



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Ivan Z. Minić

**KOMPARATIVNO ISPITIVANJE
LOKALNOG TERAPIJSKOG DEJSTVA
PROBIOTIKA, AKTIVNOG KISEONIKA I
KLINDAMICIN GELA KOD PACIJENATA SA
HRONIČNOM PARODONTOPATIJOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2022.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Ivan Z. Minić

**COMPARATIVE STUDY OF THE LOCAL
THERAPEUTIC EFFECT OF PROBIOTICS,
ACTIVE OXYGEN AND CLINDAMYCIN GEL
IN PATIENTS WITH CHRONIC
PERIODONTAL DISEASE**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2022.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:

Prof. dr Ana Pejčić, vanredni profesor Univerziteta u Nišu, Medicinski fakultet.

Naslov:

KOMPARATIVNO ISPITIVANJE LOKALNOG TERAPIJSKOG DEJSTVA PROBIOTIKA, AKTIVNOG KISEONIKA I KLINDAMICIN GELA KOD PACIJENATA SA HRONIČNOM PARODONTOPATIJOM

Rezime:

Cilj istraživanja, koje je sprovedeno kao klinička prospektivna studija, bio je da se utvrdi efikasnost bazične terapije parodontopatije, lokalne primene probiotika, aktivnog kiseonika i klindamicin gela nakon završene bazične terapije parodontalnog oboljenja kod ispitanika sa hroničnom parodontopatijom. Upoređeni su različiti pristupi lečenja hronične parodontopatije. Pored bazične (kauzalne) terapije koja je „zlatni standard“ u terapiji hronične parodontopatije, primenjivana je terapija probiotikom, aktivnim kiseonikom i klindamicin gelom.

Kod svih ispitanika obavljen je detaljan klinički pregled i uzeti su precizni anamnestički podaci. Stomatološkim pregledom utvrđena je, kod svih ispitanika, hronična forma parodontopatije koja je potvrđena i radiološkim ispitivanjem. Klinički parametri su utvrđeni pre terapije, sedmog dana i 30 dana nakon terapije. Subgingivalni uzorci su sakupljani pre bazične terapije i nakon 30 dana da bi se identifikovale sledeće bakterijske vrste: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* i *Treponema denticola*. Upoređivanje rezultata vršeno je kliničkim ispitivanjem (indeksima oralne higijene, gingivalnim i parodontalnim indeksom) i polymerase chain reaction (PCR) metodom za ispitivanje parodontopatogenih bakterija.

U studiji je učestvovalo 160 ispitanika podeljenih u 4 grupe. Prvu grupu činilo je 40 ispitanika sa hroničnom formom parodontopatije kod kojih je primenjena samo bazična terapija (kontrolna grupa).

Drugu grupu činilo je 40 ispitanika sa hroničnom formom parodontopatije kod kojih je nakon primenjene bazične terapije primenjena terapija probiotskih bakterija, *Probiotic*® (Ivančić i sinovi, Hemofarm Stada grupa, Vršac) u parodontalni džep u trajanju od 5 dana. Treću grupu činilo je 40 ispitanika sa hroničnom formom parodontopatije kod kojih je nakon sprovedene bazične terapije primenjena terapija aktivnim kiseonikom u tečnom stanju (Deverra, Farm DOO, Lebane) u parodontalni džep u trajanju od 5 dana. Četvrta grupa ispitanika, ukupno 40, sa hroničnom formom parodontopatije, primenjena je bazična terapija parodontopatije nakon čega je lokalno primenjen klindamicin gel (klindamicin hidrohlorid gel 2 %) u parodontalni džep, jednokratno.

Kliničko ispitivanje je pokazalo bolje rezultate u II, III i IV grupi u odnosu na kontrolnu prvu grupu ispitanika kod kojih je primenjena samo bazična terapija parodontopatije. Nakon terapije, utvrđeno je smanjenje prisustva sledećih bakterijskih vrsta: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* i *Treponema denticola* ($p < 0,001$). Na osnovu ovog kliničkog ispitivanja se može zaključiti da je kombinovana bazična terapija i lokalna primena probiotika i aktivnog kiseonika dala bolje rezultate u odnosu na kontrolnu grupu kod koje je bila primenjena samo bazična terapija.

Naučna oblast:

Stomatologija

Naučna
disciplina:

Parodontologija

Gljučne reči:

Hronična parodontopatija, Probiotik, Aktivni kiseonik, Klindamicin gel, PCR

UDK:

616.311.2-002:615.246+615.281 (043.3)

CERIF
klasifikacija:

B 730

Tip licence
Kreativne
zajednice:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

Prof. dr Ana Pejčić, Associate Professor, University of Niš, Medical Faculty

Title:

COMPARATIVE STUDY OF THE LOCAL THERAPEUTIC EFFECT OF PROBIOTICS, ACTIVE OXYGEN AND CLINDAMYCIN GEL IN PATIENTS WITH CHRONIC PERIODONTAL DISEASE

Abstract:

The aim of the study, which was conducted as a clinical prospective study, was to determine the effectiveness of basic periodontal therapy, local application of probiotics, active oxygen and clindamycin gel after basic periodontal disease therapy in subjects with chronic periodontitis. Different approaches to the treatment of chronic periodontitis have been compared. In addition to basic (causal) therapy, which is the "gold standard" in the treatment of chronic periodontitis, probiotic, active oxygen and clindamycin gel therapy was used.

All subjects underwent a detailed clinical examination and accurate anamnestic data were taken. The dental examination revealed a chronic form of periodontitis in all subjects, which was confirmed by radiological examination. Clinical parameters were determined before therapy, on the seventh day and 30 days after therapy. Subgingival specimens were collected before basic therapy and after 30 days to identify the following bacterial species: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* and *Treponema denticola*. The results were compared by clinical examination (oral hygiene indices, gingival and periodontal index) and polymerase chain reaction (PCR) by the method for testing periodontopathogenic bacteria.

The study involved 160 respondents divided into 4 groups. The first group consisted of 40 subjects with chronic periodontitis who received only basic therapy (control group). The second group consisted of 40 subjects with chronic periodontitis who were treated with probiotic bacteria, Probiotic® (Ivančić and sons, Hemofarm Stada group, Vršac) in the periodontal pocket for 5 days.

The third group consisted of 40 subjects with chronic periodontitis who, after basic therapy, received active oxygen therapy in liquid form (Deverra, Farm DOO, Lebane) in the periodontal pocket for 5 days. The fourth group of subjects, a total of 40, with a chronic form of periodontitis, received basic periodontal therapy, after which clindamycin gel (clindamycin hydrochloride gel 2%) was applied topically to the periodontal pocket, once.

The clinical trial showed better results in groups II, III and IV compared to the first control group of subjects in whom only basic periodontal therapy was used. After therapy, a reduction in the presence of the following bacterial species was found: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* and *Treponema denticola* ($p < 0.001$). Based on this clinical trial, it can be concluded that the combined basic therapy and local application of probiotics and active oxygen gave better results compared to the control group in which only basic therapy was used.

