,472
Tfp 0m	0,401 (-0,127-0,930)	p=0,134		
Tfp 1m	0,535 (0,127-0,942)	p=0,011*	0,012 (-0,163-0,186)	p=0,889
Tfp 3m	0,510 (0,094-0,926)	p=0,017*	0,070 (-0,151-0,291)	p=0,511
Tfp 6m	0,425 (-0,024-0,875)	p=0,063		
Tnf- α -p 0	3,279 (1,420 - 5,139)	p=0,001*	-0,849 (-1,950-0,251)	p=0,122
Tnf- α -p 1m	1,210 (0,243-2,176)	p=0,015*	-0,455 (-2,645-1,755)	p=0,675
Tnf- α -p 3m	1,246 (0,103-2,389)	p=0,033*	0,128 (-1,587-1,844)	p=0,876
Tnf- α -p 6m	1,945 (0,259-3,631)	p=0,025*	0,391 (-1,071-1,853)	p=0,580
MMP-8-p 0	0,097 (-0,029 - 0,223)	p=0,128		
MMP-8-p 1m	0,124 (0,003-0,246)	p=0,044*	-0,023 (-0,101-0,055)	p=0,538
MMP-8-p 3m	0,132 (0,031-0,234)	p=0,011*	0,099 (-0,035-0,234)	p=0,138
MMP-8-p 6m	0,121 (0,037-0,206)	p=0,006*	-0,078 (-0,164-0,008)	p=0,074
ALP-p 0	0,004 (0,002 - 0,006)	p<0,001*	0,002 (-0,001-0,004)	p=0,164

ALP-p 1m	0,005 (0,002-0,008)	p<0,001*	0,000 (-0,002-0,002)	p=0,786
ALP-p 3m	0,003 (0,001-0,006)	p=0,015*	0,002 (-0,001-0,005)	p=0,145
ALP-p 6m	0,005 (0,002-0,007)	p<0,001*	-0,003 (-0,007-0,001)	p=0,179
PCR-p 0	1,300E-7 (0,000 - 0,000)	p<0,001*	9,917E-9 (0,000 - 0,000)	p=0,445
PCR-p 1m	9,772E-7 (0,000 - 0,000)	p=0,001*	-1,747E-8 (0,000 - 0,000)	p=0,911
PCR-p 3m	3,070E-7 (0,000 - 0,000)	p=0,163		
PCR-p 6m	1,185E-7 (0,000 - 0,000)	p=0,410		

-p – ispitavana grupa

*Statistički značajna razlika, $p \leq 0,05$

^aNestandardizovani koeficijent B

^b Koeficijent determinacije

U linearnom regresionom modelu u kome je dubina sondiranja (PPD) izmerena nakon mesec dana od sprovedene terapije postavljena kao zavisna varijabla, u univarijantnoj regresionoj analizi kao statistički značajni izdvojili su se sledeći parametri: vrednosti PPD, LGM, CAL i BOP - izmerene pre terapije i u svim posmatranim vremenima (1, 3 i 6 meseci), kao i vrednost PI i koncentracija *A. a.* pre početka terapije, koncentracija *P. g.*, *P. i.* i *T. f.* – 1 i 3 meseca nakon sprovedene terapije, ali i *P. i.* 6 meseci nakon terapije; takođe, vrednosti Tnf- α i ALP u svim posmatranim vremenima, MMP-8 nakon 1, 3 i 6 meseci od sprovedene terapije i vrednost PCR pre i jedan mesec nakon terapije. Svi ovi parametri ušli su u multivarijantni regresioni model, gde su se kao statistički značajni izdvojili vrednosti PPD izmerene pre terapije i 3 meseca posle terapije, LGM 1 mesec nakon terapije i vrednost CAL izmerena 3 meseca posle terapije. Vrednost koeficijenta determinacije za ovaj multivarijantni model iznosio je 96,9, što znači da je varijabilitet ishodišne varijable PPD - mesec dana posle terapije sa 96,9% opisan ovim varijablama. Analizom dobijenih prediktora mozemo reći da su kod ispitanika sa manjim vrednostima PPD - 1, uvek bili izmerene i manje vrednosti ovog parametra pre početka terapije, kao i manje vrednosti LGM -1 mesec nakon terapije i PPD i CAL - 3 meseca nakon terapije (faktori rizika).

Dobijeni rezultati nam pokazuju da se kao faktor rizika za lošiji terapijski ishod PPD i CAL nakon 3 meseca izdvaja PPD nakon prvog meseca. Kod pacijenata kod kojih je pre terapije izmerena manja vrednost PPD parametra kao i kod pacijenata sa manjom vrednošću LGM parametra nakon mesec dana, uvek će biti izmerena manja vrednost PPD parametra nakon meseca dana. Sa ovim prediktorima opisan je 95,8% varijabiliteta ishodišne varijable.

Tabela 4.6.3. Linearni regresiona analiza parametra PPD nakon 6 meseci i svih analiziranih parametara

Parametri	Univariantni model		Multivarijantni model	
	^a B (95%CI)	Sig,	^a B (95%CI)	Sig,
PPDp 0 (mm)	0,592 (0,456 - 0,728)	p<0,001*	0,232 (-0,064 - 0,529)	p=0,118
PPDp 1m	0,737 (0,649 - 0,824)	p<0,001*	-0,019 (-0,372 - 0,334)	p=0,911
PPDp 3m	0,891 (0,829 - 0,952)	p<0,001*	0,717 (0,393 - 1,040)	p=0,000*
CALp 0 (mm)	0,525 (0,321 - 0,729)	p<0,001*	-0,257 (-0,772 - 0,257)	p=0,309
CALp 1m	0,659 (0,457 - 0,861)	p<0,001*	0,099 (0,587 - 0,784)	p=0,767
CALp 3m	0,709 (0,507 - 0,912)	p<0,001*	0,176 (-0,194 - 0,546)	p=0,333
CALp 6m	0,754 (0,552 - 0,956)	p<0,001*	-0,086 (-0,637 - 0,464)	p=0,746
BOPp 0	0,276 (0,038 - 0,513)	p=0,024*	-0,080 (-0,174 - 0,015)	p=0,094
BOPp 1m	0,793 (0,541 - 1,045)	p<0,001*	0,074 (-0,096 - 0,245)	p=0,374
BOPp 3m	1,176 (0,816 - 1,537)	p<0,001*	-0,168 (-0,445 - 0,109)	p=0,220
BOPp 6m	2,364 (1,417 - 3,310)	p<0,001*	0,475 (-0,105 - 1,054)	p=0,103
PIp 0	0,281 (-0,026 - 0,588)	p=0,072		
PIp 1m	0,745 (-0,150 - 1,640)	p=0,101		
PIp 3m	0,108 (-0,694 - 0,910)	p=0,788		
PIp 6m	0,175 (-0,783 - 1,133)	p=0,716		
Tnf- α -p 0 (pg/ μ l)	2,417 (0,885 - 3,948)	p=0,003*	-0,236 (-0,874 - 0,402)	p=0,450
Tnf- α -p 1m	1,496 (0,773 - 2,219)	p<0,001*	-1,366 (-2,649 - 0,084)	p=0,038*
Tnf- α -p 3m	1,640 (0,780 - 2,499)	p<0,001*	0,891 (-0,184 - 1,966)	p=0,099
Tnf- α -p 6m	2,431 (1,157 - 3,704)	p<0,001*	0,056 (-1,067 - 1,180)	p=0,918
MMP-8-p 0(pg/ μ l)	0,091 (-0,008 - 0,191)	p=0,071		
MMP-8-p 1m	0,150 (0,058 - 0,242)	p=0,002*	-0,029 (-0,079 - 0,021)	p=0,244
MMP-8-p 3m	0,158 (0,084 - 0,233)	p<0,001*	0,016 (-0,068 - 0,100)	p=0,695
MMP-8-p 6m	0,155 (0,095 - 0,214)	p<0,001*	0,012(-0,048 - 0,072)	p=0,681
ALP-p 0 (pg/ml)	0,002 (0,000 - 0,004)	p=0,013*	-0,001 (-0,002 - 0,001)	p=0,517
ALP-p 1m	0,005 (0,003 - 0,007)	p<0,001*	0,001 (-0,001 - 0,003)	p=0,222
ALP-p 3m	0,003 (0,001 - 0,006)	p=0,002*	0,000 (-0,001 - 0,002)	p=0,563
ALP-p 6m	0,003 (0,001 - 0,005)	p=0,002*	6,134E-5(-0,002 - 0,003)	p=0,960
PCR real time-p 0	9,925E-8 ()	p<0,001*	-2,071E-9 (0,00 - 0,00)	p=0,833
PCR-p 1m	1,019E-6 ()	p<0,001*	6,535E-8 (0,00 - 0,00)	p=0,580
PCR-p 3m	1,470E-7 ()	0,411		
PCR-p 6m	1,125E-7 ()	0,333		

-p – ispitavana grupa

*Statistički značajna razlika

^aNestrandardizovan koeficijent B

U linearnom regresionom modelu u kome je dubina sondiranja (PPD) izmerena nakon 6 meseci od sprovedene terapije postavljena kao zavisna varijabla, u univarijantnoj regresionoj analizi kao statistički značajni izdvojili su se sledeći parametri: vrednosti PPD, CAL i BOP - izmerene pre terapije i u svim posmatranim vremenima (1, 3 i 6 meseci), kao i svi biohemijski parametri osim MMP-8 pre terapije i vrednost PCR pre i jedan mesec nakon terapije. Svi ovi parametri ušli su u multivarijantni

regresioni model, gde su se kao statistički značajni izdvojili vrednost PPD izmerena 3 meseca posle terapije i TNF- α mesec dana nakon terapije. Vrednost koeficijenta determinacije za ovaj multivarijantni model iznosio je 95, što znači da je varijabilitet ishodišne varijable PPD – 6 meseci posle terapije sa 95% opisan ovim varijablama. Analizom dobijenih prediktora mozemo reći da su kod ispitanika sa manjim vrednostima PPD - 6, uvek bili izmerene i manje vrednosti ovog parametra 3 meseca nakon terapije, kao i manje vrednosti TNF- α mesec dana nakon terapije.

Možemo zaključiti da je smanjenje vrednosti TNF- α nakon mesec dana u ispittvanoj P – grupi uticalo na smanjenje vrednosti PPD nakon 3 meseca i izdvojilo kao faktor predikcije za statistički značajnu razliku PPD nakon 6 meseci.

Tabela 4.6.4. Linearna regresiona analiza vrednosti parametra CAL nakon 6 meseci i ostalih posmatranih parametara

Parametri	Univarijantni model		Multivarijantni model ^b R ² adj = 0,98	
	^a B (95%CI)	Sig,	^a B (95%CI)	Sig,
PPDp 0 (mm)	0,531 (0,399 - 0,663)	<0,001*	0,009 (-0,165 - 0,183)	0,917
PPDp 1m	0,574 (0,447 - 0,702)	<0,001*	-0,077 (-0,316 - 0,163)	0,514
PPDp 3m	0,635 (0,484 - 0,786)	<0,001*	0,124 (-0,167 - 0,414)	0,389
PPDp 6m	0,651 (0,477 - 0,825)	<0,001*	0,059 (-0,198 - 0,316)	0,638
CALp 0 (mm)	0,816 (0,736 - 0,896)	<0,001*	0,053 (-0,385 - 0,491)	0,806
CALp 1m	0,925 (0,880 - 0,970)	<0,001*	0,685 (0,233 - 1,137)	0,005*
CALp 3m	0,944 (0,882 - 1,007)	<0,001*	0,082 (-0,213 - 0,378)	0,570
BOPp 0	0,326 (0,112 - 0,541)	0,004*	0,028 (-0,039 - 0,096)	0,392
BOPp 1m	0,699 (0,456 - 0,941)	<0,001*	-0,057 (-0,178 - 0,064)	0,343
BOPp 3m	1,067 (0,726 - 1,407)	<0,001*	-0,008 (-0,219 - 0,202)	0,936
BOPp 6m	2,372 (1,525 - 3,220)	<0,001*	0,152 (-0,267 - 0,571)	0,462
Tnf- α -p 0 (pg/ μ l)	3,466 (2,224 - 4,709)	<0,001*	-0,008 (-0,559 - 0,543)	0,978
Tnf- α -p 1m	1,066 (0,354 - 1,778)	0,019*	-0,104 (-1,076 - 0,867)	0,827
Tnf- α -p 3m	1,218 (0,384 - 2,052)	0,005*	,0176 (-0,614 - 0,966)	0,650
Tnf- α -p 6m	1,661 (0,411 - 2,911)	0,010*	-0,524 (-1,343 - 0,295)	0,199
MMP-8-p 0 (pg/ μ l)	0,076 (-0,017 - 0,169)	0,108		
MMP-8-p 1m	0,083 (-0,008 - 0,174)	0,074		
MMP-8-p 3m	0,088 (0,012 - 0,165)	0,024*	-0,030 (-0,083 - 0,023)	0,258
MMP-8-p 6m	0,074 (0,009 - 0,138)	0,026*	0,019 (-0,023 - 0,062)	0,364
ALP-p 0 (pg/ml)	0,003 (0,002 - 0,005)	<0,001*	-0,001 (-0,002 - 0,001)	0,413
ALP-p 1m	0,004 (0,002 - 0,006)	<0,001*	0,000 (-0,001 - 0,002)	0,386
ALP-p 3m	0,003 (0,001 - 0,005)	0,001*	-0,001 (-0,002 - 0,001)	0,301
ALP-p 6m	0,004 (0,003 - 0,006)	<0,001*	0,001 (-0,001 - 0,003)	0,242
PCR real time-p 0	7,198E-8 ()	0,002*	-4,669E-9 ()	0,496
PCR-p 1m	5,061E-7 ()	0,019*		
PCR-p 3m	6,499E-8 ()	0,696		
PCR-p 6m	3,073E-8 ()	0,777		

U linearnom regresionom modelu u kome je vrednost nivoa pripojnog epitela (CAL) izmerena nakon 6 meseci od sprovedene terapije postavljena kao zavisna varijabla, u univarijantnoj regresionoj analizi kao statistički značajni izdvojili su se sledeći parametri: vrednosti PPD, CAL i BOP - izmerene pre terapije i u svim posmatranim vremenima (1, 3 i 6 meseci), vrednost PCR pre i jedan mesec nakon terapije, kao i svi biohemijski parametri osim MMP-8 pre terapije i mesec dana nakon terapije. Svi ovi parametri ušli su u multivarijantni regresioni model, gde se kao statistički značajna izdvojila vrednost CAL izmerena mesec dana posle terapije. Vrednost koeficijenta determinacije za ovaj multivarijantni model iznosio je 98, što znači da je varijabilitet ishodišne varijable CAL – 6 meseci posle terapije sa 98% opisan ovim varijablama. Analizom dobijenih prediktora mozemo reći da su kod ispitanika sa

manjim vrednostima CAL - 6, uvek bili izmerene i manje vrednosti ovog parametra 1 mesec nakon terapije.

Iz ovoga možemo zaključiti da će kauzalna terapija imati bolje rezultate i nakon dužeg vremenskog perioda (6 meseci) ako je vrednost ovog parametra bolja nakon mesec dana.

5. DISKUSIJA

Postizanje optimalnog terapijskog koncepta u toku lečenja parodontitisa izuzetno je značajno za celokupnu svetsku populaciju. Parodontitis se javlja kod više od 50% adultnih osoba u svetu ⁴⁴. U pojedinim delovima sveta evidentirana je prevalenca ovog oboljenja i kod 90% populacije ²⁴⁶. Progresija parodontitisa je povezana sa genetskom predispozicijom ²⁴⁷, imunskim statusom domaćina ¹⁴¹, starošću ²⁴⁸, polom, mikrobiološkom florom usne duplje i parodontalnih prostora, ali i sa dejstvom spoljašnjih činilaca, pušenjem ¹²⁸, psihološkim, društvenim i socioekonomskim statusom ²⁴⁹.