Scientific
Field:

Dentistry

Scientific
Discipline:

Parodontology

Key Words:

Chronic periodontopathy, Probiotic, Active oxygen, Clindamycin gel, PCR

UDC:

616.311.2-002:615.246+615.281 (043.3)

CERIF
Classification:

B 730

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

Ovom prilikom bih se zahvalio:

*Mom mentoru **prof. dr Ani Pejčić** izuzetnom nastavniku i vizionaru u nauci, na ogromnoj posvećenosti, nesebičnim savetima i predanom radu tokom izrade i pisanja teze.*

***Prof. dr Radmili Obradović** na velikoj i nesebičnoj pomoći prilikom izrade ovog rada. Svojim ličnim angažovanjem, sugestijama i iskustvom je značajno doprinela realizaciji ove teze.*

***Prof dr Tatjani Jevtović-Stoimenov** na savetima, korisnim idejama kao i na kritičkoj oceni rada. Bez njene pomoći i ličnog angažovanja jedan značajan deo teze ne bi bio uspešno urađen i analiziran.*

***Prof. dr Ani Pucar** za korisne savete u eksperimentalnom radu, kao i na ličnom angažovanju i velikoj pomoći.*

Hvala mojim prijateljima, koji su bezrezervno verovali u mene i davali mi podršku svih ovih godina.

Posebno se zahvaljujem mojoj porodici, na neizmernoj ljubavi, strpljenju, razumevanju, toleranciji i podršci!

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Definicija parodontalnog oboljenja	1
1.2. Klasifikacija parodontalnih oboljenja	2
1.3. Etiologija parodontopatije	4
1.3.1. Osnovne karakteristike dentalnog biofilma.....	5
1.3.2. Klasifikacija dentalnog biofilma.....	6
1.3.3. Razvoj dentalnog biofilma.....	8
1.3.4. Sastav dentalnog biofilma	9
1.3.5. Mikroorganizmi dentalnog biofilma	11
1.3.6. Mikrobiološki sastav u zavisnosti od stepena sazrevanja dentalnog biofilma.....	13
1.3.7. Mikrobiološki sastav u zavisnosti od lokalizacije dentalnog biofilma.....	15
1.3.8. Parodontopatogeni mikroorganizmi	17
1.4. Akcesorni etiološki faktori u etiopatogenezi parodontopatije	24
1.5. Patogeneza parodontopatije.....	25
1.6. Klinička slika hronične parodontopatije	28
1.7. Dijagnoza i terapija hronične parodontopatije	29
1.8. Probiotici.....	32
1.9. Aktivni kiseonik	38
2.0. Klindamicin gel	41
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	43
3. MATERIJAL I METODE	44
3.1. Selekcija pacijenata	44
3.2. Klinička istraživanja.....	48
3.2.1. Indeksi oralne higijene.....	48
3.2.2. Gingivalni indeksi	51
3.2.3. Parodontalni indeks	52
3.3. Uzimanje uzoraka za laboratorijske analize	54
3.3.1. Selekcija mesta uzorkovanja.....	54
3.3.2. Uzimanje uzoraka subgingivalnog dentalnog plaka	54

3.4. Statistička obrada podataka	59
3.5. Institucije u kojima je rađeno istraživanje	59
4.REZULTATI	60
4.1. Demografske karakteristike ispitanika	60
4.2.Klinički parametri	61
4.2.1.Indeksi oralne higijene.....	61
4.2.2.Gingivalni indeksi	71
4.2.3. Parodontalni indeks	81
4.3. Mikrobiološki parametri	86
5.DISKUSIJA	97
6.ZAKLJUČAK	109
LITERATURA	111

1. UVOD

1.1. Definicija parodontalnog oboljenja

Parodontalno oboljenje je kompleksno hronično oboljenje potpornog aparata zuba, praćeno inflamacijom i destrukcijom svih njegovih struktura (gingiva, cement, alveolarna kost i periodoncijum) (1). Razvoj bolesti, kao i njen tok i progresija, determinisan je odgovorom domaćina na prisustvo bakterija (2).

Neophodno je prisustvo tri faktora za uspostavljanje aktivne infekcije u parodontocijumu. To su:

1. Prisustvo mikroorganizama koji su patogeni za parodontocijum (parodontopatogeni) u dentalnom biofilmu;
2. Povoljna sredina, tj. favorizujući faktori (pušenje, loša higijena, retencionna mesta za dentalni biofilm);
3. Odgovor domaćina na prisustvo parodontopatogena (3)

Do sada je potvrđeno između 800 i 1000 bakterijskih vrsta koje kolonizuju usnu duplju a da je čak 50 bakterijskih vrsta snažno povezano sa etiologijom parodontopatije (4). Parodontopatogeni, kada su prisutni u malim količinama, poseduju sposobnost oštećenja parodontalnih struktura (5). Kao najčešće implicirani parodontopatogeni izdvajaju se sledeći mikroorganizmi: *Agreggatibacter actinomycetomcomitans* (A.a.), *Tannerella forsythensis* (T.f.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Prevotella intermedia* (P.i.), *Eikenella corrodens* (E.c.), *Fusobacterium nucleatum* (F.n.), *Peptostreptococcus micros* (P.m.), *Campylobacter rectus* (C.r.) i *spirohete* (6).

Epidemiološke studije su potvrdile da se procenat populacije sa zdravim parodontocijumom smanjuje sa povećanjem godina i da nije veći od 10% kod odraslih. Potvrđeno je da u Evropi indeks prevalencije obolelih od parodontopatije varira između 70- 95% kod odraslih (7).

Postoje različite kliničke forme parodontopatije. Najzastupljenija klinička forma parodontopatije je hronična parodontopatija. Hronična parodontopatija je najčešća destruktivna forma parodontopatije odraslih. Po ranijoj klasifikaciji poznata je kao “ parodontopatija odraslih” ili “sporo progresivna parodontopatija”. Razvija se posle gingivitisa. Karakteriše se sporim i postepenim gubitkom potpornog aparata zuba. U odnosu na stepen destrukcije parodontalnih tkiva hronična parodontopatija je klasifikovana na: blagu (1-2 mm gubitak tkiva), umerenu (3-4 mm gubitak tkiva) i uznapredovalu formu (≥ 5 mm gubitak tkiva) (8).

Dijagnoza parodontopatije se bazira na konvencionalnoj kliničkoj proceni stanja parodontalnih tkiva kao što su merenje dubine parodontalnih džepova (sondiranjem graduisanom parodontalnom sondom), merenje akumulacije dentalnog biofilma, procena krvarenja na provokaciju parodontalnom sondom i radiografskom procenom gubitka alveolarne kosti. Međutim, poslednjih 15 godina intenzivno se istražuju alternativne dijagnostičke metode, bazirane na objektivnim, kvantitativnim merenjima koja bi doprinele preciznijoj proceni stanja parodontalnih tkiva.

Tendencija ka stalnom poboljšanju kvaliteta stomatološke parodontalne terapije usko je povezana sa novim dostignućima. Cilj savremene terapije je da se pored standarnih mera koje su “zlatni standard” u lečenju parodontopatije dodaju i nove mere koje bi umnogome doprinele kvalitetnijem i bržem načinu lečenja ove bolesti (9-11).

1.2. Klasifikacija parodontalnih oboljenja

Postoje brojne klasifikacije oboljenja parodoncijuma. Klasifikacija iz 1999.godine izdata od strane Američke parodontološke akademije prihvaćena je u celom naučnom svetu.