Inflamatorna oboljenja parodonticijuma karakterišu se kako lokalizovanom destrukcijom svih tkiva potpornog aparata zuba, tako i povećanim rizikom od nastanka određenog broja sistemskih oboljenja, kao što su ishemijski ili hemoragični moždani udar, kardiovaskularna oboljenja, infarkt miokarda i druga sistemska oboljenja ^{250, 251}.

Parodontitis predstavlja jedan od dva glavna uzročnika gubitka zuba i narušavanja kvaliteta života. Stoga protokoli lečenja ovog oboljenja ostaju decenijama u fokusu interesovanja naučne i stručne javnosti ²⁵².

Dokazano je da inicijalna terapija kao kaonvencionalni pristup u lečenju parodontitisa, uklanjanjem supra- i sub-gingivalnih naslaga kao etiološkog faktora, predstavlja standardni terapijski postupak koji ima povoljni ishod lečenja ²⁵³. Međutim, faza obrade parodontalnog džepa rezultuje ranom velike površine u već inflamiranom parodontalnom tkivu. Brzina zarastanja i regeneracije tkiva je zasnovana na imunom odgovoru domaćina koji je regulisan brojnim ćelijama i medijatorima zapaljenja. Iako mikrobna infekcija predstavlja inicijalni faktor nastanka oboljenja, imuni odgovor domaćina ima glavnu ulogu u progresiji ovog hroničnog oboljenja ²⁵⁴.

Svako terapijsko sredstvo sa regenerativnim i antiinflamatornim osobinama može se primeniti kao pomoćno sredstvo u toku lečenja parodontitisa. Novi modaliteti lečenja koji se aktivno istražuju uključuju antibiotsku terapiju, terapiju modulacijom imunog odgovora domaćina, terapiju oralnim antisepticima, terapiju laserom i terapiju tkivnim inženjeringom ¹³⁶.

Upotreba antibiotika u toku lečenja parodontitisa, lokalna i sistemska, dozvoljena je u strogo određenim i proverenim uslovima, sa jasno definisanim indikacijama, a uz stalni rizik od pojave novih rezistentnih bakterijskih sojeva ili alergizacije samog organizma ²⁵⁵.

Pomoćna terapijska procedura koja podrazumeva upotrebu lasera u lečenju parodontitisa je procenjivana u velikom broju savremenih naučnih istraživanja, zbog antiinflamatornih, antiedematoznih i bioloških efekata ²⁵⁶. Rezultati su kontradiktorni u pogledu vrste lasera, njegovih svojstava i načina sprovođenja same terapije. U pojedinim istraživanjima se upotreba antibiotika pokazala delotvornijom ²⁵⁷.

Brojna istraživanja dejstva primenjenih bioaktivnih faktora rasta u povećanim koncentracijama su nakon ispitivanja u *in vitro* uslovima sprovedena i na životinjskim modelima. Nikos Donos (*Nikos Donos*) je sa svojim saradnicima pokazao da je u saglasnosti sa drugim istraživačima jednog preglednog rada eksperimentalnih sudija na životinjama u pogledu primene autologih trombocitnih

koncentrata (APC). U poređenju sa spontanom zarastanjem koštanih defekata pokazali su poboljšane rezultate u pogledu količine i kvaliteta novoformirane kosti ²⁵⁸.

Evaluacijom kliničkih istraživanja sprovedenim na ljudima uglavnom se uočavalo ubrzanje zarastanja parodontalne rane, epitelizacije mekih tkiva usne duplje i smanjenje postoperativnog bola nakon vađenja zuba, ali nije bilo jasnih pokazatelja povoljnog delovanja na regeneraciju koštanog tkiva, kao i na stabilnost i stepen preživljavanja implantata ugrađenih u regenerisanu kost ²⁵⁹. Iako su pojedine studije imale kontradiktorne zaključke, klinička ispitivanja udružene primene APC-a sa koštanim zamenicama nude obećavajuće rezultate u povećanju grebena u toku njegove augmentacije.

Plazma bogata trombocitima (PRP) je bila krajem dvadesetog veka zajednički naziv za mnoge trombocitne koncentrate autologog porekla. Njihova upotreba u savremenoj medicini tokom vremena eksponencijalno se povećala, pogotovo u oblasiti oralne i maksilofacijalne hirurgije.

Poznato ja da je koncentracija faktora rasta u PRP-u 6 do 8 puta veća nego u krvi ²⁶⁰. Pokazalo se da PRP utiče na ćelijski rast i diferencijaciju, a posledično ubrzava i remodelaciju koštanog tkiva ²⁶¹. Na polju stomatologije, veliki broj studija je ukazao na pozitivne efekte PRP na koštanu regeneraciju nakon vađenja zuba, rano formiranje kosti oko implantata, kao i uvećanje volumena kosti u kombinaciji sa koštanim transplantatima u toku postupka podizanja poda maksilarnog sinusa i regenerativnih postupaka u toku lečenja infrakoštanih i furkacionih defekata ^{262, 263}. Uprkos rastućoj popularnosti i upotrebi PRP-a u ranim 90-im godinama prošlog veka, uočen je značajan nedostatak. Dodatna upotreba antikoagulantnih supstanci i goveđeg trombina, može dovesti do negativnog uticaja na zarastanje rana sprečavanjem stvaranja krvnog ugruška, negativnim dejstvom na kinetiku oslobađanja faktora rasta i na njihovu ukupnu količinu, kao i ispoljavanjem citotoksičnog efekta u *in vitro* uslovima ^{213, 264}. Bez obzira na činjenicu da je zabeležena manja koncentracija faktora rasta u PRP koncentratu nego u PRF, većina faktora rasta biva oslobođena u prvih 24 sata nakon aplikacije, a gotovo svi u toku prvih 5 dana ^{23, 232}.

Posledično se nametnula potreba za pronalaženjem novog koncentrata trombocita koji neće zahtevati upotrebu antikoagulanasa. Šokrun (*Choukroun J*) je 2001. godine uveo u svet medicine fibrin bogat trombocitima (engl. *platelet rich fibrin* – PRF) ¹². Nedavno su u borjnim preglednim radovima prikazani dugoročni efekti PRF preparata na proces zarastanja tkiva ²⁶⁵. Dve osnovne dokumentovane prednosti PRF su činjenice da sadrži i ćelije imuniteta i povećanu koncentraciju faktora rasta zahvaljujući novom konceptu centrifugiranja i novom načinu formiranja fibrinske mreže ²⁴⁰. U početku je PRF bio formiran pri velikim brzinama, što je omogućavalo isključivo formiranje trodimenzionalne fibrinske mreže kao potpore za zarastanje tkiva. Kada je reč o PRF ugrušku, on se formira već u toku centrifugiranja krvi pacijenta. Naime, u kontaktu sa staklenim zidom epruvete, dolazi do pucanja trombocita i do započinjanja kaskadne reakcije koagulacije krvi ²⁶⁶. Odmah nakon centrifugiranja, dobijen PRF matriks se sastoji od fibrinske mreže u kojoj su zarobljeni trombociti, leukociti, proteini plazme i faktori rasta.

Kasnije je razvojem *low speed centrifugation concept* (LSCC) – koncepta manje brzine, sile centrifugiranja u toku kraćeg vremenskog perioda, omogućeno formiranje tetragonalne strukture fibrinske mreže u kojoj se zdržava više faktora rasta, 97% trombocita krvi i preko 50% leukocita krvi, kao i odložen početak procesa koagulacije ²³⁶.

Zanimljivo je da je prošlo više od jedne decenije (13 godina) od kada je razvijen PRF do pojave njegove injektabilne forme, (*injectable platelet rich fibrin* - i-PRF). Tokom 2014. godine razvijen je koncept injektabilnog fibrina bogatog trombocitima - i-PRF-a²³¹. Mnogi kliničari sada ukazuju na brojne prednosti njegove upotrebe i mogućnosti kombinacije sa različitim biomaterijalima, kao i jedinsvene mogućnosti ubrizgavanja ovakve forme trombocitnog koncentrata bez dodavanja antikoagulantnog sredstva²⁶⁷.

i-PRF

Injektibilni PRF (i-PRF) je tečni oblik PRF-a. Koncentrat i-PRF je bioaktivno sredstvo dobijeno centrifugiranjem prema konceptu LSCC – definisan protokolom nižeg broja obrtaja u kraćem vremenskom intervalu i pri smanjenoj sili centrifugiranja (700 obrtaja/min u toku 3min i 60G). I-PRF se centrifugira u plastičnim epruvetama, kako bi se izbeglo preuranjeno započinjanje procesa koagulacije (usled trenutne aktivacije većeg broja trombocita pri kontaktu sa staklom) i omogućilo manipulisanje tečnim oblikom u trajanju od 15-30 min na sobnoj temperaturi²⁶⁸. Zbog toga operater ima dovoljno vremena za njegovo odvajanje od ostatka centrifugata i aplikovanje u prostor parodontalnog džepa. Takođe, nophodna je i plastična brizgalica za njegovu aplikaciju. Nakon ovog perioda formira se stabilni fibrinski ugrušak, kompleksne tetragonalne strukture²⁶⁹, koji je zbog upotrebe manje sile centrifugiranja u odnosu na konvencionalni PRF ugrušak obogaćen leukocitima (više od 55% leukocita krvi), većom koncentracijom trombocita od 97% iz krvi i signifikantno većom koncentracijom ključnih faktora rasta (VEGF), (EGF) i PDGF-a (PDGF-BB, PDGF-AB, i PDGF-AA), kao i TGF- β ^{270, 271}. Novije studije pokazuju da se ovi faktori rasta otpuštaju u vremenskom periodu dužem od 10 dana²⁷¹. Štaviše, zabeleženo je oslobađanje faktora rasta iz i-PRF-a i nakon perioda od 21- 28 dana, dok se PRP u potpunosti razgradi nakon 10 dana²⁷².

Navedeni faktori su glavni činioci regeneracije tkiva, naročito epitelizacije i angiogeneze vezivnog tkiva, ali i remodelacije koštanog tkiva^{273, 271}.

Od trenutka započinjanja upotrebe PRF-a u različitim stomatološkim i medicinskim terapijskim postupcima dolazi do preokreta u postignutim rezultatima zahvaljujući istaknutoj ulozi u ubrzavanju regeneracije tkiva i njegovom protivupalnom efektu²⁷⁴. Pored toga, razvoj i primena i-PRF-a može imati još bolje efekte, otkako su Doan (*Dohan*) i saradnici pokazali da i-PRF sadrži više faktora rasta nego PRF, koji je bogatiji ovim faktorima od PRP-a^{236, 274}.

U *in vitro* studijama, i-PRF pokazao je odličnu ćelijsku biokompatibilnost²³⁶. Aplikacija i-PRF-a u populaciji fibroblasta humanog porekla dovela je do njihove signifikantno veće proliferacije i aktivacije (ekspresiju mRNA TGF- β , PDGF i COL1a2). Proliferacija je uvećana čak i do 270%, za razliku od PRP kod koga je povećana za 180%²³⁷. U visokim koncentracijama faktori rasta poreklom iz i-PRF-a mogu pokrenuti i migraciju fibroblasta²³⁷. Takođe, dejstvo i-PRF-a na endotelne ćelije u *in vitro* uslovima prouzrokovalo je formiranje signifikantno većeg broja struktura sličnim krvnim sudovima u poređenju sa netretiranim endotelnim ćelijama²²⁵. U *in vivo* studijama dokazan je signifikantno veći stepen vaskularizacije tkiva tretiranog PRF-om koji je pripremljen prema konceptu LSCC nego kod onog tretiranog konvencionalnim metodama²⁷⁵.

Sa druge strane, sagledavanjem procesa koji se odigravaju na ćelijskom nivou, mogu se objasniti mehanizmi delovanja biološki aktivnih preparata.

Fiziološki proces zarastanja rane prolazi kroz tri faze: inflamacija, proliferacija i regeneracija²⁷⁶. Činjenica je da trombociti, leukociti i njihovi signalni molekuli predstavljaju glavne činioce prve faze, tj. faze inflamacije²⁷⁷. Neposredno nakon nakupljanja ovih ćelija i oslobađanja velike količine citokina i faktora rasta kao signalnih molekula, sledi i aktivacija fibroblasta i endotelnih ćelija²⁷⁷. Međutim, mikrokruženje hronično inflamiranog tkiva sa dominacijom destruktivnih procesa nad reparatornim procesima, razlikuje se od fiziološkog zarastanja tkiva. Hroničnim ranama primarno nedostaje vaskularizacija što otežava regeneraciju tkiva²²⁸. U takvom mikro okruženju, pod uticajem aplikovanog i-PRF-a, može se izvršiti ključni (pozitivan) utacaj na inflamatornu neravnotežu i ubrzati obnavljanje tkiva podsticajem angiogeneze i regrutacijom matičnih ćelija koje su u njemu sadržane²⁷⁸. Pored toga, oslobađanje EGF-a iz i-PRF-a podržava proces epitelizacije, pa se zatvaranje rane postiže bez očiglednih stvaranja ožiljaka ili fibroze²⁷⁹.

Ovo istraživanje je sprovedeno u skladu sa principima dobre stomatološke prakse i uz poštovanje osnovnih terapijskih protokola u toku lečenja pacijenata obolelih od parodontitisa. Svakom pacijentu je detaljno objašnjen postupak pravilnog održavanja oralne higijene.

U ovoj studiji je prvi put upotrebljena injektabilna forma PRF-a – i-PRF u toku nehirurške terapije parodontitisa (tokom lečenja parodontitisa aplikacija PRF je jedino bila u obliku fibrinske membrane tokom hirurških procedura). Ispitivana (P) i kontrolna (C) grupa predstavljaju kontralateralne strane jedne vilice, zbog čega nije postojala razlika u godinama, polu, opštem zdravstvenom stanju i drugim opštim faktorima koji mogu uticati na sam tok parodontitisa, kao ni na tok i ishod bilo kog terapijskog postupka.

U cilju procene stanja parodonticijuma, pre i posle terapije parodontitisa, korišćeni su parodontalni indeksi: PPD, LGM, CAL, BOP i PI. Na samom početku studije, pre početka primene terapije, zbog odabira pacijenata sa simetrično raspoređenim stepenom progresije parodontitisa, nije zabeležena statistički značajna razlika među merenim parametrima između kontrolne i ispitivane strane usne duplje. Nakon inicijalne terapije parodontitisa, u kombinaciji sa i-PRF-om ili bez njega, pozitivni klinički rezultati su očekivani imajući u vidu dosadašnje kliničke studije⁸⁷. Iako kauzalna terapija uklanjanja supra- i subgingivalnih čvrstih i mekih naslaga predstavlja „zlatni standard” u lečenju parodontitisa, ona pokazuje neke nedostatke i ograničenja, posebno kod dubokih parodontalnih džepova, komplikovane strukture, kao i onih sa nepovoljnom morfologijom korena zuba ili kod postojanja furkacionih defekata²⁸⁰. Inicijalnoj, tj. kauzalnoj terapiji se zbog toga dodaju pomoćna terapijska sredstva, kao što je sistemska i lokalna primena antibiotika ili lokalna primena antiseptika^{255, 281}. Kao što je već navedeno, upotreba antibiotika i lasera u toku inicijalne terapije parodontitisa pokazuje brojne nedostatke i kontradiktorne rezultate^{257, 282, 283}. Zbog toga se ulažu sve veći naponi za pronalazak novih terapijskih postupaka. Zagovornici tkivnog inženjeringa podržali su upotrebu različitih izvora autolognih faktora rasta tokom parodontalne hirurške terapije, tj. različitih koncentratata trombocita nazvanih u početku plazma bogata trombocitima (PRP)⁶.

PPD

Dubina sondiranja parodontalnog džepa (PPD) predstavlja glavni pokazatelj stepena inflamacije parodontalnog tkiva.