Prema navedenoj klasifikaciji, parodontopatija je podeljena na: (12, 13)

I. Hronična parodontopatija (ranije “sporonapredujuća parodontopatija” ili parodontopatija odraslih)

1. Lokalizovana
2. Generalizovana

II. Agresivna parodontopatija (ranije “juvenilna parodontopatija”)

1. Lokalizovana
2. Generalizovana

III. Parodontopatija udružena sa sistemskim oboljenjima

IV. Ulceronekrozna parodontopatija

V. Refraktorna parodontopatija (oboljenje koje slabo reaguje na bilo kakvu terapiju)

Međutim, zbog mnogobrojnih nedostataka, nejasnih razlika u patofiziološkim mehanizmima među pojedinim kliničkim formama parodontopatije, kao i dijagnostičke nepreciznosti Evropska Federacija za parodontologiju i Američka Akademija za parodontologiju revidirale su prethodnu klasifikaciju uz implementaciju novih saznanja o epidemiologiji, etiologiji i patogenezi oboljenja parodontalnih tkiva.

Prema poslednjoj, internacionalno prihvaćenoj klasifikaciji iz 2018. godine (14) parodontopatije se dele na:

1. Parodontopatije

- a. Stadijumi (bazirani na uznapredovalosti oboljenja i kompleksnosti lečenja)
 - Step 1, inicijalni stadijum
 - Step 2, manifestni stadijum
 - Step 3, stadijum punog kliničkog izgleda sa povećanom verovatnoćom daljeg gubitka zuba
 - Step 4, terminalni stadijum, sa gubitkom ugroženih zuba

b. Obim i distribucija (lokalizovana forma, generalizovana forma, agresivna (molari-sekutići forma))

c. Stepen progresije (bazirano na brzini napredovanja oboljenja i očekivanom odgovoru na primenjenu terapiju)

- Stepen/Gradus A, spora stopa napredovanja
- Stepen/Gradus B, umerena stopa napredovanja
- Stepen/Gradus C, brza stopa napredovanja

2. Nekrozna parodontalna oboljenja

- Nekrozni gingivitis
- Nekrozna parodontopatija
- Nekrozni stomatitis

3. Parodontopatije kao manifestacija sistemskih oboljenja

1.3. Etiologija parodontopatije

Glavni etiološki faktor koji je odgovoran za nastanak i progresiju parodontopatije je dentalni biofilm odnosno mikroorganizmi koji čine njegov sastavni deo (15). Pored toga, postoje i brojni faktori koji imaju uticaj na brzinu i tok odvijanja procesa u parodontocijumu. Delovanje tih faktora je takođe vezano za dentalni biofilm, jer oni utiču na njegovo stvaranje ili pak olakšavaju delovanje štetnih agenasa dentalnog biofilma. Prema tome, oboljenja parodontocijuma su patološka stanja, po prirodi su infekcije jer su izazvane bakterijama dentalnog biofilma, a patohistološki su inflamatorna oboljenja. Svi faktori se mogu podeliti u dve grupe:

U prvu grupu spadaju svi agensi lokalne prirode, koji na nastanak parodontopatije utiču na taj način što olakšavaju i ubrzavaju akumulaciju dentalnog biofilma. Ovde spadaju:

- anatomske anomalije;
- impakcija hrane;
- loše navike;
- jatrogeni faktori;
- karijes zuba i
- lezije gingive.

U drugu grupu spadaju svi agensi opšte prirode koji na nastanak parodontopatije utiču na taj način što smanjuju opštu otpornost organizma, kao i otpornost parodontocjuma i ubrzavaju delovanje štetnih agenasa dentalnog biofilma. Zahvaljujući dejstvu tih opštih faktora promene u parodontocijumu se brže odvijaju. U ove faktore spadaju:

- oboljenje krvi;
- endokrini poremećaji;
- delovanje toksičnih supstanci;
- neki nasledni faktori
- starenje (16).

1.3.1. Osnovne karakteristike dentalnog biofilma

Dentalni biofilm je kompleksna mikrobiološka zajednica u kojoj se odvija niz metaboličkih procesa (17). Dentalni biofilm se opisuje kao organska, bakterijska, bezbojna i opalescentna meka naslaga koja se akumulira na zubima, ali i na drugim mestima u usnoj duplji. U biohemijskom smislu predstavlja asocijaciju mikroorganizama sa proteinskim matriksom i ekstraćelijskim polisaharidima.

U zdravom stanju postoji određeni balans između bakterija i domaćina. Ako se ovaj balans poremeti, dolazi do promena u sastavu bakterijskih naslaga i do oštećenja domaćina, što za posledicu ima nastanak oboljenja parodontata.

1.3.2. Klasifikacija dentalnog biofilma

Prema mestu formiranja dentalni biofilm može biti:

- Supragingivalni
- Subgingivalni

SUPRAGINGIVALNI DENTALNI BIOFILM formira se na gingivalnoj trećini površine krunice zuba. U direktnom je kontaktu sa slobodnom gingivom, odnosno marginalnom gingivom, pa se često označava kao marginalni biofilm.

Dentalni biofilm je prvih nekoliko dana od formiranja zrnaste strukture. Naslage supragingivalnog dentalnog biofilma mogu biti vrlo tanke, a nekada su vrlo ozbiljne, a mogu biti i u obliku želatinozne mase različite debljine.

Supragingivalni dentalni biofilm se može lako klinički otkriti. Ukoliko se pak nalazi u malim količinama teško se može zapaziti golim okom. Dentalni biofilm se otkriva pomoću sonde ili posle primene raznih boja za indentifikaciju. Čvrsto je pripojen za površinu zuba. Može se ukloniti sa zuba samo mehaničkim čišćenjem. Dentalni biofilm se ispiranjem usta vodom ne može ukloniti. To ga razlikuje od materije albe. Supragingivalni dentalni biofilm se stvara na svim površinama zuba, ali se najčešće zadržava u gingivalnoj trećini krunice zuba. To su površine zuba koje nisu izložene trenju hrane prilikom žvakanja. Dentalni biofilm se više stvara vestibularno nego oralno i on može nekada da prekrije čitavu površinu krunice zuba. Supragingivalni dentalni biofilm se naročito akumulira na neravninama (18).

To se događa posebno u urođenim defektima gleđi i na neispoliranim stomatološkim nadoknadama. Više dentalnog biofilma ima na mestima na kojima ne postoji samočišćenje, što je slučaj sa aproksimalnim površinama zuba.

Razvoj supragingivalnog biofilma počinje nakon stvaranja stečene, odnosno sekundarne dentalne pelikule. Sekundarna dentalna pelikula se stvara nekoliko minuta nakon pranja zuba. Po formiranju pelikule, za 6 do 15 časova dolazi do prve akumulacije pojedinačnih kolonija bakterija. Nakon tri dana formira se supragingivalni dentalni biofilm.

Sastav biofilma se menja kako biofilm sazreva. Smanjuju se Gram-pozitivne koke i bacili do 70%, inače prve bakterije koje kolonizuju dentalnu pelikulu, a pojavljuju se Gram-negativne koke i bacilli do 30% (18). Formirani supragingivalni biofilm već posle prvog dana izaziva subkliničku inflamaciju duž marginalne gingive, a gingivitis nastaje posle petog dana.