U našoj studiji vrednosti PPD, nakon upotrebe i-PRF-a u kombinaciji sa inicijalnom terapijom, pokazale su statistički manje vrednosti nakon vremenskog perioda od 1. meseca, a razlika se zadržala i nakon 3. i 6. meseca. Smanjenje prosečne vrednosti PPD-a nakon mesec dana u ispitivanoj grupi bilo je za približno 1,34 mm, nakon 3 meseca 1,76 mm i nakon 6 meseci 1,96 mm. U istim vremenskim intervalima u kontrolnoj grupi je redom došlo do smanjenja prosečne vrednosti PPD-a za približno 0,82 mm, 1,13 mm i na kraju za 1,29 mm. Dobijene vrednosti su u skladu sa ranijim istraživanjima. Pretpostavljamo da je glavni uticaj primene i-PRF bio na efikasnije smanjenje inflamacije u parodonticijumu, što je u skladu sa proverenom koncentracijom mikroorganizama nakon ovih vremenskih intervala, kao i posmatranih citokina (TNF- α i MMP-8).

Rezultati pojedinih studija upućuju na to da su u toku terapije hroničnog parodontitisa samo uz primenu SRP-a prosečna smanjenja PPD-a od 1,29 mm do 2,16, kao što su studije Van der Veijden-a i Kob (*Van der Weijden FA, Cobb CM*) i koautora²⁸⁴. U nekim preglednim radovima, dodatna smanjenja PPD-a zbog pridodatih sistemskih antibiotika pokazuju srednje razlike u rasponu od 0,18 do 1,26 mm (PPD)²⁸⁵.

Prednost i-PRF je višestruka. Osim kompleksnije fibrinske strukture u kojoj su zarobljeni svi faktori rasta u dužem vremenskom periodu poreklom iz trombocita, ove krvne pločice sadrže i granule bogate citokinima i hemokinima. Njihovim oslobađanjem dolazi do regrupisanja ćelija zapaljenja, poput neutrofila i makrofaga. Pod uticajem faktora hemotakse bivaju raspoređeni i aktivirani na samom mestu zapaljenja²⁸⁶.

Smanjenjem sile centrifugiranja u i-PRF koncentratu zaostaje veći procenat leukocita iz uzorka krvi²⁶⁶. Kao glavne imune ćelije organizma, značajnu ulogu imaju u samom odvijanju procesa inflamacije, kao i pokazanom antibakterijskom efektu u skorašnjim studijama¹³. Leukociti kao osnovni elementi imunološkog sistema koji sadrže različite antimikrobne peptide i enzime (npr. defenzine, katelicidine, lizozim, mijeloperoksidaze) imaju presudnu ulogu u odbrani od mikroorganizama kroz oksidativne i neoksidativne reakcije²⁸⁷. Iz toga proističe da leukociti doprinose antimikrobnom dejstvu i-PRF u *in vitro* uslovima, iako precizan mehanizam nije dovoljno rasvetljen²⁸⁸. Nekoliko studija pokazuje da leukociti iz i-PRF imaju ulogu u sprečavanju infekcije regulisanjem imunog odgovora²⁸⁹. U *in vitro* ispitivanju Kardi (*Kardee*) i saradnika, i-PRF je testiran na supragingivalnom plaku i pokazao je maksimalnu zonu inhibicije, znatno više od PRP i PRF¹³. Rezultati druge studije ukazuju na slične ishode, tj. maksimalno antibakterijsko delovanje u slučaju *P. g.* (ali ne za *A. a.*), nešto manje od strane PRP-a, a najmanje antibakterijsko dejstvo pokazao je PRF²⁹⁰. Osim toga što učestvuju u redukciji koncentracije mikroorganizama na obolelom mestu, leukociti učestvuju u angiogenezi i limfogenezi, dok je fibrinska mreža ključni igrač u ranim fazama zarastanja rana, što daje svoje sinergističke efekte sa trombocitima i funkciju rezervoara citokina²⁹¹.

Pored antibakterijskog dejstva, opisani su i antiinflamatorni efekti PRF-a. Doan sa saradnicima navodi da PRF ima imunološka svojstva zbog odvijanja procesa degranulacije leukocita i oslobađanja nekih pro- i antiinflamatornih citokina kao što je IL-4²⁷⁴.

CAL

Nivo pripojnog epitela (engl. *clinical attachment level*-CAL) je najznačajniji pokazatelj stepena destrukcije parodontalnog tkiva i najrelevantniji pokazatelj rezultata različitih terapijskih postupaka koji mogu smanjiti napredovanje parodontalne bolesti ili omogućiti i regeneraciju potpornih struktura zuba.

U našoj studiji su vrednosti nivoa pripojnog epitela, nakon intervala praćenja od 1 i 3 meseca, kao i 6 meseci pokazivale statistički značajna smanjenja u ispitavanoj u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$). Smanjenje ove vrednosti u kontrolnoj grupi je u skladu sa pregledima literature koji su pokazali da je tromesečna i šestomesečna kauzalna terapija dovela do promene ovog parametra sa 0,18 na 1,0 mm²⁹². Ukoliko se u toku kauzalne terapije primene i dodatne terapijske procedure, ova smanjenja se menjaju i do 1,2mm²⁹². Naši rezultati pokazali su smanjenja CAL-a čak za 0,774 mm nakon 6 meseci (sa 2,009±0,724 na 1,226±0,580), što odgovara jednom od boljih rezultata terapije u odnosu na kontrolnu grupu sa samo 0,425 mm smanjenja (2,018±,715 na 1,585±0,619). Studija koju je objavio Kristofer (*Christopher J.*) u 2015. godini potvrdila je smanjenje srednje vrednosti CAL-a nakon isključivo samo SRP terapije koja je bila 0,43 mm²⁹³.

Poređenja radi, sistematski pregled literature upućuje na to da terapija laserom pokazuje klinički smanjenje nivoa pripojnog epitela od 0,30 do 0,75 mm više ukoliko se koristi kao dodatak SRP terapiji u odnosu na samostalnu SRP²⁹⁴. Ove rezultate naravno treba uzeti sa rezervom zbog razlike u protokolima u pojedinim studijama, kao i zbog razlika između pacijenata, (ukoliko je u pitanju bio agresivni tip parodontopatije) ili postojanja nekih sistemskih oboljenja ili loših navika.

Primena i-PRF-a u toku SRP terapije u ovom istraživanju je dovela do većeg stepena smanjenja vrednosti CAL-a. Ovakav rezultat može biti posledica bržeg zarastanja parodontalne rane, kratkotrajnije inflamacije i efikasnijeg smanjenja koncentracije periopatogenih bakterija. Trojaka prednost i-PRF-a u odnosu na konvencionalni PRF i PRP se prepoznaje u kompleksnijoj strukturi fibrinske mreže, većem procentu zarobljenih trombocita i prisustvu leukocita.

-Fibrinska mreža: Regeneracija tkiva može biti potpomognuta samom fiziološkom mikroarhitekturom fibrinske mreže, koja može poslužiti kao skela za formiranje novog tkiva¹². Dobijen prirodnim postupkom polimerizacije tokom i nakon centrifugiranja ovakav matriks omogućava efikasniju migraciju i proliferaciju ćelija. I najvažnije, spora degranulacija trombocita i leukocita u ovakvoj mikrosredini dovodi do sporog otpuštanja faktora rasta, citokina i glikoproteina plazme tokom više od 10 dana (pa i 21 dan) u okolno tkivo²³. Pored navedenog, pokazano je da i-PRF sadrži veću koncentraciju faktora rasta od konvencionalnog PRF-a, koji ima veću koncentraciju od PRP. Šta više, ovaj matriks povoljno utiče na rast, razvoj i deobu fibroblasta gingive i periodontalnog ligamenta, oslobađanje dodatnih faktora rasta, kao i diferencijaciju osteoblasta²⁹⁵

Nasuprot tome, može se postaviti hipoteza o suprimirajućem dejstvu i-PRF-a na proliferaciju epitelnih ćelija zbog posedovanja TGF- β , koji je označen kao njihov inhibitor²⁹⁶. Sprečavanjem rasta pripojnog epitela duž površine korena zuba i suzbijanjem njegovog inkorporiranja između korena i vezivnog tkiva gingive, omogućava se formiranje novog epitelnog pripoja za površinu korena zuba²⁹⁷.

Primena i-PRF-a u regenerativnim tretmanima pokazano je da ima povoljne ishode²⁹⁸.

Uticaj trombocita

Trombociti mogu da eksprimiraju niz biološki aktivnih signalnih molekula osim svih ranije navedenih faktora rasta. Biološki aktivni proteini, poput fibrina, fibronektina i vitronektina deluju kao matrica vezivnog tkiva i kao adhezioni molekuli za efikasniju migraciju ćelija²³⁹. Citokini faktori hemotakse porekla trombocita mogu uticati na diferencijaciju makrofaga domaćina i makrofaga unutar ugruška posle implantacije. Pokazano je da A-PRF može uticati na regeneraciju kostiju i mekog tkiva, posebno kroz prisustvo monocita/makrofaga i njihovih faktora rasta²⁶⁹. Procentualni porast broja trombocita u i-PRF-u je za 503%, a u PRP-u za 464%. Ukoliko preparati sa većim brojem trombocita imaju i veću koncentraciju faktora rasta, i-PRF može izazvati veću migraciju fibroblasta i ekspresiju PDGF, TGF- β i kolagenal²³⁷.

Uticaj leukocita

Od naučnog i kliničkog značaja je činjenica da leukociti osim svoje primarne uloge učestvuju i u pokretanju regeneracije mekog tkiva, kao i remodelovanja koštanog tkiva. U toku odvijanja ovih procesa ključnu ulogu u sofisticiranoj unakrsnoj komunikaciji između ćelija prekursora i mezenhimnih ćelija igraju baš leukociti ekspresijom različitih signalnih molekula²⁹⁹. Pored toga, pokazano je da oslobađanje brojnih faktora rasta iz granula trombocita takođe biva potpomognuto dejstvom leukocita³⁰⁰. Sposobnosti leukocita da samostalno oslobađaju limfogene i angiogene faktore u značajnoj meri ubrzavaju regeneraciju tkiva, pojačavajući efekat trombocita na proces zarastanja rana³⁰¹.

U studiji Doana i saradnika iz 2009. pokazano je da leukociti u različitim autologim koncentratima trombocita stvaraju značajnu količinu TGF β -1 i VEGF i mogu se smatrati aktivnim izvorom faktora rasta. Kada nivo VEGF ili TGF β -1 postane previše nizak, leukociti mogu biti izvor novih molekula koji održava neophodni nivo ovih faktora rasta tokom dužeg vremena²³. Ovaj mehanizam treba detaljno analizirati, jer je uticaj leukocita na potencijalne biotehnoške primene Šokrunovog PRF-a ključni parametar. Štaviše, verovatno je da je sporo oslobađanje citokina u Šokrunovom PRF-u delimično regulisano leukocitima ugrađenim u PRF fibrinski matriks.

Ukoliko bi se proces regeneracije sveo na posmatranje fibroblasta, prekeratinocita, adipocita i osteoblasta u *in vitro* uslovima, aplikacija PRF dovela bi do njihove povećane proliferacije, ali i diferencijacije²³⁹. Kada se posmatra PRP u zavisnosti od doze, tj. sa povećanjem broja trombocita prilikom njegove aplikacije, dolaziće sve više do proliferacije ćelija, a sve manje do diferencijacije³⁰². Kod PRF-a se dogodilo da je sa povećanjem broja membrana za duplo (što znači dupli broj i trombocita, leukocita i faktora rasta), na kraju kod jednog dela ćelija povećana proliferacija, a kod drugog povećana diferencijacija iz istog medijuma³⁰³. Na isti način, efekti dva ključna faktora rasta iz trombocita, TGF β 1 i PDGF-AB, veoma su promenljivi prema početnom stanju ćelija: TGF β 1 deluje pre na diferencijaciju procesa, a PDGF-AB na proces proliferacije. Stimulacija PRF-a zavisna od doze na BMSC (engl. *Bone Marrow-derived Stem Cells*) kulturi ćelija je bila veoma značajna. Ovaj rezultat je čak nedavno potvrđen u nešto drugačijim periodima vremenima i eksperimentalnim uslovima.

Citotoksičnost

Značajno je da nekada visoke koncentracije trombocita u PRP preparatima mogu imati inhibitorno ili toksično dejstvo na kultivisane ćelije, kako je demonstrirano na kulturi osteoblasta³⁰⁴. Međutim,

aplikovanjem PRF-a ništa slično nije primećeno. MTT testovi pokazali su odsustvo citotoksičnosti PRF-a kod dve ispitivane doze. Takođe, druga istraživanja su potvrdila odsustvo citotoksičnosti tokom prvih sati (12 i 24h) na kulture humanih preadipocita, prekeratinocita, fibroblasta i osteoblasta ²²¹.

Uticaj fibrina

U pojedinim studijama se zaključuje da nije samo presudna uloga leukocita u PRF-u u odnosu na PRP, već i efekat samog fibrina koji pokazuje osteogeni efekat (diferencijaciju i proliferaciju osteoblasta) u posebno definisanim eksperimentalni uslovima ³⁰⁵. Zbog toga se koncentrat trombocita može tačno analizirati samo u celini, kao složena kombinacija trombocita i fibrina i leukocita u različitim količinama i konfiguracijama.

LGM

Nivo ivice gingive (*level of gingival margin* - LGM) je parametar koji je pri sličnim vrednostima CAL direktno zavistan od PPD i stepena redukcije inflamacije u parodontijumu. Naši rezultati pokazuju promenu LGM vrednosti u studijskoj grupi od $1,737 \pm 0,567$ mm do $0,808 \pm 0,518$ mm i kontrolnoj $1,787 \pm 0,589$ do $0,794 \pm 0,457$ mm, na početku terapije i nakon 6 meseci. Ovi rezultati jesu u skladu sa studijama koje prikazuju rezultate nehirurške, inicijalne terapije parodontitisa. Najveća promena se u studijskoj grupi dogodila nakon prvog meseca, kada je zabeležen pad na $0,948 \pm 0,573$ mm, za razliku od kontrolne grupe gde je izmerene prosečna vrednost od $1,150 \pm 0,462$ mm. Hjuž (Hughes) i saradnici su takođe zabeležili promene vrednosti LGM-a mesec dana nakon SRP terapije ³⁰⁶. Studija koju su realizovali Badersten i saradnici pokazuje da se promena LGM-a dešava u najvećoj meri u prva 2 – 3 meseca ³⁰⁷. Pomak u apikalnom ili koronarnom pravcu viđen u ranim mesecima (<3 meseca) može ostati isti ili se promeniti posle 3 meseca i može se stabilizovati za šest meseci ³⁰⁸. Dok su proučavali promenu vrednosti pojedinih kliničkih parametara stanja parodontalnog tkiva posle šest različitih načina lečenja, uključujući i samo primenu SRP, Linde (Lindhe) i saradnici su merili udaljenost od stenta do ivice gingive. Pronašli su smanjenje vrednosti LGM između početnog i šestomesečnog nalaza za mesta koja su imala početnu dubinu sondiranja veću od 4 mm i da je zarastanje rezultiralo izraženijom recesijom gingive u bukalnim tačkama merenja nego na aproksimalnim ³⁰⁹.

Procena vrednosti LGM parametra ima značajnu ulogu u parodontnoj terapiji i kritična je u estetskim zahvatima koji se odnose na restaurativnu stomatologiju ³¹⁰.