SUBGINGIVALNI DENTALNI BIOFILM: Subgingivalni dentalni biofilm se akumulira u sub-gingivalnoj regiji, apikalnije od ivice gingive. Tako se ovaj biofilm stvara u gingivalnom sulkusu, gingivalnim i parodontalnim džepovima. Subgingivalni dentalni biofilm se ne može direktno dijagnostifikovati *in situ*. Ukoliko je u tankom sloju, nije ga moguće otkriti inspekcijom u toku kliničkog pregleda. Otkrivanje subgingivalnog dentalnog biofilma se vrši pomoću stomatološke sonde, ređe i drugim instrumentima.

U subgingivalnoj regiji razlikuje se dentalni biofilm koji je čvrsto pripojen za površinu zuba i slobodni subgingivalni biofilm, koji je u kontaktu sa sulkusnim epitelom ili epitelom džepa i pripojnim epitelom (19). Pripojeni subgingivalni dentalni biofilm služi kao osnova za formiranje subgingivalnih konkremenata. Subgingivalni biofilm sadrži pretežno Gram-negativne koke i bacile, anaerobe, spirohete kao i pokretne bakterije. Razlike u sastavu subgingivalne mikrobiotike delimično zavise od lokalnih krvnih produkata, dubine džepa, redoks potencijala i pritiska kiseonika (20).

Subgingivalni dentalni biofilm je dobro proučen i konstatovano je da igra veoma značajnu ulogu u odvijanju patoloških procesa u parodonticijumu. Smatra se da je subgingivalni dentalni biofilm osnovni uzrok oboljenja parodonticijuma (21).

Brzina stvaranja dentalnog biofilma zavisi od brojnih faktora:

- kvaliteta pljuvačke,
- sastava mikroflore,
- kvaliteta ishrane,
- učestalosti obroka,
- stepena čišćenja zuba i
- položaja zuba u vilicama.

1.3.3. Razvoj dentalnog biofilma

U svom nastanku biofilm prolazi kroz nekoliko faza:

- inicijalna faza
- stvaranje dentalnog biofilma
- sazrevanje naslaga

Inicijalna faza započinje neposredno posle pranja zuba obrazovanjem tankog filma (pelikule) na površinama zuba. Smatra se da su za stvaranje odgovorni proteini iz pljuvačke. Pelikula predstavlja idealnu podlogu za naseljavanje bakterija. Razlikuje se urođena i stečena dentalna pelikula. Urođena dentalna pelikula je poznata kao primarna i nastaje prilikom formiranja zuba. Naziva se još i gleđna opna ili Nasmitova (Nasmyth) membrana. Ta opna se retko viđa kod zuba u funkciji, jer se gubi usled abrazivnog dejstva hrane (22).

Za stvaranje dentalnog biofilma mnogo je značajnija stečena dentalna pelikula. Stečena ili sekundarna pelikula stvara se tokom čitavog života. To je nevidljiva naslaga na zubima koja se obrazuje od glikoproteina i lipida pljuvačke. Mehanizam kojim se pelikula lepi za zub objašnjava se elektrostatskim, Van der Waalsovim i hidrofobičnim silama, a i strukturama kao što su ekstracelularni polimeri, adhezini i fimbrije (23).

Pelikula ima važnu ulogu u selekciji adherencije bakterija na površini zuba. Površina hidroksiapatita je negativno naelektrisana i ona privlači pozitivno naelektrisane komponente pljuvačke i gingivalne tečnosti.

Druga faza (stvaranje dentalnog biofilma) predstavlja kolonizaciju bakterija na površinama krunica zuba. Nekoliko časova nakon formiranja dentalne pelikule dolazi do adherencije bakterija. Prve bakterijske vrste koje naseljavaju dentalnu pelikulu su Gram-pozitivne bakterije, u najvećem broju to su *Streptococcaceae* i to *Streptococcus sanguinis* i *Actinomyces viscosus*. Veza između bakterija i dentalne pelikule ostvaruje se zahvaljujući dejstvu adhezina. Adhezini se nalaze na površini bakterija preko kojih se one vezuju za receptore u dentalnoj pelikuli (31).

Treća faza (sazrevanje naslaga) predstavlja mineralizaciju dentalnog biofilma. Sam process sazrevanja dentalnog biofilma traje od 48 do 96 časova od primarne faze. Formirana inicijalna plakna masa se uvećava proliferacijom već adheriranih bakterija, ili pripajanjem i porastom novih vrsta bakterija kada se menja etiologija biofilma. Nastaje prelaz aerobne u anaerobnu sredinu. U ovoj fazi dolazi do naseljavanja Gram-negativnih anaerobnih bakterija. Najznačajnije anaerobne bakterije su: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides fusiformis*), *Capnocytophaga* i dr. (24).

Strukturne razlike biofilma u razvoju su posledica uticaja lokalnih faktora okoline. Prisustvo gingivitisa povećava broj bakterija i menja brzinu formiranja biofilma. Komponente krvi i gingivalne tečnosti omogućavaju rast Gram-negativnih bakterija i povećavaju patogeni potencijal.

1.3.4. Sastav dentalnog biofilma

Dentalni biofilm se sastoji od intracelularnog matriksa i mikroorganizama. U sastav intracelularnog matriksa nalaze se organske i neorganske komponente (1, 25,26).

- **Organske materije** dentalnog biofilma potiču iz tri izvora. Najvećim delom organske materije potiču iz pljuvačke, manje iz gingivalnog eksudata, dok su u nešto većoj količini produkt mikroorganizama.

Organski deo dentalnog biofilma, pored mikroorganizama, deskvamiranih epitelnih ćelija i leukocita čini intracelularni matriks, mucin i druge materije. Intracelularni matriks se sastoji od polisaharida (dekstrana i levana), proteina, masti i nekih drugih materija. Mucin, kao i neki drugi glikoproteini pljuvačke su veoma važni sastojci dentalnog biofilma. Oni igraju značajnu ulogu i u stvaranju dentalnog biofilma. Zbog toga neki autori dentalni biofilm i nazivaju mucinozni biofilm (27).

Mucin je želatinozne koenzistencije. U kiseloj sredini nastaje njegova precipitacija. Da bi došlo do percipitacije i taloženja mucina na gleđi zuba, a time i do formiranja dentalnog biofilma, uslov je da postoji kisela sredina, a da je pri tom mucin prethodno denaturisan. Denaturisanje mucina se odvija pod dejstvom bakterijskih toksina koji svojom enzimskom aktivnošću utiču na molekulu ovog glikoproteina. Mucin tek tada dobija adhezivnu moć i precipitacijom se čvrsto pripaja za gleđ zuba. Kisela sredina koja je potrebna za precipitaciju mucina nastaje usled enzimskog razlaganja ugljenih hidrata (saharoze i dr.) u dentalnom biofilmu (28).

Deskvamirane epitelne ćelije dentalnog biofilma potiču od sluzokože usne duplje i gingivalnog epitela. Nalaze se u novoformiranom biofilmu. Kasnije, pod uticajem bakterijskih enzima, budu razgrađene pa se retko mogu naći u zreom dentalnom biofilmu. Dentalni biofilm sadrži i brojna niskomolekulama jedinjenja. Ta jedinjenja predstavljaju krajnji produkt metabolizma ugljenih hidrata i proteina. To su: mlečna, pirogroždana, sirćetna, kao i mnogobrojne aminokiseline. Dentalni biofilm sadrži i brojne imunoglobuline, A i G, zatim brojne enzime i bakterijske enzime (29).

- **Neorganske materije** koje ulaze u sastav dentalnog biofilma sastoje se iz svih onih minerala koji se normalno nalaze u krvnom serumu i pljuvački. To su: kalcijum, kalijum, fluor, natrijum, fosfor i magnezijum. Samo u tragovima se mogu naći: bakar, olovo, cink, stroncijum i litijum. Ovi minerali grade neorganske soli kao: kalcijum-fosfat, kalcijum-karbonat i magnezijum-fosfat. Ove soli se u obliku kristaliziranog hidroksiapatita talože u organsku osnovu biofilma.

Na taj način se obrazuje zubni kamenac. Neorganske materije subgingivalnog dentalnog biofilma potiču iz gingivalne tečnosti. Kalcifikacijom subgingivalnog dentalnog biofilma nastaju konkrementi, odnosno subgingivalni kamenac. Konkrementi su tamnozeleni ili tamnobraon boje, zbog prisustva komponenata subgingivalnog matriksa, gde se kao posledica krvarenja nalaze produkti krvi.

1.3.5. Mikroorganizmi dentalnog biofilma

Normalna flora usne duplje je izuzetno bogata. Nju čini oko 400 različitih vrsta, serotipova i ribotipova bakterija, a oko 10 do 20 je na različite načine dovedeno u vezu sa nastankom paradontopatije kod ljudi (30). U sastav oralne flore ulazi oko 20% aerobnih mikroorganizama. Preostalu populaciju čine fakultativno anaerobni i striktno anaerobni mikroorganizmi, a mogu se naći i sojevi Mycoplazme, gljivice, protozoe i virusi.

Mikroorganizmi oralne flore predstavljaju simbiote (uslovno patogene mikroorganizme) čovečijeg organizma. Oni su adaptirani na usnu duplju. Izvan nje, ovi mikroorganizmi ispoljavaju vrlo agresivna patogena svojstva. Između mikroorganizama normalne oralne flore i domaćina postoji ravnoteža. Ukoliko dođe do poremećaja te ravnoteže delovanjem raznih faktora ili do naseljavanja drugih bakterija koje ne pripadaju ovoj regiji, ovi mikroorganizmi mogu učestvovati u nastanku i razvoju patoloških procesa u usnoj duplji (31).

U izučavanju mikroorganizama dentalnog biofilma razmatra se kvalitativni sastav bakterijske flore, kao i njena kvantitativna zastupljenost.

Kvalitativni sastav i kvantitativna zastupljenost mikroorganizama dentalnog biofilma, kao i mikroorganizama usne duplje, su promenjivi i zavise od brojnih faktora. Kvalitativni sastav mikroorganizama usne duplje i dentalnog biofilma, kao i njihova kvantitativna zastupljenost su varijabilni i variraju od osobe do osobe. Ova varijabilnost se uočava čak i u različitim regionima usne duplje jedne iste osobe (32).

Smatra se da kvantitativni sastav i kvalitativna zastupljenost mikroorganizama u usnoj duplji, a prvenstveno u dentalnom biofilmu, zavise od brojnih faktora kao što su:

- starosno doba bolesnika,
- oralna higijena,
- svojstva pljuvačke,
- stanje parodontijuma i oralne sluzokože,
- sazrevanje dentalnog biofilma,
- primena antibiotika i nekih drugih lekova i
- količina i lokalizacija dentalnog plaka.

Starost bolesnika utiče na sastav oralne flore. Usna duplja intrauterinog ploda je sterilna. Sa rođenjem počinje naseljavanje usne duplje mikroorganizmima iz porođajnih puteva, a nakon toga i mikroorganizmima sredine u kojoj novorođenče živi. Najpre se naseljavaju aerobni mikroorganizmi. Nicanjem zuba i stvaranjem gingivalnog sulkusa i interdentalnih prostora, stvaraju se anaerobni uslovi što dovodi do naseljavanja anaerobnih mikroorganizama (33).

Oralna higijena, na sastav, kao i na zastupljenost mikroorganizama, utiče preko dentalnog biofilma. U ustima sa lošom oralnom higijenom nastaje obilna akumulacija dentalnog biofilma što u stvari dovodi i do povećanja broja mikroorganizama, jer bakterije uglavnom sačinjavaju dentalni biofilm.

Vrsta ishrane utiče na sastav i zastupljenost mikroorganizama tako što osobe u čijoj ishrani dominiraju ugljeni hidrati imaju i veći broj mikroorganizama. U ovom slučaju se povećava naročito broj bakterija sa acidogenom aktivnošću.

Pljuvačka bitno utiče na sastav oralne flore pa i na sastav i zastupljenost mikroorganizama dentalnog biofilma. To se javlja zbog toga što, zahvaljujući prisustvu katalizatora, pljuvačka ima puferski efekat. Menjanjem pH pljuvačke održava se simbioza sojeva kojima je potrebna određena sredina (34).

Stanje parodontcijuma bitno utiče na sastav dentalnog biofilma. Ispitivanjem, sa specijalnim mikroskopom sa tamnim poljem, utvrđeno je da se njegova flora bitno razlikuje u zdravih osoba i u osoba obolelih od parodontopatije. U zdravom parodontcijumu veći deo dentalnog biofilma čine koke, ostalo su bacili i filamentozni oblici.

U obolelom parodontcijumu sastav flore je drugačiji, koke čine svega 20%, dok se znatno povećava broj filamentoznih oblika. U težim oblicima parodontopatije, naročito ako su praćene komplikacijama, nalaze se fuzobakterije i *Capnocytophage*. U hroničnim oblicima parodontopatije preovladavaju *Actinomyces*.

Supragingivalni dentalni biofilm kolonizuju uglavnom mikroorganizmi usne duplje i pljuvačke. U njemu dominiraju Gram-pozitivne bakterije. Subgingivalni dentalni biofilm kolonizuju uglavnom Gram-negativni mikroorganizmi. Subgingivalna regija (gingivalni sulkus, gingivalni i parodontalni džep) predstavlja zonu sa relativno stagnirajućim tokom fluida u koji se naseljavaju mikroorganizmi koji se ne mogu odmah adherirati za površinu zuba. Zbog toga se u ovoj regiji nalazi veliki broj neadheriranih anaerobnih i pokretnih mikroorganizama. U odnosu na osobine i faktore virulencije koje poseduju, Socransky i sar. su svrstali bakterije subgingivalnog dentalnog biofilma u bakterijske komplekse (35, 36).

1.3.6. Mikrobiološki sastav u zavisnosti od stepena sazrevanja dentalnog biofilma

Danas je utvrđena nesumnjiva uloga bakterija za nastanak parodontopatija. Pri daljem izučavanju ove materije treba stalno imati u vidu utvrđenu nepobitnu činjenicu da parodontopatiju ne izaziva jedan, već grupa specifičnih mikroorganizama (37). Starost dentalnog biofilma utiče na sastav bakterijske flore tako što se ovaj odnos bitno menja od momenta stvaranja dentalnog biofilma pa do njegovog definitivnog sazrevanja. Sastav flore dentalnog biofilma nije konstantan i varira u toku evolucije dentalnog biofilma, tako da postoji razlika u mikroorganizmima u zrelom i nezrelom biofilmu.

Odmah po formiranju sekundarne zubne pelikule nastaje naseljavanje mikroorganizama. Kolonizacija mikroorganizama na dentalnoj pelikuli počinje u brazdama, jamicama i udubljenjima na površini zuba. Bakterije se ugrađuju u samu pelikulu ili se pripajaju na prominentnim mestima dentalne pelikule. Povećanjem broja bakterija nastaje i međusobno spajanje pojedinih kolonija mikroorganizama.