BOP

Devedestetih godina prošlog veka je indeks BOP proglašen jednim of najznačajnijih u kliničkoj proceni stanja parodontijuma, postignutih terapijskih rezultata i prognozi samog oboljenja. Utvrđeno je da

odsustvo BOP-a kao parametra sa vrlo visokom negativnom prediktivnom vrednošću (98,5%) ukazuje na stabilnost parodontalnog oboljenja³¹¹. Stepen BOP je značajno smanjen posle perioda od 3 meseca. Kliničko zdravlje gingive nakon uspešnog lečenja parodontitisa karakteriše odsustvo krvarenja pri sondiranju, dok se uspešnim lečenjem podrazumeva i prisustvo minimalnog broja mesta sa prisutnim BOP-om (<10%) ukoliko su dubine sondiranja ≤ 3 mm³¹². Ranije studije su čak označavale procenat BOP manji od 30% mesta sa pozitivnim ishodom kao BOP lokalnog karaktera³¹³. Naši rezultati su pokazali BOP nakon SRP u 33% tačaka merenja, a nakon SRP i i-PRF-a 15% tačaka, verovatno zbog postajanja parodontalnih džepova dubljih od 4mm.

Ukoliko želimo da utvrdimo pozitivan efekat sistemske upotrebe antibiotika u vezi sa BOP-om, on nije jasan zbog nekoherentnih rezultata. U nekim istraživanjima se nije mogao otkriti, dok je u drugim zabeleženo poboljšanje indeksa za 12,76%³¹¹.

BOP je koristan parametar za predviđanje kasnijeg pogoršanja bolesti. U pojedinim prospektivnim kohortnim studijama utvrđeno je odsustvo BOP-a kao parametra sa vrlo visokom negativnom prediktivnom vrednošću (98,5%), što ukazuje na parodontalnu nestabilnost³¹⁴. Prema analizi Svetske radionice za parodontologiju indeks BOP kao faktor rizika za napredovanje parodontitisa kod lečene i održavane populacije je bio veoma visok³¹⁵. Ovakav zaključak je donesen i na poslednjoj sednici održanoj 2018. godine, kada je naglašen značaj indeksa u proceni pojave gingivitisa, perimukozitisa i periimplantitisa¹²⁷.

PI

Svi pacijenti bili su obučeni i motivisani za pravilno održavanje oralne higijene. Ukoliko je to bilo potrebno, na kontrolnim pregeldima je vršena remotivacija pacijenata i ponovna provera njihove tehnike pranja zuba. Na početku ispitivanja nije izmerena statistički značajna razlika između studijske i kontrolne grupe. Kasnije se između pojedinih vremenskih intervala uočava statistički značajna razlika u smanjenju vrednosti ovog parametra. Možemo pretpostaviti da je ovakav tok smanjenja posledica dobre motivisanosti pacijenata da održe dobre postignute terapijske rezultate.

Promena koncentracije mikroorganizama u GCF

Širok spektar antibakterijske aktivnosti i-PRF-a verovatno je posledica kompleksnog sastava koji čine: trombociti, fibrin, fibronektin, trombin, defenzini, HBD-3 peptid (antimikrobni peptid), proteini koji vezuju heparin, laktoferin, mijeloperoksidaza, katelicidini i fosfolipaza A2^{316, 317}. Postojanje veze i istovremenog delovanja između trombocita, fibrina plazme i leukocita objašnjava antimikrobni efekat i-PRF-a³¹⁸.

Za razliku od intenzivnog proučavanja uloge različitih autoloških koncentrata trombocita (APC) u regeneraciji izgubljenog ili oštećenog tkiva, vrlo je malo sprovedenih istraživanja vezano za njihov antibakterijski potencijal.

Mogući mehanizmi kojima ovi koncentracije ispoljavaju antimikrobni efekat obuhvataju i osobine samih trombocita.

Uticaj trombocita

Trombociti deluju kao senzori vaskularnog sistema, ekspimirajući niz potencijalnih bakterijskih receptora, koji mogu imati sposobnost internalizacije bakterija i posledičnog oslobađanja širokog spektra molekula imunog sistema domaćina³¹⁹. Na površini trombocita postoji više vrsta receptora koji direktno ili indirektno preko interfejs proteina u plazmi učestvuju u ranoj imunološkoj odbrani. S druge strane, različite bakterijske vrste mogu modifikovati ovu funkciju i aktivaciju trombocita, u zavisnosti od soja. Otuda, dvosmerna interakcija između trombocita i bakterijskih patogena može rezultirati potpunom ili nepotpunom aktivacijom ili čak inhibicijom aktivacije trombocita³²⁰.

Pojedine *in vitro* studije pokazale su čak da trombociti nakon stimulacije trombinom mogu oslobađati proteine sa antimikrobnim delovanjem protiv bakterija i gljivica. Trombociti osim više od 30 različitih faktora rasta imaju u svojim sekundarnim granulama i 7 vrsta antimikrobnih proteina (*human platelet antimicrobial proteins*): *fibrinopeptide A* i *B*, *thymosin β4*, *platelet basic protein-PBP*, iz koga da lje nastaje *connective tissue activating protein III-CTAP-III*, *RANTES* i *platelet factor 4 -PRF 4*. Dejstvo PMP kada dolazi u kontakt sa bakterijskom membranom prepoznaje se u menjanju njene propustljivosti, ali i prodorom u ćeliju blokirajući sintezu važnih molekula³²¹.

Pokazano je da trombociti imaju antimikrobni efekat na meticilin osetljiv *S.aureus* (*metilcillin susceptible Staphilococcus aures –MSSA*), meticilin rezistentan *S. aureus* (*meticillin resistant staphilococu aureus – MRSA*), *E. Colli* i *C.albicans*. Pored oslobađanja antimikrobnih peptida, trombociti su sposobni da stvaraju i reaktivne vrste kiseonika, koje vezuju za mikroorganizme i učestvuju u ćelijskoj citotoksičnosti zavisnoj od antitela³²².

Nedavne studije istakle su čak direktnu ulogu trombocita u prepoznavanju, sekvenciranju i neutralizaciji invazivnih patogena, kao i njihov indirektni doprinos u regrutovanju leukocita na mesto infekcije i upale i ulogu u modulaciji njihovog ponašanja, poboljšavajući sposobnost fagocitoze i neutralisanja mikroorganizama aktiviranjem različitih vrsta signalnih puteva³²³.

Rezultati različitih studija iz literature upućuju na to da koncentracije trombocita mogu biti efikasni u inhibiciji rasta širokog spektra mikroorganizama. Međutim, kada se uzmu u obzir određene bakterijske vrste, rezultati su ponekad bili kontradiktorni. Uočene varijabilnosti u rezultatima bi se mogle pripisati vrstama korišćenih koncentrata trombocita koji se mogu razlikovati po konzistenciji i načinu aplikacije (gel ili tečnost), koncentraciji trombocita, sadržaju leukocita, gustini i strukturi mreže fibrina ili pak načinu aktivacije koji se prirodno može javiti kontaktom sa tkivima ili može biti indukovana trombinom ili kalcijum hloridom.

Uticaj fibrina

Međutim, značajno je da u nedostatku plazme antimikrobni potencijal samih trombocita postaje zanemarljiv. Između različitih komponenti plazme (npr. komplement) i trombocita postoji sinergistički efekat³²⁴. Oni mogu uticati na aktiviranje sistema komplementa koji dovodi do lize bakterijske ćelije ili do regrutovanja leukocita, što povećava uticaj trombocita.

U i-PRF-u se fibrinogen polako i prirodno polimerizuje u fibrin koristeći trombin koji je fiziološki dostupan i na taj način formira arhitekturu koja pomaže u mikrovaskularizaciji, a tako indukuje i migraciju ćelija³²⁵.

Uticaj leukocita

Leukociti predstavljaju bogat izvor antimikrobnih molekula (npr. defenzina, katelicidina, lizocima, mijeloperoksidaze). Leukociti, kao osnovni elementi imunološkog sistema koji sadrže razne antimikrobne peptide i enzime, pod uticajem hemotakse migriraju na obolelo mesto. Stimulisani leukociti procesom degranulacije ispuštaju svoj sadržaj u fagozome, čime se eliminišu progutani mikroorganizmi putem oksidativnih i neoksidativnih reakcija. Međutim, u ovom istraživanju je interesantan sam uticaj leukocita primenjenih direktno na obolelo mesto, zaobilazeći fiziološku fazu migracije.

Za razliku od PRP, i-PRF zbog načina pripreme bez antikoagulantnog sredstva eliminiše mogućnost stvaranja antitela protiv faktora zgrušavanja V i XI i trombina i znatno smanjuje mogućnost nastanka infekcije skraćivanjem postupka manipulacije tokom pripreme. Veći broj ćelija koje sadrži i-PRF (leukociti i trombociti) povećava antimikrobno dejstvo ovog koncentrata. Zadržavanje i nekih drugih ćelija, kao što su matične ćelije, razlikuje i-PRF od drugih koncentrata trombocita²⁶⁹.

Osim toga što ćelije unutar fibrinskog matriksa neprestano oslobađaju antimikrobne peptide protiv ciljanih bakterija i antimikrobni peptidi su zarobljeni u fibrinskom matriksu i lagano se otpuštaju tokom njegove razgradnje. Pozitivna razlika i-PRF u odnosu na PRP je i u dužini perzistiranja i-PRF u obliku gela, dok se PRP brže rastvara, pa se i njegov antimikrobni efekat može posmatrati samo u kraćem vremenskom periodu.

U pojedinim studijama je zabeležena veća antimikrobna aktivnost i-PRF prema *P. g.*, koja se može objasniti na ove načine (veća koncentracija ćelija i antibakterijskih peptida). Međutim, kada je u pitanju *A. a.*, otkrivene su manje zone inhibicije za i-PRF u poređenju sa PRP, što se pripisuje antibakterijskom delovanju natrijum-citrata iz PRP⁶. U studijama u kojima nije primećena razlika između PRP-a i i-PRF u slučaju *P. g.* i PRF i i-PRF u slučaju *A. a.*, autori ukazuju na potrebu za većom količinom uzorka i praćenje tokom dužeg vremena.

U studiji Ane Kastro (*Ana B. Castro*) i saradnika i-PRF je pokazao širok spektar dejstva u *in vitro* uslovima na više vrsta biofilma slabe, umerene ili velike koncentraciji pojedinih sojeva stafilokoka *A.* Takođe, aplikacija i-PRF suprimirala je značajno stvaranje biofilma od strane svih oralnih mikroorganizama²⁹⁸.

U drugim *in vitro* studijama i sistemskim preglednim radovima, koje većinom uključuju aplikaciju PRP-a, i samo nekoliko radova sam PRF, pokazan je izrazito antibakterijski efekat u prvim satima nakon njihove aplikacije, a potom nakon nekog vremena zabeležen je porast koncentracije bakterija. Na dalje treba utvrditi da li ovi koncentri imaju bakteriostatsko ili baktericidno delovanje^{316, 318}.

Animalni *in vivo* modeli su uglavnom predstavljali mesta sa patologijom osteomijelitisa i uvek su pokazivala izrazito smanje broja ispitivnih mikroorganizama. Eksperimentalna zapažanja sugerisala su da bi PRP mogao predstavljati novu strategiju za sprečavanje koštanih infekcija, zahvaljujući sposobnosti da podstiče regeneraciju kosti zajedno sa kontrolom rasta i širenja mikroorganizama.

Što se tiče humanih *in vivo* studija, jedino su dolazile u obzir retrospektivne komparativne studije. Kod kardiohirurških pacijenata sa površinski ili duboko inficiranim ranama, ili u slučaju hroničnog osteomijelitisa femura, pokazalo se da je značajno kraće vreme oporavka onih rana koje su tretirane trombocitnim gelom³²⁶. Takođe je smanjen postoperativni gubitak krvi i dužina boravka u bolnici i bolnički troškovi.

Pregledom literature može se sagledati dugogodišnja analiza različitih autologih koncentrata trombocita na mikroorganizme usne duplje, ali i na druge mikroorganizme. Prisustvo većeg broja leukocita u L-PRF-u nego u prvobitno sintetisanom PRF-u dokazano je da pokazuje antimikrobno dejstvo prema *P.g. Bornuf (Burnouf)* i saradnici opisali su inhibiciju rasta pojedinih bakterija plazmom bogatom trombocitima (PRP) kao što su: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphilococcus aureus* i *Escherichia coli* u planktonskom obliku, nakon 3 sata aerobne inkubacije. Nema statistički značajne inhibicije za *P. i.*, *F. nucleatum* i *A. a.*³²⁷. Edelblut (*Edelblute*) i saradnici su objavili slične rezultate. Tej i saradnici su zaključili da humani trombocitni supernatanti inaktiviraju oportunističke patogene na koži, kao što su *S. aureus* i *Acinetobacter baumannii*, ali ne i *P. aeruginosa*³²⁸.

Kada pogledamo oralne mikroorganizme, na primer, *Enterococcus faecalis* i *Candida albicans*, koji su izolovani iz usne šupljine, inhibirani su čak i čistom plazmom bogatom trombocitima (P-PRP), vrstom PRP bez leukocita³²⁴. Lang (*Lang*) i saradnici su pokazali inhibiciju *P. g.* i *A. a.* od strane PRP-a, dok inhibicija *F. Nukleatum*-a nije primećena. Samo pre godinu dana, Kur (*Kour*) i saradnici (2018) upoređivali antibakterijski kapacitet PRP, PRF i injektibilnog PRF (i-PRF) prema *P. g.* i *A. a.*³²⁹. Zaključili su da sva tri koncentrata trombocita pokazuju neko antibakterijsko delovanje protiv obe bakterije. Međutim, PRP i i-PRF su pokazali značajno veću inhibiciju *P. g.*-a u poređenju sa PRF-om. U našoj studiji može se opaziti ograničena inhibicija *A. a.*, što se razlikuje od njihovih rezultata. Upotrebljeni soj bakterija i činjenica da je inkubirana anaerobno *A. a.* možda su uticali na efekat PRF-a.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

U studiji u čijem je fokusu bilo antimikrobno dejstvo L-PRF-a na *A. a.* mogu se primetiti dva efekta. Prvo, L-PRF može ugroziti agregaciju tih bakterija²⁹⁸. Bakterije unutar zajedničkih ko-agregata lakše preživljavaju i razmnožavaju se brže nego pojedinačne bakterijske ćelije. Drugi efekat je inhibicija rasta *A. a.*, koja je otkrivena u kontaktu sa L-PRF. Zna se da svež humani serum pojačava dejstvo leukotoksina ovih bakterija³³⁰,³³¹. Johanson (*Johansson*) i saradnici naznačili su da je povećana leukotoksičnost *A. a.* posmatrana u prisustvu ljudskog seruma uzrokovana inhibitorima proteaza iz seruma, koji deluju na proteolitičku degradaciju leukotoksina³³².

Studije o izolovanom efektu trombocitnih koncentrata na bakterije *P. i.* u *T. f.* još uvek nisu objavljene. Poznat je svakako antimikrobni efekat na smanjenje ukupne koncentracije bakterija dentalnog plaka, pogotovo crvenog i narandžastog kompleksa²⁹⁸.

Porphyromonas gingivalis

P. g. je bio najviše inhibirani soj bakterija u ovoj studiji. Međutim, u literaturi nema dokaza koji pokazuju direktan uticaj komponenata krvi ili trombocitnih koncentrata na *P. g.*. Inhibitori proteinaze čine 10% proteinskog sadržaja krvne plazme i oni mogu da poboljšaju aktivnost gingipaina, koji je poznat kao primarni faktor virulencije ove bakterije. Primer inhibitora proteinaza je humani alfa-2-makroglobulin; pronađen je veliki protein u plazmi u krvi koja inhibira RgpA i RgpB, ali ne i Kgp u in vitro studiji³²¹. Gingipain takođe igra važnu ulogu u preživljavanju bakterija unutar ćelija domaćina zbog sposobnosti *P. g.* za ćelijsku invaziju i za prevazilaženje zaštitnih mehanizama epitelnih ćelije³³³. Rezultati studije pokazali su antimikrobno delovanje L-PRF membrane protiv *P. g.* na pločama sa agarom. U planktonskom obliku primećena je inhibicija zavisna od doze protiv *P. g.* od strane L-PRF-a²⁹⁰.