Većina Gram-pozitivnih mikroorganizama kao što su: *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Haemophilus*, *Neisseria* i *Veillonella* smatraju se primarnim kolonizatorima dentalne pelikule (38). U malom broju (oko 13%) mogu se naći: *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter species*, a najmanje spirohete i pokretni bacili (39).

Ova faza je poznata kao adhezijska faza ili faza pričvršćivanja gde se mikrobi lepe za površinu zuba. U ovoj fazi je smanjena metabolička aktivnost (40, 41). Nakon početnog vezivanja dolazi do izlučivanja vanćelijskog matriksa koji dovodi do spajanja bakterija, nakon čega sledi invazija sekundarnih kolonizatora. Dolazi do umnožavanja bakterija što rezultira raznolikošću bakterijskih vrsta unutar biofilma.

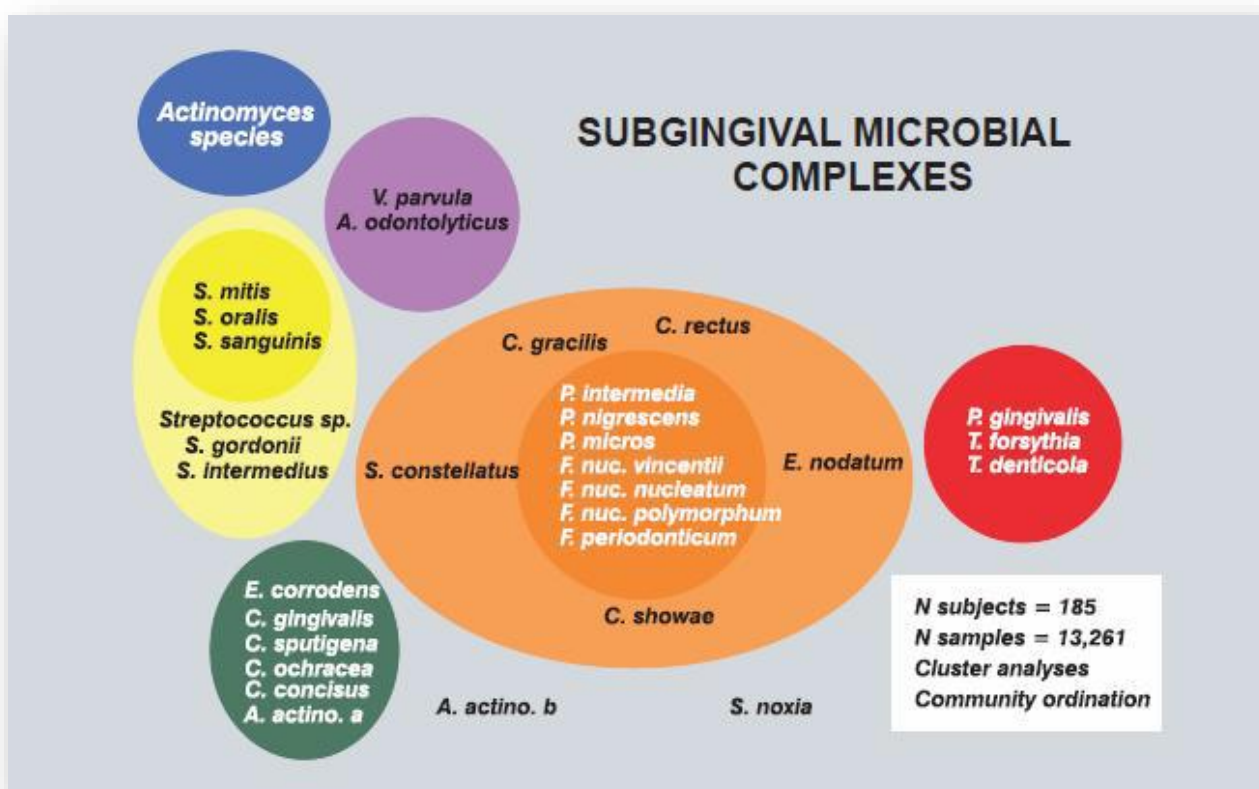
U drugoj fazi, koja traje od drugog do četvrtog dana od početka formiranja biofilma, počinju da se stvaraju anaerobni uslovi. Dolazi do pojave anaerobnih formi bacila (fuziformnih). Javljaju se i Gram-negativni bacili (*Bacteroides melaninogenicus*). Pojavljuju se filamentozne bakterije, a povećava se i broj Gram-negativnih koka. Značajan predstavnik Gram-negativnih bacila je *Prevotella intermedia* (*Bacteroides melaninogenicus*). Ime je dobio po sposobnosti da stvara crne kolonije. On produkuje veoma aktivan enzim kolagenazu i ima veoma izraženu proteolitičku aktivnost. Svojim proteolitičkim dejstvom razgrađuje belančevine, stvara veliki broj peptida koji služe za ishranu spiralnih i fuziformnih bakterija. U toku proteolitičkog procesa stvara se veći broj redukujućih grupa, kao stoje sulfhidrilna grupa (SH₂). One snižavaju oksidacioni potencijal i tako doprinose razvoju anaerobnih bakterija (42, 43).

Treću fazu, koja traje od četvrtog do devetog dana, karakteriše pojava velikog broja spiralnih oblika. Tako se javljaju *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Vibrioni* i *Veillonellae*, koji su striktni anaerobi. Posle sedmog dana nastupa potpuno sazrevanje dentalnog biofilma. Procenat filamentoznih bakterija raste, dok broj streptokoka opada (44).

1.3.7. Mikrobiološki sastav u zavisnosti od lokalizacije dentalnog biofilma

Lokalizacija dentalnog biofilma bitno utiče na bakterijski sastav. Po lokalizaciji se razlikuje supragingivalni i subgingivalni dentalni biofilm. Sastav bakterijske flore dentalnog biofilma koji se nalazi supragingivalno bitno se razlikuje od onog koji se nalazi subgingivalno.

Supragingivalni dentalni biofilm kolonizuju uglavnom mikroorganizmi usne duplje i pljuvačke. U njemu dominiraju Gram-pozitivni mikroorganizmi. Gram-negativni bacili, filamenti, spirili i spirohete su na spoljašnjoj površini i to perpendikularno gradeći takozvanu „corncob” strukturu (sličnu kukuruzu) (45).



Slika 1. Asocijacije subgingivalnih mikrobnih vrstanih u bakterijske komplekse na osnovu njihovih osobina, dinamike kolonizacije i faktora virulencije koje poseduju (46)

U subgingivalnom biofilmu dominiraju anaerobni mikroorganizmi. To se objašnjava činjenicom što je subgingivalna regija zona sa relativno stagnirajućom okolinom u kojoj se naseljavaju mikroorganizmi koji se ne mogu odmah adherirati za površinu zuba. Zbog toga se u subgingivalnoj regiji nalaze i najveće kolonije anaerobnih pokretnih bakterija. Ove pokrete forme mikroorganizama mogu da adheriraju druge bakterije (47, 48).

Ove bakterije imaju direktan pristup hranjivim sastojcima iz subgingivalne regije. Oksidoreduktivni potencijal parodontalnog džepa (odnosno subgingivalne regije) je veoma nizak. U ovakvoj sredini mogu da opstanu samo mikroorganizmi prilagođeni na nisku koncentraciju kiseonika. To su fakultativni i striktni anaerobi.

Utvrđeno je i da lokalizacija dentalnog subgingivalnog biofilma utiče na sastav flore. Tako u dentalnom subgingivalnom biofilmu koji je pripojen za koren zuba i označava se kao tzv. pripojeni subgingivalni biofilm, dominiraju Gram-pozitivne bakterije i pokretne forme mikroorganizama. U dentalnom subgingivalnom biofilmu koji se u parodontalnom džepu nalazi slobodan i nije pripojen za koren zuba i označava se kao subgingivalni dentalni biofilm, otkriveni su neki veoma agresivni anaerobni bacili, kao što su *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium Bacteroides* i drugi (49).

Virulentni faktori mikroorganizama

Da bi došlo do nastanka bolesti, patogene bakterije treba da postoje ne samo u velikom broju, već i da su virulentne. Virulentni faktori su svojstva koja omogućavaju bakterijama da izazovu bolest. Patološke promene i destrukciju parodontalnog tkiva mikrobi mogu da izazovu kolonizacijom na tkivima ili invazijom bakterija i njihovih produkata u samo tkivo. Da bi pokazali patološko dejstvo, mikroorganizmi treba da savladaju odbrambene mehanizme domaćina. Tkivna destrukcija nastaje stvaranjem bakterijskih supstanci koje direktno ili indirektno razaraju tkivo parodonticijuma.

Kolonizacija bakterija na tkivo parodonta

Kolonizacija bakterija se ostvaruje delovanjem nekoliko faktora:

1. *bakterijska adhezija*- svojim adhezinima bakterije se pripajaju za površinu krunice zuba, razna tkiva i već postojećeg biofilma. Adhezini su specifični molekuli na površini bakterija, koji se vezuju za receptore koji se nalaze u pljuvački, preko raznih površina u usnoj duplji (50).
2. *bakterijska koagregacija*.- to je sposobnost bakterija da se svojim fimbrijama pripajaju za polisaharidne receptore na površini drugih bakterija koje su već pripojene.

1.3.8. Parodontopatogeni mikroorganizmi

U etiopatogenezi parodontopatije glavnu ulogu imaju Gram-negativni anaerobni bacili. To su vrste koje pripadaju rodovima: *Aggregatibacter*, *Porphyromonas*, *Eikenella*, *Prevotella* i *Treponema* (51). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sa 5 serotipova prouzrokuje agresivnu parodontopatiju, ali i doprinosi razvoju hronične progresivne parodontopatije (52). Od velikog broja parodontopatogenih mikroorganizama sledeći mikroorganizmi pokazali su najintenzivniji patološki efekat na tkiva parodontocijuma: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) i *Treponema denticola*.

1.3.8.1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa) je Gram-negativan, fakultativno anaeroban, saharolitični, kapnofilni bacil koji je jedan od glavnih uzroka agresivne i uznapredovale hronične parodontopatije odraslih (53). Do sada je opisano 5 serotipova ovog mikroorganizma (a-e), sa više od jednim serotipom koji je pronađen u usnoj duplji (54). Prirodno stanište ovog mikroorganizma je usna duplja ali može biti izolovan i iz drugih ne oralnih infekcija kao što su endokarditis, pneumonija, kožne infekcije, osteomijalitis, infektivni artritis i druge. Potencijalni faktori virulencije ovog mikroorganizma variraju a mogu zavisiti od:

1. faktora modulacije koji utiču na mogućnost kolonizacije i stepen inflamacije,
2. faktora koji indukuju odgovor domaćina i koji za posledicu imaju destrukciju tkiva domaćina i
3. faktora koji inhibiraju obnavljanje tkiva domaćina (55, 56)

Ovaj mikroorganizam stvara mnoge virulentne faktore: leukotoksin kao najvažniji, bakteriocin, inhibišući faktor hemotakse, citotoksični faktori, Fc vezujući proteini, imunosupresivni faktori, lipopolisaharidne kolagenaze, fibroblast inhibitorni faktor, antibiotik rezistentne determinante, adhezive, invazive i faktor inhibicije funkcije polimorfonuklearnih leukocita (57).



Slika 2. Izgled kolonije *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (preuzeto sa UCL Eastman Dental Institute)

Leukotoksin je član RTX familije toksina (repeats in toxin). Ova grupa toksina, formirajući kanale na ćelijskoj membrani, dovodi do smrti ćelije osmotskom lizom (visoke doze) ili indukcijom apoptoze (58, 59). Studije *in vitro* su pokazale da niska koncentracija leukotoksina promoviše degranulaciju neutrofila, oslobađa kolagenolitičku proteinazu-matriksnu metaloproteinazu 8 (MMP 8) (60) i inhibira fagocitozu (61, 62). Visoke koncentracije toksina u *in vitro* uslovima mogu da dovedu do lize ćelije (63). Leukotoksin izaziva degranulaciju lizozoma što ima za posledicu oštećenje tkiva domaćina i pokretanje inflamatornog odgovora.

Smatra se da u etiologiji i patogenezi parodontopatije pored leukotoksina važnu ulogu igraju i drugi faktori virulencije ovog mikroorganizma. Brojne studije su se bavile izučavanjem veze i međusobnog uticaja dva vrlo potentna egzotoksina: leukotoksina i citoletalnog toksina istezanja (64, 65). Citoletalni toksin istezanja (cytoletal distending toxin - CDT) je višekomponentni bakterijski holotoksin koji pogađa većinu eukariotskih ćelija izazivajući njihovo istezanje i prekid ćelijskog ciklusa (G2 fazu) što rezultira apoptozom ćelije (66).

Endotoksin iz *A. actinomycetemcomitans* ima potencijal da menja odgovor domaćina i doprinese destrukciji tkiva. Sposobnost liposaharida *A. actinomycetemcomitans* da stimuliše makrofage za oslobađanje interleukina IL-1, IL-1 β i tumor nekroza faktora (TNF) od velike je važnosti. Ovi citokini su sposobni da, pored drugih aktivnosti, stimulišu resorpciju kostiju (67, 68).

1.3.8.2. Prevotella intermedia

Prevotella intermedia (*Bacteroides melaninogenicus* subsp. *Intermedius*), je crno pigmentisani, Gram-negativni, kratki i zaobljeni anaerobni bacil koji naseljava usnu duplju, posebno mesta gde vladaju anaerobni uslovi, subgingivalni dentalni biofilm, nekrotični endodontski prostor. Dokazano je patološko delovanje ove bakterije u patogenezi hronične parodontopatije, akutnog nekrotizirajućeg ulceroznog gingivitisa i gingivitisa u trudnoći (69).

Ova bakterija je uključena i u ekstraoralne infekcije poput nazofaringealne infekcije i intra-abdominalne infekcije (70).

Utvrđeno je da postoji heterogenost unutar sojeva ove bakterije u smislu serologije i homologije DNK. Sveobuhvatna studija hibridizacije DNK rađena 1992. godine predložila je da se *Prevotella intermedia* razvrsta u dva genotipa, *Prevotella intermedia* i *Prevotella nigrescens* (71). *Prevotella intermedia* je dokazana kao jedna od ključnih bakterija u patogenezi hronične parodontopatije, jer je dokazano njeno prisustvo u parodontalnom džepu (72-74).