BIOHEMIJSKI PARAMETRI

Uprkos uzročnoj ulozi mikrobnog plaka u nastanku parodontalne bolesti, progresiju i težinu bolesti uglavnom određuju kako urođeni, tako i stečeni imuni odgovori domaćina³³⁴.

Narušavanje ravnoteže između velikog broja citokina, hemokina i faktora rasta može poremetiti trajanje, intezitet i stepen progresije parodontitisa¹⁴¹. U zavisnosti od kinetike ovih molekula, oboljenje parodonticijuma može se manifestovati od subkliničke forme do izraženog destruktivnog parodontitisa¹⁷³.

Aktivnost citokina određena je specifičnim inhibitorima citokina i receptorima za citokine na površini drugih ćelija, kojima oni regulišu imuni odgovor domaćina. Među mnoštvom inflamatornih posrednika identifikovanih u GCF, citokini su privukli značajnu pažnju zbog svoje potencijalne uloge u procesu destrukcije ili regeneracije parodontalnih tkiva tokom inflamacije. Rani odgovor na bakterijsku agresiju i porast njihovih nivoa u GCF uključuju između ostalih i faktor nekroze tumora α (TNF- α) i matriksnu-metaloproteinazu-8 (MMP-8) i alkalnu fosfatazu (ALP)³³⁵.

Faktor nekroze tumora α – TNF- α

Prodorom periopatogena i/ili njihovih produkata u vezivno tkivo gingive dolazi do aktiviranja endotelih ćelija, neutrofilnih leukocita, monocita/makrofaga, monocita/T limfocita, kao i fibroblasta. Kao odgovor na njihovu stimulaciju, monociti/makrofazi intenzivno luče TNF- α . Potvrđeno je da TNF- α , kao proinflamatorni citokin - u toku indukcije parodontitisa na eksperimentalnim životinjama - ima značajnu ulogu u stimulisanju odgovora domaćina i pokretanju inflamatorne reakcije, gubitku epitelnog i vezivnog tkiva, kao i resorpciji alveolarne kosti. Li (*Lee*) i saradnici su pokazali da TNF- α može biti prediktor parodontitisa zbog povećanja koncentracije u GCF i pre apikalne migracije nivoa pripojnog epitela i resorpcije alveolarne kosti³³⁶. Štaviše, nove studije obavljene na životinjama ukazuju na to da su specifični solubilni antagonisti TNF- α i IL-1 sposobni da suprimiraju razgradnju vezivnog tkiva i alveolarne kosti³³⁷. Pored toga, pokazano je da kratkotrajne blokade ovog proinflamatornog citokina stimulatивно deluju na zarastanje parodontalnog tkiva³³⁸.

U našoj studiji je u toku SRP došlo do smanjenja koncentracije TNF- α u GCF-u tokom perioda od 6 meseci što je pokazalo efikasnost ovog pristupa za očekivano smanjenje inflamacije. Zapaženo smanjenje koncentracije TNF- α u ispitivanoj grupi bilo je značajno veće što upućuje na to da i-PRF pozitivno utiče na proces inflamacije u parodontnom tkivu ($p = 0,000 *$) nakon procenjenog perioda. Može se pretpostaviti da poboljšanje nivoa TNF- α može biti direktna posledica smanjenja periopatogenih mikroorganizama u parodontnim lezijama putem i-PRF aplikacije.

Pored toga, Erdemir (*Erdemir*) i saradnici su ispitivali efekat kauzalnog lečenja parodontitisa na nivo GCF TNF- α i pokazali su statistički značajno smanjenje u periodu od 6 meseci nakon početne terapije³³⁹.

Naši rezultati usklađeni su samo sa jednim istraživanjem laserske terapije, dok su ostala istraživanja pokazivala samo diskretna smanjenja vrednosti TNF- α ³⁴⁰. U studiji adjuvantnog dejstva nesteroidnog antiinflamatornog leka (NSAID), tenoksikam, tokom kauzalne terapije, nije nađena značajna razlika u nivoima TNF- α između eksperimentalnih i kontrolnih grupa čak ni posle mesec dana³⁴¹.

Matriksna-metaloproteinaza-8 – MMP-8

Budući da kolagen tip-I predstavlja osnovnu komponentu vanćelijskog matriksa vezivnog tkiva gingive i periodontalnog ligamenta, posebna pažnja posvećena je kolagenazi-2 ili MMP-8³⁴². MMP-8 trenutno predstavlja jedan od najperspektivnijih biomarkera (u GCF) inflamiranog parodontcijuma^{160, 182}. Koncentracija MMP-8 je povećana u GCF kod pacijenata sa parodontitisom³⁴³ i smatra se da ima ključnu ulogu u destrukciji i remodelaciji tkiva parodontcijuma, zbog čega se može koristiti u dijagnostici oboljenja parodontcijuma^{344, 345}. Osim kolagena u mekom tkivu, MMP učestvuju i u razgradnji kolegana nemineralizovanog osteoida, što u kombinaciji sa izraženom aktivnošću osteogenih ćelija ima veliki uticaj na remodelaciju kosti. MMP aktivnost je strogo regulisana putem ekspresije

gena, aktiviranja proenzima i inhibicije enzima od strane endogenih inhibitora, kao što su tkivni inhibitori MMP (TIMPs) (kao i autoregulacija). Izlučuju ih ćelije koje čine prvu liniju odbrane od stranih patogena, zbog čega koncentracija MMP vrlo brzo raste, omogućavajući dodatno migraciju ovih ćelija razgradnjom ekstracelularnog matriksa. Predominantno se izlučuje MMP-8 (i manje MMP-9) od strane PMN ćelija ¹⁴².

Pokazano je da inicijalna terapija parodontitisa dovodi do značajnog smanjenja nivoa MMP-8 u GCF ³⁴⁵. U našoj studiji se uočava veće smanjenje koncentracije MMP-8 u studijskoj grupi nego u kontrolnoj, što daje dodatne dokaze o povoljnom uticaju i-PRF na antiinflamatorne procese u parodontnom tkivu tokom čitavog perioda praćenja.

Promene koncentracije MMP-8 u GCF usko su povezane sa imunim odgovorima na terapiju kod pacijenata sa hroničnim parodontitisom ³⁴⁶. Novija istraživanja pokazuju da koncentracija MMP-8 u GCF opada nakon prve faze terapije, ali smanjenje dostiže značajne nivoe tek nakon 8 nedelja ili duže. Istovremeno, koncentracije MMP-8 izolovane iz GCF parodontalnih džepova, koji pokazuju znakove ireverzibilne destrukcije tkiva, ukazuju na višestruko veće vrednosti ³⁴⁵.

Studije usredsređene na efekte antiinflamatornih i antimikrobnih lekova kao dodatka terapiji SRP sugerisale su njihove povoljne efekte na smanjenje nivoa GCF MMP-8 ¹⁶³. Slično nalazima ove studije, Portagi (*Pourtaghi*) i njegovi saradnici primetili su značajne promene koncentracije MMP-8 u svim vremenskim intervalima ³⁴⁷. Uporedivi nalazi su sa nalazima studije Goncalvs (*Goncalves*) i saradnika koji su primetili značajno smanjenje nivoa MMP-8 nakon SRP i sistemske upotrebe *amoksicilina* i *metronidazola* ³⁴⁸. Direktno inhibitorno dejstvo tetraciklina na aktivnost MMP-a je odavno pokazao Golub sa saradnicima na animalnom modelu ¹⁶⁷. Kasnije je potvrđeno da tetraciklini preko mehanizma direktno zavisnog od kalcijuma i cinka, a indirektno preko inhibicije drugih metabolita PMN ćelija (HOCl), i inhibicijom osteoblast i osteoklast dobijene kao i MMP, zaustavljaju razgradnju kosti ¹⁶¹.

Osim smanjenja koncentracije mikroorganizama tokom lečenja parodontitisa, posledično i polimorfonuklearnih ćelija, neophodno je nadalje razjasniti i druge mehanizme kojima i-PRF deluje na smanjenje koncentracije MMP-8. Stimulacijom regeneracije u početnim fazama zarastanja rane prisutne su visoke koncentracije faktora rasta u i-PRF, ali i MMP-8 ³⁴⁹. Međutim u jednoj *in vitro* studiji + pokazano je da fibrinska membrana trombocitnih koncentrata zadržava u dužem vremenskom periodu oslobađanje faktora rasta i na taj način ih štiti baš od proteolitičkog dejstva MMP, a da koncentracija MMP-8 nema značajnog uticaja u aplikovanoj regiji ³⁵⁰. Neophodna su dalja istraživanja koja bi pokazala uticaj i-PRF na samu koncentraciju MMP-8.

Alkana fosfataza – ALP

ALP pokazuje dvostruku ulogu u parodontalnom tkivu. Proizvode ga polimorfonuklearne ćelije (PMN) tokom zapaljenja, osteoblasti i fibroblasti parodontalnog ligamenta tokom stvaranja kostiju i regeneracije parodontalnog tkiva. Stoga, povećani nivo ALP-a nakon 6 meseci može ukazivati ili na recidivirajuće zapaljenje ili na izlečenje. Imajući u vidu kontinuirano smanjenje nivoa TNF- α i MMP-8 tokom trajanja ispitivanja, zajedno sa poboljšanjem kliničkih parametara i održavanjem niskih nivoa bakterija u GCF-u, može se pretpostaviti da je porast koncentracije ALP posledica povećanja regeneracije tkiva, a ne posledica recidiva upale.

Primena i-PRF-a pokazuje veliki potencijal za podsticanje proliferacije i diferencijacije osteoblasta, kao što je pokazano u prethodnim *in vitro* studijama^{295, 239} što bi trebalo dovesti do posledičnog porasta nivoa ALP poreklom osteoblasta. Štaviše, primena PRF-a i dvofaznog kalcijum-fosfata tokom hirurškog tretmana ometala je pričvršćivanje osteoklasta na koštani matriks i inicirala njihovu apoptozu³⁵¹. Dalje praćenje moglo bi pružiti dodatni uvid u promene koncentracije ALP-a u vezi sa primenom i-PRF-a.

6. ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA

Nakon sprovedenog istraživanja, u skladu sa postavljenim ciljevima i dobijenim rezultatima prema utvrđenoj metodologiji ove studije, možemo izvesti sledeće zaključke:

- Primena i-PRF u toku inicijalne terapije parodontitisa dovodi do statistički značajnog poboljšanja kliničkih parametara ispitanika nakon svakog od definisanih intervala praćenja (1 mesec, 3meseca i 6 meseci).
- Vrednosti svih kliničkih parametara nakon primene i-PRF-a u inicijalnoj terapiji su pokazivale statistički značajno poboljšanje u odnosu na izmerene vrednosti samo nakon inicijalne terapije, osim PI koji je uslovljen isključivo stepenom održavanja oralne higijene.
- Aplikacija i-PRF-a u toku inicijalne terapije parodontitisa zadržava statistički značajnu razliku posmatranih kliničkih parametara i nakon 6 meseci, što ukazuje na moguće dugoročne povoljne efekte na kliničko stanje parodontijuma pacijenata sa parodontitisom.
- Analizom uzoraka koncentracije *A. a.*, *P. g.*, *P. i.* i *T. f.* nakon 1 meseca i *A. a.*, *P. g.* i *T. f.* nakon 3 meseca od sprovedee terapije, uočava se statistički značajna razlika između posmatranih grupa, a nakon 6 meseci se ona gubi.
- Ukupna koncentracija ispitivanih parodontopatogena u gingivalnoj tečnosti nakon sprovedene obe vrste terapije je statistički značajno manja nakon 1 i 3 meseca između posmatranih grupa, dok se nakon 6 meseci razlika više ne uočava, najverovatnije zbog *split mouth* dizajna studije.
- Koncentracije TNF- α , MMP-8 i ALP u gingivalnoj tečnosti posmatrane grupe uzoraka uz primenjen i-PRF su statistički značajno manje nakon svakog intrvala praćenja, osim za MMP-8 nakon 6 meseci.
- Međugrupnim poređenjem i regresionom analizom svih posmatranih parametara, kao faktor predikcije pojavljuje se razlika u dubini sondiranja nakon prvog meseca, što potvrđuje efikasniji antiinflamatorni efekat terapije dodatkom i-PRF-a. Zabeležena je i statistički značajna razlika indeksa krvarenja na provokaciju nakon 6 meseci.
- Analizom parametra PPD u šestomesečnom vremenskom intervalu, kao faktor predikcije se izdvaja vrednost ovog parametra nakon 3 meseca i vrednost TNF- α nakon mesec dana. Možemo zaključiti da je smanjenje vrednosti TNF- α nakon mesec dana u ispitivanoj grupi uticalo na smanjenje vrednosti PPD nakon 3 meseca i izdvojilo se kao faktor predikcije za statistički značajnu razliku u korist PPD nakon 6 meseci.
- Analizom vrednosti paramtera CAL u linearnom regresionom modelu, nakon perioda od 6 meseci, kao faktor predikcije izdvaja se vrednost ovog parametra nakon mesec dana. Smanjenje ovog parametra u prvom mesecu u grupi sa aplikovanim i-PRF-om će rezultovati boljim terpijskim ishodom i kliničkim stanjem parodontijuma nakon 6 meseci.

7. LITERATURA

1. Drisko CL. Periodontal debridement: still the treatment of choice. *J Evid Based Dent Pract.* 2014;14 Suppl:33-41.e31.
2. Pihlstrom B. Treatment of periodontitis: key principles include removing subgingival bacterial deposits; providing a local environment and education to support good home care; providing regular professional maintenance. *J Periodontol.* 2014;85(5):655-656.
3. Marcaccini AM, Pavanelo A, Nogueira AV, Souza JA, Porciúncula HF, Cirelli JA. Morphometric study of the root anatomy in furcation area of mandibular first molars. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(1):76-81.
4. Gassling VL, Açil Y, Springer IN, Hubert N, Wiltfang J. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(1):48-55.
5. Giannobile WV. The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. *Journal of Periodontology.* 1996;67(5):545-553.
6. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e37-44.
7. Sunitha Raja V, Munirathnam Naidu E. Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res.* 2008;19(1):42-46.
8. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(4):1207-1210.
9. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e45-50.
10. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27(3):158-167.
11. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(6):638-646.
12. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunit?? en paro-implantologie: Le PRF. *Implantodontie.* 2001;42:55-62.
13. Karde PA, Sethi KS, Mahale SA, Khedkar SU, Patil AG, Joshi CP. Comparative evaluation of platelet count and antimicrobial efficacy of injectable platelet-rich fibrin with other platelet concentrates: An. *J Indian Soc Periodontol.* 2017;21(2):97-101.
14. Lekovic V, Milinkovic I, Aleksic Z, et al. Platelet-rich fibrin and bovine porous bone mineral vs. platelet-rich fibrin in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Periodontol Res.* 2012;47(4):409-417.
15. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol.* 2010;81(4):546-555.
16. Jankovic S, Aleksic Z, Milinkovic I, Dimitrijevic B. The coronally advanced flap in combination with platelet-rich fibrin (PRF) and enamel matrix derivative in the treatment of gingival recession: a comparative study. *Eur J Esthet Dent.* 2010;5(3):260-273.
17. Aroca S, Keglevich T, Nikolidakis D, et al. Treatment of class III multiple gingival recessions: a randomized-clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2010;37(1):88-97.

18. White JG, Krumwiede M. Further studies of the secretory pathway in thrombin-stimulated human platelets. *Blood*. 1987;69(4):1196-1203.
19. Zucker-Franklin D, Benson KA, Myers KM. Absence of a surface-connected canalicular system in bovine platelets. *Blood*. 1985;65(1):241-244.
20. Hamdan AA, Loty S, Isaac J, Bouchard P, Berdal A, Sautier JM. Platelet-poor plasma stimulates the proliferation but inhibits the differentiation of rat osteoblastic cells in vitro. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(6):616-623.
21. Su CY, Kuo YP, Tseng YH, Su CH, Burnouf T. In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(1):56-61.
22. Assoian RK, Grotendorst GR, Miller DM, Sporn MB. Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets. *Nature*. 1984;309(5971):804-806.
23. Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*. 2009;27(1):63-69.
24. Goto H, Matsuyama T, Miyamoto M, Yonamine Y, Izumi Y. Platelet-rich plasma/osteoblasts complex induces bone formation via osteoblastic differentiation following subcutaneous transplantation. *J Periodontal Res*. 2006;41(5):455-462.
25. Woodall J, Tucci M, Mishra A, Benghuzzi H. Cellular effects of platelet rich plasma: a study on HL-60 macrophage-like cells. *Biomed Sci Instrum*. 2007;43:266-271.
26. Petrungaro PS, Windmiller N. Using transitional implants during the healing phase of implant reconstruction. *Gen Dent*. 2001;49(1):46-51.
27. Chapple IL, Van der Weijden F, Doerfer C, et al. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2015;42 Suppl 16:S71-76.
28. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, et al. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res*. 2017;96(4):380-387.
29. Dye BA. Global periodontal disease epidemiology. *Periodontol 2000*. 2012;58(1):10-25.
30. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):23-35.
31. López R, Baelum V. Periodontal disease classifications revisited. *Eur J Oral Sci*. 2015;123(6):385-389.
32. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health*. 2006;6 Suppl 1:S14.
33. Majno G. Inflammation and infection: historic highlights. *Monogr Pathol*. 1982(23):1-17.
34. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S1-S8.
35. MS T. *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology*. Chicago: Quintessence Books; 1994.
36. ter Linde JJ, Liang H, Davis RW, Steensma HY, van Dijken JP, Pronk JT. Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1999;181(24):7409-7413.
37. J L, R R, I L, et al. Consensus Report: Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*. 1999;4(1):38-38.

38. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S173-S182.
39. Rowland RW. Necrotizing ulcerative gingivitis. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):65-73; discussion 78.
40. Feller L, Anagnostopoulos C, Bouckaert M, Raubenheimer EJ. HIV/TB co-infection: literature review and report of multiple tuberculosis oral ulcers. *SADJ*. 2005;60(8):330-332, 343.
41. Tonetti MS, Christiansen AL, Cortellini P. Vertical subclassification predicts survival of molars with class II furcation involvement during supportive periodontal care. *J Clin Periodontol*. 2017;44(11):1140-1144.
42. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S159-S172.
43. Raitapuro-Murray T, Molleson TI, Hughes FJ. The prevalence of periodontal disease in a Romano-British population c. 200-400 AD. *Br Dent J*. 2014;217(8):459-466.
44. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014;93(11):1045-1053.
45. Jin LJ, Lamster IB, Greenspan JS, Pitts NB, Scully C, Warnakulasuriya S. Global burden of oral diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health. *Oral Dis*. 2016;22(7):609-619.
46. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *J Clin Periodontol*. 2017;44(5):456-462.
47. Jepsen S, Blanco J, Buchalla W, et al. Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*. 2017;44:S85-S93.
48. Benjamin RM. Oral health: the silent epidemic. *Public Health Rep*. 2010;125(2):158-159.
49. Zijngé V, van Leeuwen MB, Degener JE, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*. 2010;5(2):e9321.
50. Fenesy KE. Periodontal disease: an overview for physicians. *Mt Sinai J Med*. 1998;65(5-6):362-369.
51. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet*. 2012;13(4):260-270.
52. Pflughoeft KJ, Versalovic J. Human microbiome in health and disease. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:99-122.
53. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. 2005;38:135-187.
54. Overman PR. Biofilm: a new view of plaque. *J Contemp Dent Pract*. 2000;1(3):18-29.
55. Sharma A, Sojar HT, Glurich I, Honma K, Kuramitsu HK, Genco RJ. Cloning, expression, and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037. *Infect Immun*. 1998;66(12):5703-5710.
56. Yoo JY, Kim HC, Zhu W, et al. Identification of *Tannerella forsythia* antigens specifically expressed in patients with periodontal disease. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;275(2):344-352.
57. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134-144.

58. Wolff L, Dahlén G, Aepli D. Bacteria as Risk Markers for Periodontitis. *J Periodontol.* 1994;65 Suppl 5S:498-510.
59. Statnikov A, Alekseyenko AV, Li Z, et al. Microbiomic signatures of psoriasis: feasibility and methodology comparison. *Sci Rep.* 2013;3:2620.
60. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends Microbiol.* 2018;26(3):229-242.
61. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1986;13(10):905-911.
62. Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:92.
63. Marsh PD. Dentifrices containing new agents for the control of plaque and gingivitis: microbiological aspects. *J Clin Periodontol.* 1991;18(6):462-467.
64. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 2014;35(1):3-11.
65. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):30-44.
66. Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol Med.* 2015;21(3):172-183.
67. B D. *Klinička parodontologija.* 2019.
68. Blieden TM. Tooth-related issues. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):91-97.
69. Offenbacher S, Salvi GE. Induction of prostaglandin release from macrophages by bacterial endotoxin. *Clin Infect Dis.* 1999;28(3):505-513.
70. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1979;6(5):351-382.
71. Huang RJ, Li MY, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011;2(5):435-444.
72. Hou GL, Tsai CC, Huang JS. Relationship between molar root fusion and localized periodontitis. *J Periodontol.* 1997;68(4):313-319.
73. Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J.* 2012;6(6):1176-1185.
74. Li Y, He J, He Z, et al. Phylogenetic and functional gene structure shifts of the oral microbiomes in periodontitis patients. *ISME J.* 2014;8(9):1879-1891.
75. Mandell RL, Socransky SS. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. *J Periodontol.* 1981;52(10):593-598.
76. Haffajee AD, Socransky SS, Ebersole JL, Smith DJ. Clinical, microbiological and immunological features associated with the treatment of active periodontosis lesions. *J Clin Periodontol.* 1984;11(9):600-618.
77. Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. 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.* 2006;56(Pt 9):2135-2146.
78. Baehni P, Tsai CC, McArthur WP, Hammond BF, Taichman NS. Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of a plaque-derived gram-negative microorganism. *Infect Immun.* 1979;24(1):233-243.

79. König MF, Abusleme L, Reinholdt J, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2016;8(369):369ra176.
80. Li X, Zhou L, Takai H, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans lipopolysaccharide regulates bone sialoprotein gene transcription. *J Cell Biochem*. 2012;113(9):2822-2834.
81. Naqvi AR, Fordham JB, Khan A, Nares S. MicroRNAs responsive to Aggregatibacter actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis LPS modulate expression of genes regulating innate immunity in human macrophages. *Innate Immun*. 2014;20(5):540-551.
82. Schenkein HA, Barbour SE, Berry CR, Kipps B, Tew JG. Invasion of human vascular endothelial cells by Actinobacillus actinomycetemcomitans via the receptor for platelet-activating factor. *Infect Immun*. 2000;68(9):5416-5419.
83. Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. Intracellular Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect Immun*. 2001;69(4):2700-2707.
84. Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. How we got attached to Actinobacillus actinomycetemcomitans: A model for infectious diseases. *Periodontol 2000*. 2006;42:114-157.
85. Jiang Y, Graves DT. Periodontal pathogens stimulate CC-chemokine production by mononuclear and bone-derived cells. *J Periodontol*. 1999;70(12):1472-1478.
86. Claesson R, Johansson A, Belibasakis G, Hånström L, Kalfas S. Release and activation of matrix metalloproteinase 8 from human neutrophils triggered by the leukotoxin of Actinobacillus actinomycetemcomitans. *J Periodontol Res*. 2002;37(5):353-359.
87. Kinane D, Bouchard P, Periodontology GEoEWo. Periodontal diseases and health: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2008;35(8 Suppl):333-337.
88. Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA, Progulske-Fox A. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(3):e17-18.
89. Brodala N, Merricks EP, Bellinger DA, et al. Porphyromonas gingivalis bacteremia induces coronary and aortic atherosclerosis in normocholesterolemic and hypercholesterolemic pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(7):1446-1451.
90. Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. Porphyromonas gingivalis invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*. 1995;63(10):3878-3885.
91. Deshpande RG, Khan MB, Genco CA. Invasion of aortic and heart endothelial cells by Porphyromonas gingivalis. *Infect Immun*. 1998;66(11):5337-5343.
92. Duncan L, Yoshioka M, Chandad F, Grenier D. Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles. *Microb Pathog*. 2004;36(6):319-325.
93. Madianos PN, Papapanou PN, Sandros J. Porphyromonas gingivalis infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. *Infect Immun*. 1997;65(10):3983-3990.
94. Chandki R, Banthia P, Banthia R. Biofilms: A microbial home. *J Indian Soc Periodontol*. 2011;15(2):111-114.
95. Vincents B, Guentsch A, Kostolowska D, et al. Cleavage of IgG1 and IgG3 by gingipain K from Porphyromonas gingivalis may compromise host defense in progressive periodontitis. *FASEB J*. 2011;25(10):3741-3750.

96. Fischer CL, Walters KS, Drake DR, et al. Oral mucosal lipids are antibacterial against *Porphyromonas gingivalis*, induce ultrastructural damage, and alter bacterial lipid and protein compositions. *Int J Oral Sci.* 2013;5(3):130-140.
97. van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol.* 2002;29(11):1023-1028.
98. Periodontology AAo. Comprehensive periodontal therapy: a statement by the American Academy of Periodontology *. *J Periodontol.* 2011;82(7):943-949.
99. Hamada S, Fujiwara T, Morishima S, et al. Molecular and immunological characterization of the fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Immunol.* 1994;38(12):921-930.
100. Takada H, Mihara J, Morisaki I, Hamada S. Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. *Infect Immun.* 1991;59(1):295-301.
101. Zhang B, Khalaf H, Sirsjö A, Bengtsson T. Gingipains from the Periodontal Pathogen *Porphyromonas gingivalis* Play a Significant Role in Regulation of Angiopoietin 1 and Angiopoietin 2 in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Infect Immun.* 2015;83(11):4256-4265.
102. Hayashi C, Viereck J, Hua N, et al. *Porphyromonas gingivalis* accelerates inflammatory atherosclerosis in the innominate artery of ApoE deficient mice. *Atherosclerosis.* 2011;215(1):52-59.
103. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994;5:78-111.
104. Shah HN, Collins DM. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int J Syst Bacteriol.* 1990;40(2):205-208.
105. Van der Weijden GA, Timmerman MF, Reijerse E, Wolffe GN, Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U. The prevalence of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *P. intermedia* in selected subjects with periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1994;21(9):583-588.
106. Takada K, Fukatsu A, Otake S, Hirasawa M. Isolation and characterization of hemolysin activated by reductant from *Prevotella intermedia*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;35(1):43-47.
107. Krupka HI, Huber R, Holt SC, Clausen T. Crystal structure of cystalysin from *Treponema denticola*: a pyridoxal 5'-phosphate-dependent protein acting as a haemolytic enzyme. *EMBO J.* 2000;19(13):3168-3178.
108. Offenbacher S, Lieff S, Jared H, et al. Maternal periodontitis impairs fetal growth. *Journal of Dental Research.* 2002;81:A320-A320.
109. Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52(Pt 3):841-849.
110. Posch G, Andrukhov O, Vinogradov E, et al. Structure and immunogenicity of the rough-type lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(6):945-953.
111. Sakakibara J, Nagano K, Murakami Y, et al. Loss of adherence ability to human gingival epithelial cells in S-layer protein-deficient mutants of *Tannerella forsythensis*. *Microbiology.* 2007;153(Pt 3):866-876.
112. Sekot G, Posch G, Oh YJ, et al. Analysis of the cell surface layer ultrastructure of the oral pathogen *Tannerella forsythia*. *Arch Microbiol.* 2012;194(6):525-539.

113. Settem RP, El-Hassan AT, Honma K, Stafford GP, Sharma A. Fusobacterium nucleatum and Tannerella forsythia induce synergistic alveolar bone loss in a mouse periodontitis model. *Infect Immun*. 2012;80(7):2436-2443.
114. Grenier D, Mayrand D. Adult periodontitis: an ecological perspective of mixed infections. *Trends Microbiol*. 1995;3(4):148.
115. Murakami Y, Higuchi N, Nakamura H, Yoshimura F, Oppenheim FG. Bacteroides forsythus hemagglutinin is inhibited by N-acetylneuraminylactose. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17(2):125-128.
116. Hasebe A, Yoshimura A, Into T, et al. Biological activities of Bacteroides forsythus lipoproteins and their possible pathological roles in periodontal disease. *Infect Immun*. 2004;72(3):1318-1325.
117. Thompson H, Homer KA, Rao S, Booth V, Hosie AH. An orthologue of Bacteroides fragilis NanH is the principal sialidase in Tannerella forsythia. *J Bacteriol*. 2009;191(11):3623-3628.
118. Tanner AC, Strzempko MN, Belsky CA, McKinley GA. API ZYM and API An-Ident reactions of fastidious oral gram-negative species. *J Clin Microbiol*. 1985;22(3):333-335.
119. Honma K, Mishima E, Sharma A. Role of Tannerella forsythia NanH sialidase in epithelial cell attachment. *Infect Immun*. 2011;79(1):393-401.
120. Kesavalu L, Sathishkumar S, Bakthavatchalu V, et al. Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. *Infect Immun*. 2007;75(4):1704-1712.
121. Bostanci N, Belibasakis GN. Porphyromonas gingivalis: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett*. 2012;333(1):1-9.
122. Bodet C, Chandad F, Grenier D. [Pathogenic potential of Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola and Tannerella forsythia, the red bacterial complex associated with periodontitis]. *Pathol Biol (Paris)*. 2007;55(3-4):154-162.
123. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect*. 2000;2(13):1599-1607.
124. Noack B, Görgens H, Hoffmann T, et al. Novel mutations in the cathepsin C gene in patients with pre-pubertal aggressive periodontitis and Papillon-Lefèvre syndrome. *J Dent Res*. 2004;83(5):368-370.
125. Armitage GC, Cullinan MP. Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010;53:12-27.
126. Feng ZM, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology 2000*. 2006;40:50-76.
127. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *Journal of Clinical Periodontology*. 2018;45:S9-S16.
128. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S74-S84.
129. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *The Journal of Periodontology*. 1965;36(3):177-187.
130. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *Journal of Periodontology*. 2018;89:S46-S73.
131. Teles FR, Teles RP, Uzel NG, et al. Early microbial succession in redeveloping dental biofilms in periodontal health and disease. *J Periodontol Res*. 2012;47(1):95-104.

132. Trombelli L, Scapoli C, Orlandini E, Tosi M, Bottega S, Tatakis DN. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. III. Response of "high responders" and "low responders" to therapy. *J Clin Periodontol*. 2004;31(4):253-259.
133. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S17-S27.
134. Tatakis DN, Kumar PS. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. *Dent Clin North Am*. 2005;49(3):491-516, v.
135. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S46-S73.
136. N NJ, I M. *Parodontologija-praktikum*. Belgrade2018.
137. Sorsa T, Hernández M, Leppilähti J, Munjal S, Netuschil L, Mäntylä P. Detection of gingival crevicular fluid MMP-8 levels with different laboratory and chair-side methods. *Oral Dis*. 2010;16(1):39-45.
138. Kowashi Y, Jaccard F, Cimasoni G. Sulcular polymorphonuclear leucocytes and gingival exudate during experimental gingivitis in man. *J Periodontol Res*. 1980;15(2):151-158.
139. Schroeder HE, Lindhe J. Conditions and pathological features of rapidly destructive, experimental periodontitis in dogs. *J Periodontol*. 1980;51(1):6-19.
140. Sheets SM, Potempa J, Travis J, Casiano CA, Fletcher HM. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* W83 induce cell adhesion molecule cleavage and apoptosis in endothelial cells. *Infect Immun*. 2005;73(3):1543-1552.
141. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*. 1997;14:216-248.
142. Page RC. The etiology and pathogenesis of periodontitis. *Compend Contin Educ Dent*. 2002;23(5 Suppl):11-14.
143. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2004;35:21-41.
144. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol 2000*. 2006;40:29-49.
145. Perdiguero E, Ruiz-Bonilla V, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Genetic deficiency of p38alpha reveals its critical role in myoblast cell cycle exit: the p38alpha-JNK connection. *Cell Cycle*. 2007;6(11):1298-1303.
146. Hans M, Hans VM. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *J Oral Sci*. 2011;53(3):263-271.
147. Lindhe J, Socransky SS. Chemotaxis and vascular permeability produced by human periodontopathic bacteria. *J Periodontol Res*. 1979;14(2):138-146.
148. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontol 2000*. 2013;63(1):149-164.
149. Van Lint P, Wielockx B, Puimège L, Noël A, López-Otin C, Libert C. Resistance of collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8)-deficient mice to TNF-induced lethal hepatitis. *J Immunol*. 2005;175(11):7642-7649.
150. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2006;40:144-163.
151. Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(4):399-414.

152. Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontol 2000*. 2002;30:70-78.
153. Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P. [Innate immunity: structure and function of TLRs]. *Med Sci (Paris)*. 2007;23(1):67-73.
154. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004;5(10):987-995.
155. Hatakeyama J, Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S, Takada H. Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/Toll-like receptor system. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(1):14-23.
156. Nicu EA, Loos BG. Polymorphonuclear neutrophils in periodontitis and their possible modulation as a therapeutic approach. *Periodontol 2000*. 2016;71(1):140-163.
157. Matthews JB, Wright HJ, Roberts A, Cooper PR, Chapple IL. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(2):255-264.
158. Bhatavadekar NB, Williams RC. Modulation of the host inflammatory response in periodontal disease management: exciting new directions. *Int Dent J*. 2009;59(5):305-308.
159. Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Júnior WM, Rossi MA, Silva JS. Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol*. 2008;84(1):311-318.
160. Hernández M, Dutzan N, García-Sesnich J, et al. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *J Dent Res*. 2011;90(10):1164-1170.
161. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, FA C. *Carranza's clinical periodontology*. . Philadelphia: Elsevier health sciences; 2011.
162. Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*. 1997;14:173-201.
163. Gupta N, Gupta ND, Gupta A, Khan S, Bansal N. Role of salivary matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in chronic periodontitis diagnosis. *Frontiers of Medicine*. 2015;9(1):72-76.
164. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res*. 2015;2015:615486.
165. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol*. 2000;12(1):13-19.
166. Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*. 2006;85(7):596-607.
167. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*. 2006;169(3):987-998.
168. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol 2000*. 2010;52(1):163-206.
169. MacDonald KP, Rowe V, Bofinger HM, et al. The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion. *J Immunol*. 2005;175(3):1399-1405.
170. Lally ET, Hill RB, Kieba IR, Korostoff J. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol*. 1999;7(9):356-361.
171. Algate K, Haynes DR, Bartold PM, Crotti TN, Cantley MD. The effects of tumour necrosis factor- α on bone cells involved in periodontal alveolar bone loss; osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. *J Periodontal Res*. 2016;51(5):549-566.

172. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*. 2003;31:32-42.
173. Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol*. 2008;79(8 Suppl):1560-1568.
174. Armitage GC. Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2004;34:109-119.
175. D'Ercole S, Catamo G, Piccolomini R. Diagnosis in periodontology: a further aid through microbiological tests. *Crit Rev Microbiol*. 2008;34(1):33-41.
176. Zhang X, Kohli M, Zhou Q, Graves DT, Amar S. Short- and long-term effects of IL-1 and TNF antagonists on periodontal wound healing. *J Immunol*. 2004;173(5):3514-3523.
177. Garlet GP, Martins W, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004;31(8):671-679.
178. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003;74(3):391-401.
179. Birkedal-Hansen H. Role of Matrix Metalloproteinases in Human Periodontal Diseases. *J Periodontol*. 1993;64 Suppl 5S:474-484.
180. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*. 1993;64(5 Suppl):474-484.
181. Butler GS, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of signaling molecules to regulate inflammation. *Periodontol 2000*. 2013;63(1):123-148.
182. Sorsa T, Gursoy UK, Nwhator S, et al. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2016;70(1):142-163.
183. Shintani T, Kusuhara Y, Daizumoto K, et al. The Involvement of Hepatocyte Growth Factor-MET-Matrix Metalloproteinase 1 Signaling in Bladder Cancer Invasiveness and Proliferation. Effect of the MET Inhibitor, Cabozantinib (XL184), on Bladder Cancer Cells. *Urology*. 2017;101:169.e167-169.e113.
184. Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mäntylä P, Rönkä H, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2000;27(5):366-369.
185. Nakashima K, Roehrich N, Cimasoni G. Osteocalcin, prostaglandin E2 and alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid: their relations to periodontal status. *J Clin Periodontol*. 1994;21(5):327-333.
186. Chapple IL, Matthews JB, Thorpe GH, Glenwright HD, Smith JM, Saxby MS. A new ultrasensitive chemiluminescent assay for the site-specific quantification of alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid. *J Periodontol Res*. 1993;28(4):266-273.
187. Kurgan S, Kantarci A. Molecular basis for immunohistochemical and inflammatory changes during progression of gingivitis to periodontitis. *Periodontol 2000*. 2018;76(1):51-67.
188. Chen FM, An Y, Zhang R, Zhang M. New insights into and novel applications of release technology for periodontal reconstructive therapies. *J Control Release*. 2011;149(2):92-110.
189. Brunsvold MA, Mellonig JT. Bone grafts and periodontal regeneration. *Periodontol 2000*. 1993;1:80-91.
190. Nemcovsky CE, Weinreb M. Soft and Hard Tissue Regeneration-A Special Issue of Dentistry Journal. *Dent J (Basel)*. 2018;6(1).

191. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Djordjevic M, Kenney EB. The use of bovine porous bone mineral in combination with enamel matrix proteins or with an autologous fibrinogen/fibronectin system in the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *J Periodontol*. 2001;72(9):1157-1163.
192. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Kenney EB, Vasilic N. Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. *J Periodontol*. 2001;72(5):583-589.
193. Camargo PM, Lekovic V, Carnio J, Kenney EB. Alveolar bone preservation following tooth extraction: a perspective of clinical trials utilizing osseous grafting and guided bone regeneration. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2004;16(1):9-18, v.
194. Lamond AI. Molecular biology of the cell, 4th edition. *Nature*. 2002;417(6887):383-383.
195. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol*. 1991;62(11):710-716.
196. Knighton DR, Ciresi K, Fiegel VD, Schumerth S, Butler E, Cerra F. Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obstet*. 1990;170(1):56-60.
197. Ono I, Gunji H, Zhang JZ, Maruyama K, Kaneko F. A study of cytokines in burn blister fluid related to wound healing. *Burns*. 1995;21(5):352-355.
198. Hollinger JO, Hart CE, Hirsch SN, Lynch S, Friedlaender GE. Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90 Suppl 1:48-54.
199. Itoh N, Ohta H, Konishi M. Endocrine FGFs: Evolution, Physiology, Pathophysiology, and Pharmacotherapy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:154.
200. Hutley L, Shurety W, Newell F, et al. Fibroblast growth factor 1: a key regulator of human adipogenesis. *Diabetes*. 2004;53(12):3097-3106.
201. Kawaguchi H, Oka H, Jingushi S, et al. A local application of recombinant human fibroblast growth factor 2 for tibial shaft fractures: A randomized, placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res*. 2010;25(12):2735-2743.
202. Kitamura M, Nakashima K, Kowashi Y, et al. Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase II clinical trial. *PLoS One*. 2008;3(7):e2611.
203. Hock JM, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology*. 1988;122(1):254-260.
204. Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol*. 1999;70(1):13-29.
205. Yin X, Li P, Li Y, Cai Y, Wen J, Luan Q. Growth/differentiation factor-5 promotes. *Exp Ther Med*. 2017;14(5):4111-4117.
206. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med*. 2008;2(2-3):81-96.
207. Dohan Ehrenfest DM, Wang HL, Bernard JP, Sammartino G. New Biomaterials and Regenerative Medicine Strategies in Periodontology, Oral Surgery, Esthetic and Implant Dentistry. *Biomed Res Int*. 2015;2015:210792.
208. Sanz-Sánchez I, Ortiz-Vigón A, Sanz-Martín I, Figuero E, Sanz M. Effectiveness of Lateral Bone Augmentation on the Alveolar Crest Dimension: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res*. 2015;94(9 Suppl):128S-142S.

209. Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res.* 2014;93(4):335-345.
210. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg.* 1986;204(3):322-330.
211. Panda S, Doraiswamy J, Malaiappan S, Varghese SS, Del Fabbro M. Additive effect of autologous platelet concentrates in treatment of intrabony defects: a systematic review and meta-analysis. *J Investig Clin Dent.* 2016;7(1):13-26.
212. Canonico S. The use of human fibrin glue in the surgical operations. *Acta Biomed.* 2003;74 Suppl 2:21-25.
213. Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, et al. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1231-1256.
214. Agrawal AA. Evolution, current status and advances in application of platelet concentrate in periodontics and implantology. *World J Clin Cases.* 2017;5(5):159-171.
215. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4(1):3-9.
216. Kingsley CS. Blood coagulation; evidence of an antagonist to factor VI in platelet-rich human plasma. *Nature.* 1954;173(4407):723-724.
217. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997;55(11):1294-1299.
218. Hiramatsu T, Okamura T, Imai Y, et al. Effects of autologous platelet concentrate reinfusion after open heart surgery in patients with congenital heart disease. *Ann Thorac Surg.* 2002;73(4):1282-1285.
219. Green DM, Klink B. Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. *Plast Reconstr Surg.* 1998;101(4):1161-1162.
220. Panda S, Jayakumar ND, Sankari M, Varghese SS, Kumar DS. Platelet rich fibrin and xenograft in treatment of intrabony defect. *Contemp Clin Dent.* 2014;5(4):550-554.
221. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):299-303.
222. Sharma A, Pradeep AR. Autologous platelet-rich fibrin in the treatment of mandibular degree II furcation defects: a randomized clinical trial. *J Periodontol.* 2011;82(10):1396-1403.
223. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig.* 2016;20(9):2353-2360.
224. Aleksić Z, Janković S, Dimitrijević B, Divnić-Resnik T, Milinković I, Leković V. [The use of platelet-rich fibrin membrane in gingival recession treatment]. *Srp Arh Celok Lek.* 2010;138(1-2):11-18.
225. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e56-60.

226. Jankovic S, Aleksic Z, Klokkevold P, et al. Use of platelet-rich fibrin membrane following treatment of gingival recession: a randomized clinical trial. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2012;32(2):e41-50.
227. Aleksić Z, Janković S, Dimitrijević B, Pucar A, Lazić V, Leković V. [Clinical impact of platelet rich plasma in treatment of gingival recessions]. *Srp Arh Celok Lek*. 2008;136(3-4):95-103.
228. Cieslik-Bielecka A, Choukroun J, Odin G, Dohan Ehrenfest DM. L-PRP/L-PRF in esthetic plastic surgery, regenerative medicine of the skin and chronic wounds. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1266-1277.
229. Novaes AB, Palioto DB, de Andrade PF, Marchesan JT. Regeneration of class II furcation defects: determinants of increased success. *Braz Dent J*. 2005;16(2):87-97.
230. Natto ZS, Green MS. A Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin Showed a Regenerative Potential in Intrabony Defects and Furcation Defects but Not in Periodontal Plastic Surgery. *J Evid Based Dent Pract*. 2017;17(4):408-410.
231. Choukroun J. Advanced PRF & i-PRF: platelet concentrates or blood concentrates? *J Periodont Med Clin Pract*. 2014;1.
232. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Jimbo R, et al. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1145-1152.
233. Del Corso M, DM DE. Immediate implantation and peri-implant Natural Bone Regeneration (NBR) in the severely resorbed posterior mandible using Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF): a 4-year follow-up. *POSEIDO*. 2013;1(2):109-116.
234. Varela HA, Souza JCM, Nascimento RM, et al. Injectable platelet rich fibrin: cell content, morphological, and protein characterization. *Clin Oral Investig*. 2019;23(3):1309-1318.
235. Peerbooms JC, van Laar W, Faber F, Schuller HM, van der Hoeven H, Gosens T. Use of platelet rich plasma to treat plantar fasciitis: design of a multi centre randomized controlled trial. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010;11:69.
236. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *J Periodontol*. 2017;88(1):112-121.
237. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig*. 2017;21(8):2619-2627.
238. Wang X, Zhang Y, Choukroun J, Ghanaati S, Miron RJ. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. *Platelets*. 2018;29(1):48-55.
239. Dohan Ehrenfest DM, Diss A, Odin G, Doglioli P, Hippolyte MP, Charrier JB. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(3):341-352.
240. Marenzi G, Riccitiello F, Tia M, di Lauro A, Sammartino G. Influence of Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) in the Healing of Simple Postextraction Sockets: A Split-Mouth Study. *Biomed Res Int*. 2015;2015:369273.
241. Kucukcoskun M, Baser U, Oztekin G, Kiyan E, Yalcin F. Initial periodontal treatment for prevention of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *J Periodontol*. 2013;84(7):863-870.

242. Chambrone L, Chambrone D, Lima LA, Chambrone LA. Predictors of tooth loss during long-term periodontal maintenance: a systematic review of observational studies. *J Clin Periodontol*. 2010;37(7):675-684.
243. Salamanna F, Veronesi F, Maglio M, Della Bella E, Sartori M, Fini M. New and emerging strategies in platelet-rich plasma application in musculoskeletal regenerative procedures: general overview on still open questions and outlook. *Biomed Res Int*. 2015;2015:846045.
244. Mühlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta*. 1971;15(2):107-113.
245. SILNESS J, LOE H. PERIODONTAL DISEASE IN PREGNANCY. II. CORRELATION BETWEEN ORAL HYGIENE AND PERIODONTAL CONDITON. *Acta Odontol Scand*. 1964;22:121-135.
246. Baelum V, López R. Periodontal disease epidemiology - learned and unlearned? *Periodontol 2000*. 2013;62(1):37-58.
247. Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M, et al. A genome-wide association study identifies GLT6D1 as a susceptibility locus for periodontitis. *Hum Mol Genet*. 2010;19(3):553-562.
248. Cobb CM, Williams KB, Gerkovitch MM. Is the prevalence of periodontitis in the USA in decline? *Periodontol 2000*. 2009;50:13-24.
249. Heitz-Mayfield LJ. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:196-209.
250. Kim HD, Sim SJ, Moon JY, Hong YC, Han DH. Association between periodontitis and hemorrhagic stroke among Koreans: a case-control study. *J Periodontol*. 2010;81(5):658-665.
251. Georgiou TO, Marshall RI, Bartold PM. Prevalence of systemic diseases in Brisbane general and periodontal practice patients. *Aust Dent J*. 2004;49(4):177-184.
252. Lamster, IB, Cheng, B, Z L, B S. A composite score to assess the burden of periodontal diseases and tooth loss. *Journal of Periodontology*. 2019;90(10):1125-1132.
253. Trombelli L, Franceschetti G, Farina R. Effect of professional mechanical plaque removal performed on a long-term, routine basis in the secondary prevention of periodontitis: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2015;42 Suppl 16:S221-236.
254. Seymour GJ, Gemmell E, Reinhardt RA, Eastcott J, Taubman MA. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodontal Res*. 1993;28(6 Pt 2):478-486.
255. Quirynen M, Teughels W, De Soete M, van Steenberghe D. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontology 2000*. 2002;28:72-90.
256. Ren C, McGrath C, Jin L, Zhang C, Yang Y. The effectiveness of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a meta-analysis. *J Periodontal Res*. 2017;52(1):8-20.
257. Arweiler NB, Pietruska M, Pietruski J, et al. Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. *Clin Oral Investig*. 2014;18(9):2129-2135.
258. Donos N, Dereka X, Calciolari E. The use of bioactive factors to enhance bone regeneration: A narrative review. *J Clin Periodontol*. 2019;46 Suppl 21:124-161.
259. Ding L, Tang S, Liang P, Wang C, Zhou PF, Zheng L. Bone Regeneration of Canine Peri-implant Defects Using Cell Sheets of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Fibrin Membranes. *J Oral Maxillofac Surg*. 2019;77(3):499-514.

260. Tsai HC, Chang GR, Fan HC, et al. A mini-pig model for evaluating the efficacy of autologous platelet patches on induced acute full thickness wound healing. *BMC Vet Res.* 2019;15(1):191.
261. Biradar SM, Satyanarayan A, Kulkarni AJ, Patti B, Mysore SK, Patil A. Clinical evaluation of the effect of platelet rich plasma on the coronally advanced flap root coverage procedure. *Dent Res J (Isfahan).* 2015;12(5):469-475.
262. Nikolidakis D, van den Dolder J, Wolke JG, Jansen JA. Effect of platelet-rich plasma on the early bone formation around Ca-P-coated and non-coated oral implants in cortical bone. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(2):207-213.
263. Roselló-Camps À, Monje A, Lin GH, et al. Platelet-rich plasma for periodontal regeneration in the treatment of intrabony defects: a meta-analysis on prospective clinical trials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015;120(5):562-574.
264. Cavallo C, Roffi A, Grigolo B, et al. Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. *Biomed Res Int.* 2016;2016:6591717.
265. Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Investig.* 2017;21(6):1913-1927.
266. Choukroun J, Ghanaati S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2018;44(1):87-95.
267. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Hernandez M, Choukroun J. Platelet-Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2017;23(1):83-99.
268. Wend S, Kubesch A, Orlowska A, et al. Reduction of the relative centrifugal force influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. *J Mater Sci Mater Med.* 2017;28(12):188.
269. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol.* 2014;40(6):679-689.
270. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2017.
271. Dohle E, El Bagdadi K, Sader R, Choukroun J, James Kirkpatrick C, Ghanaati S. Platelet-rich fibrin-based matrices to improve angiogenesis in an in vitro co-culture model for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(3):598-610.
272. Kawase T, Kamiya M, Kobayashi M, et al. The heat-compression technique for the conversion of platelet-rich fibrin preparation to a barrier membrane with a reduced rate of biodegradation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015;103(4):825-831.
273. Kim TH, Kim SH, Sándor GK, Kim YD. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Arch Oral Biol.* 2014;59(5):550-558.
274. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e51-55.
275. Kubesch A, Barbeck M, Al-Maawi S, et al. A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet-rich fibrin: an experimental study in vivo. *Platelets.* 2019;30(3):329-340.

276. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2011;105 Suppl 1:S13-33.
277. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008;453(7193):314-321.
278. Toffler M, Toscano N, Holtzclaw D, Corso M, Ehrenfest DM.
279. Forsberg S, Rollman O. Re-epithelialization from human skin explant cultures is promoted by ligand-activated HER3 receptor. *J Dermatol Sci.* 2010;59(1):7-15.
280. Hung HC, Douglass CW. Meta-analysis of the effect of scaling and root planing, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss. *J Clin Periodontol.* 2002;29(11):975-986.
281. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17038.
282. Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldán S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2002;29 Suppl 3:136-159; discussion 160-132.
283. Sedlacek MJ, Walker C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22(5):333-339.
284. Zandbergen D, Slot DE, Cobb CM, Van der Weijden FA. The clinical effect of scaling and root planing and the concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole: a systematic review. *J Periodontol.* 2013;84(3):332-351.
285. Van der Weijden GA, Timmerman MF. A systematic review on the clinical efficacy of subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002;29 Suppl 3:55-71; discussion 90-51.
286. Cieślik-Bielecka A, Reichert P, Skowroński R, Królikowska A, Bielecki T. A new aspect of. *Platelets.* 2019;30(6):728-736.
287. Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2007;43:294-315.
288. Fabbro MD, Bortolin M, Taschieri S, Ceci C, Weinstein RL. Antimicrobial properties of platelet-rich preparations. A systematic review of the current pre-clinical evidence. *Platelets.* 2016;27(4):276-285.
289. Badade PS, Mahale SA, Panjwani AA, Vaidya PD, Warang AD. Antimicrobial effect of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin. *Indian J Dent Res.* 2016;27(3):300-304.
290. Yang LC, Hu SW, Yan M, Yang JJ, Tsou SH, Lin YY. Antimicrobial activity of platelet-rich plasma and other plasma preparations against periodontal pathogens. *J Periodontol.* 2015;86(2):310-318.
291. van Hinsbergh VW, Collen A, Koolwijk P. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:426-437.
292. Pretzl B, Sälzer S, Ehmke B, et al. Administration of systemic antibiotics during non-surgical periodontal therapy-a consensus report. *Clin Oral Investig.* 2018.
293. Smiley CJ, Tracy SL, Abt E, et al.
294. Chambrone L, Armitage GC. Commentary: Statistical Significance Versus Clinical Relevance in Periodontal Research: Implications for Clinical Practice. *J Periodontol.* 2016;87(6):613-616.
295. Chang IC, Tsai CH, Chang YC. Platelet-rich fibrin modulates the expression of extracellular signal-regulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res A.* 2010;95(1):327-332.

296. Kawase T, Okuda K, Yoshie H, Burns DM. Anti-TGF-beta antibody blocks enamel matrix derivative-induced upregulation of p21WAF1/cip1 and prevents its inhibition of human oral epithelial cell proliferation. *J Periodontol Res.* 2002;37(4):255-262.
297. Chang YC, Zhao JH. Effects of platelet-rich fibrin on human periodontal ligament fibroblasts and application for periodontal infrabony defects. *Aust Dent J.* 2011;56(4):365-371.
298. Castro AB, Meschi N, Temmerman A, et al. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation and implant therapy. A systematic review. *J Clin Periodontol.* 2017;44(2):225-234.
299. Omar OM, Granéli C, Ekström K, et al. The stimulation of an osteogenic response by classical monocyte activation. *Biomaterials.* 2011;32(32):8190-8204.
300. Schmidt-Bleek K, Kwee BJ, Mooney DJ, Duda GN. Boon and Bane of Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis. *Tissue Eng Part B Rev.* 2015;21(4):354-364.
301. Soloviev DA, Hazen SL, Szpak D, et al. Dual role of the leukocyte integrin $\alpha M\beta 2$ in angiogenesis. *J Immunol.* 2014;193(9):4712-4721.
302. Vogel JP, Szalay K, Geiger F, Kramer M, Richter W, Kasten P. Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. *Platelets.* 2006;17(7):462-469.
303. Dohan Ehrenfest DM, Doglioli P, de Peppo GM, Del Corso M, Charrier JB. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch Oral Biol.* 2010;55(3):185-194.
304. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(2):212-219.
305. Ng AM, Saim AB, Tan KK, et al. Comparison of bioengineered human bone construct from four sources of osteogenic cells. *J Orthop Sci.* 2005;10(2):192-199.
306. Hughes TP, Caffesse RG. Gingival changes following scaling, root planning and oral hygiene. A biometric evaluation. *J Periodontol.* 1978;49(5):245-252.
307. Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. III. Single versus repeated instrumentation. *J Clin Periodontol.* 1984;11(2):114-124.
308. Brägger U. Radiographic parameters: biological significance and clinical use. *Periodontol 2000.* 2005;39:73-90.
309. Lindhe J, Socransky SS, Nyman S, Westfelt E. Dimensional alteration of the periodontal tissues following therapy. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1987;7(2):9-21.
310. Preshaw PM, Kupp L, Hefti AF, Mariotti A. Measurement of clinical attachment levels using a constant-force periodontal probe modified to detect the cemento-enamel junction. *J Clin Periodontol.* 1999;26(7):434-440.
311. Lang NP, Adler R, Joss A, Nyman S. Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *J Clin Periodontol.* 1990;17(10):714-721.
312. Dietrich T, Ower P, Tank M, et al. Periodontal diagnosis in the context of the 2017 classification system of periodontal diseases and conditions - implementation in clinical practice. *Br Dent J.* 2019;226(1):16-22.
313. Lang NP, Joss A, Orsanic T, Gusberti FA, Siegrist BE. Bleeding on probing. A predictor for the progression of periodontal disease? *J Clin Periodontol.* 1986;13(6):590-596.
314. Joss A, Adler R, Lang NP. Bleeding on probing. A parameter for monitoring periodontal conditions in clinical practice. *J Clin Periodontol.* 1994;21(6):402-408.
315. Armitage GC. Periodontal diseases: diagnosis. *Ann Periodontol.* 1996;1(1):37-215.

316. Anitua E, Alonso R, Girbau C, Aguirre JJ, Muruzabal F, Orive G. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF®-Endoret®) against Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis strains. *Clin Exp Dermatol*. 2012;37(6):652-657.
317. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 2009;23(4):177-189.
318. Intravia J, Allen DA, Durant TJ, et al. In vitro evaluation of the anti-bacterial effect of two preparations of platelet rich plasma compared with cefazolin and whole blood. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014;4(1):79-84.
319. Hamzeh-Cognasse H, Damien P, Chabert A, Pozzetto B, Cognasse F, Garraud O. Platelets and infections - complex interactions with bacteria. *Front Immunol*. 2015;6:82.
320. Kerrigan SW. The expanding field of platelet-bacterial interconnections. *Platelets*. 2015;26(4):293-301.
321. Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun*. 2002;70(12):6524-6533.
322. Yeaman MR, Tang YQ, Shen AJ, Bayer AS, Selsted ME. Purification and in vitro activities of rabbit platelet microbicidal proteins. *Infect Immun*. 1997;65(3):1023-1031.
323. Yeaman MR. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(6):426-437.
324. Drago L, Bortolin M, Vassena C, Romanò CL, Taschieri S, Del Fabbro M. Plasma components and platelet activation are essential for the antimicrobial properties of autologous platelet-rich plasma: an in vitro study. *PLoS One*. 2014;9(9):e107813.
325. Preeja C, Arun S.
326. Yuan T, Zhang C, Zeng B. Treatment of chronic femoral osteomyelitis with platelet-rich plasma (PRP): a case report. *Transfus Apher Sci*. 2008;38(2):167-173.
327. Burnouf T, Chou ML, Wu YW, Su CY, Lee LW. Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. *Transfusion*. 2013;53(1):138-146.
328. Edelblute CM, Donate AL, Hargrave BY, Heller LC. Human platelet gel supernatant inactivates opportunistic wound pathogens on skin. *Platelets*. 2015;26(1):13-16.
329. Kour P, Pudukalkatti PS, Vas AM, Das S, Padmanabhan S. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Platelet-rich Plasma, Platelet-rich Fibrin, and Injectable Platelet-rich Fibrin on the Standard Strains of. *Contemp Clin Dent*. 2018;9(Suppl 2):S325-S330.
330. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000*. 2006;42:47-79.
331. Tsai CC, Ho YP, Chou YS, Ho KY, Wu YM, Lin YC. Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans leukotoxin and human periodontitis - A historic review with emphasis on JP2. *Kaohsiung J Med Sci*. 2018;34(4):186-193.
332. Johansson A, Claesson R, Belibasakis G, et al. Protease inhibitors, the responsible components for the serum-dependent enhancement of Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxicity. *Eur J Oral Sci*. 2001;109(5):335-341.
333. Kadowaki T, Takii R, Yamatake K, Kawakubo T, Tsukuba T, Yamamoto K. A role for gingipains in cellular responses and bacterial survival in Porphyromonas gingivalis-infected cells. *Front Biosci*. 2007;12:4800-4809.
334. Xie WR, Deng H, Li H, Bowen TL, Strong JA, Zhang JM. Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. *Neuroscience*. 2006;142(3):809-822.

335. Perkins MN, Kelly D. Interleukin-1 beta induced-desArg⁹bradykinin-mediated thermal hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacology*. 1994;33(5):657-660.
336. Lee JW, Kwon OH, Kim TK, et al. Platelet-rich plasma: quantitative assessment of growth factor levels and comparative analysis of activated and inactivated groups. *Arch Plast Surg*. 2013;40(5):530-535.
337. Oates TW, Graves DT, Cochran DL. Clinical, radiographic and biochemical assessment of IL-1/TNF-alpha antagonist inhibition of bone loss in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002;29(2):137-143.
338. Kornman KS, Crane A, Wang HY, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1997;24(1):72-77.
339. Erdemir EO, Duran I, Haliloglu S. Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2004;31(2):99-104.
340. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol*. 2009;80(1):98-105.
341. Özgören O, Develioglu H, Güncü G, Akman A, Berker E. The adjunctive effect of tenoxicam during non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and gingival crevicular fluid levels of MMP-8 and TNF- α in patients with chronic periodontitis - randomized, double-blind clinical trial. *Adv Clin Exp Med*. 2014;23(4):559-565.
342. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis*. 2004;10(6):311-318.
343. Sorsa T, Ding Y, Salo T, et al. Effects of tetracyclines on neutrophil, gingival, and salivary collagenases. A functional and western-blot assessment with special reference to their cellular sources in periodontal diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;732:112-131.
344. Mäntylä P, Stenman M, Kinane DF, et al. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J Periodontol Res*. 2003;38(4):436-439.
345. Mäntylä P, Stenman M, Kinane D, et al. Monitoring periodontal disease status in smokers and nonsmokers using a gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8-specific chair-side test. *J Periodontol Res*. 2006;41(6):503-512.
346. Kinane DF. Metalloproteinases in the pathogenesis of periodontal diseases. *Curr Opin Dent*. 1992;2:25-32.
347. Pourtaghi N, Radvar M, Mooney J, Kinane DF. The effect of subgingival antimicrobial therapy on the levels of stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases in gingival crevicular fluid. *J Periodontol*. 1996;67(9):866-870.
348. Gonçalves FM, Jacob-Ferreira AL, Gomes VA, et al. Increased circulating levels of matrix metalloproteinase (MMP)-8, MMP-9, and pro-inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta*. 2009;403(1-2):173-177.
349. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):585-601.
350. Eren G, Gürkan A, Atmaca H, Dönmez A, Atilla G. Effect of centrifugation time on growth factor and MMP release of an experimental platelet-rich fibrin-type product. *Platelets*. 2016:1-6.
351. Kumar A, Mahendra J, Samuel S, et al. Platelet-rich fibrin/biphasic calcium phosphate impairs osteoclast differentiation and promotes apoptosis by the intrinsic mitochondrial pathway in chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2019;90(1):61-71.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Мила Вучковић

Број индекса: 13/4009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„УТИЦАЈ ИНЈЕКТАБИЛНОГ ФИБРИНА БОГАТОГ ТРОМБОЦИТИМА У ИНИЦИЈАЛНОЈ ТЕРАПИЈИ ХРОНИЧНОГ ПАРОДОНТИТИСА”

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

Потпис аутора

У Београду, 12.01.2021. год.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Мила Вучковић

Број индекса: 13/4009

Студијски програм: Докторске студије Базична и клиничка истраживања у стоматологији

Наслов рада: „УТИЦАЈ ИНЈЕКТАБИЛНОГ ФИБРИНА БОГАТОГ ТРОМБОЦИТИМА У ИНИЦИЈАЛНОЈ ТЕРАПИЈИ ХРОНИЧНОГ ПАРОДОНТИТИСА”

Ментор: Проф. др Зоран Алексић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, 12.01.2021. год.

Изјава о коришћењу

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

„УТИЦАЈ ИНЈЕКТАБИЛНОГ ФИБРИНА БОГАТОГ ТРОМБОЦИТИМА У ИНИЦИЈАЛНОЈ ТЕРАПИЈИ ХРОНИЧНОГ ПАРОДОНТИТИСА”

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 12.01.2021. год.