Slika 3. *Prevotella intermedia*, crno pigmentisane kolonije su izolati bakterije. (75)

1.3.8.3. *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis je Gram-negativni, anaerobni, nesporogeni, asaharolitičan bacil koji poseduje fimbrije i produkuje mrki pigment porfirin, a više je svojstven hroničnim parodontopatijama (76). Ovaj mikroorganizam produkuje metabolite i strukture male molekulske mase, što im omogućava da lako prodiru kroz tkivo. Među njima su enzimi i toksični metaboliti koji dovode do značajne lokalne destrukcije tkiva, ali i imunoaktivne komponente, koje značajno remete imunološke reakcije. Kao najagresivniji mehanizmi izdvajaju se produkcija imunoglobulinskih proteaza i gingipeina, indukcija produkcije interleukina (IL-6) i matriksnih metaloproteinaza (MMP) (77).

Porphyromonas gingivalis može direktno uticati na parodontcijum ili indirektno kada aktivacijom imunog sistema domaćina dovodi do oštećenja gingive i resorpcije alveolarne kosti, što je karakteristično za hroničnu parodontopatiju (78, 79).



Slika 4. *Porphyromonas gingivalis*, crno pigmentisane kolonije su izolati bakterije. (80)

1.3.8.4. *Tannerella forsythensis*

Tannerella forsythensis (*Tannerella forsythia*, *Bacteriodes forsythus*) je nepigmentisana, Gram-negativna, vretanasta, visoko pleomorfna, štapićasta, anaerobna bakterija. *Tannerella forsythensis* je povezana sa različitim oblicima gingivitisa, hroničnim ali i agresivnim oblicima parodontopatije (81). Studije su dokazale da *Tannerella forsythensis* dovodi do progresije hronične parodontopatije dovodeći do gubitka epitelnog pripoja (82-84).

Crveni kompleks, kome pored *Tannerella forsythensis* pripadaju *Porphyromonas gingivalis* i *Treponema denticola* je u direktnoj korelaciji sa kliničkim parametrima hronične parodontopatije, naročito dubinom parodontalnog džepa i indeksom krvarenja (85, 86).

Tannerella forsythensis poseduje nekoliko načina na koje iskazuje svoju virulentnost. Najznačajniji su produkcija proteaza i lipopolisaharida. Ova bakterija može direktno uticati na parodoncijum ili indirektno kada aktivacijom imunog sistema domaćina dovodi do oštećenja gingive i resorpcije alveolarne kosti, što je karakteristično za hroničnu parodontopatiju (87).

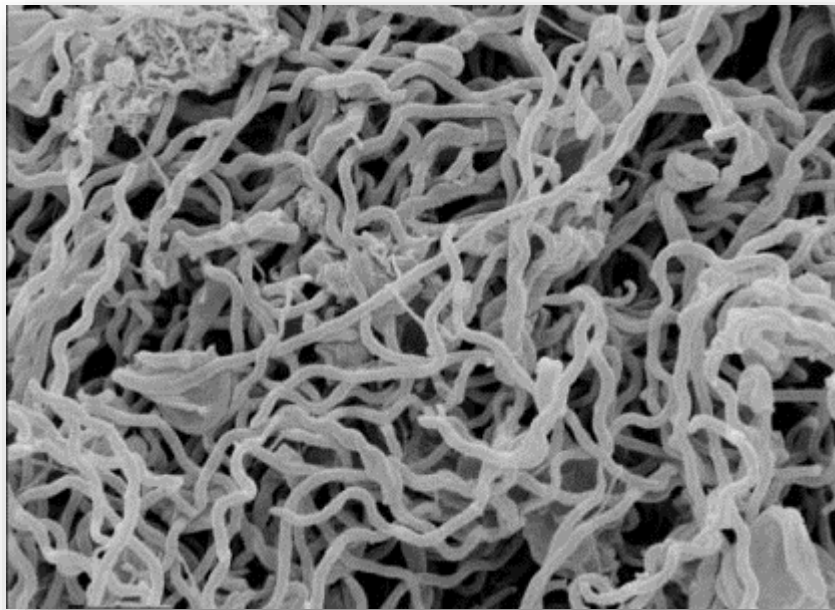


Slika 5. *Tannerella forsythensis* (88)

1.3.8.5. *Treponema denticola*

Treponema denticola je Gram-negativna, anaerobna, pokretna oralna spiroheta sa izraženom proteolitičkom aktivnošću. Virulentnost bakterije ogleda se u produkciji nespecifičnih metabolita kao što su amonijak i vodonik-sulfid koji deluju toksično na ćelijskom nivou. *Treponema denticola* je izolovana u parodontalnim džepovima hronične parodontopatije (89). Proteolitička aktivnost je dokazana produkcijom proteineaze (90).

Akumulacija ovih bakterija i njihovih produkata u parodontalni džep dovodi do lize ćelija domaćina. Dokazano je da se *Treponema denticola* lepi za fibroblaste i epitelne ćelije kao i komponente matriksa prisutne u parodontalnim tkivima i stvara nekoliko štetnih faktora koji mogu doprineti virulenciji bakterija (91, 92).



Slika 6. *Treponema denticola* (elektronska mikroskopija). (93)

1.4. Akcesorni etiološki faktori u etiopatogenezi hronične parodontopatije

Akcesorni etiološki faktori u nastanku hronične parodontopatije mogu biti lokalni i opšti. Lokalni akcesorni etiološki faktori olakšavaju i ubrzavaju formiranje, retenciju i akumulaciju dentalnog biofilma, a istovremeno otežavaju ili onemogućavaju njegovo uklanjanje u toku održavanja oralne higijene. Na taj način ovi faktori deluju indirektno.

Opšti akcesorni etiološki faktori utiču na smanjenje otpornosti parodoncijuma prema delovanju mikroorganizama dentalnog biofilma. Na taj način olakšavaju delovanje produkata dentalnog biofilma i pojavu inflamacije u parodoncijumu, utičući istovremeno i na tok bolesti.

U etiopatogenezi parodontopatija od značaja je ispoljavanje fenomena sinergizma delovanja glavnog i akcesornih etioloških faktora. Tako na parodoncijum mogu da deluju mikroorganizmi zajedno sa lokalnim i opštim akcesornim faktorima.

To udruženo delovanje mikroorganizama i nekih lokalnih faktora (npr. jatrogeni faktori i morfološka odstupanja u razvoju alveolarne kosti) i opštih faktora (imunološki poremećaji, npr. AIDS) usloviće brzi razvoj bolesti uz pojavu obimnih i teških destrukcija u parodoncijumu sa lošom prognozom (94, 95).

1.5. Patogeneza parodontopatije

Parodontopatija je jedna od najčešćih hroničnih inflamatornih bolesti. Etiologija ove bolesti je multifaktorijalna sa značajnim učešćem faktora domaćina, životne sredine i bakterija. Osim etiološkog faktora, mikroorganizama, sigurno da je neophodan i podložan domaćin. I dalje ostaje pitanje zašto neki pacijenti kod kojih su detektovani tzv. ključni patogeni mogu da kontrolišu inflamaciju, dok kod drugih dolazi do narušavanja balansa biofilm-domaćin.

U toku hronične parodontopatije dolazi do složenog imunološkog procesa koji za cilj ima ograničavanje lokalne infekcije i sprečavanje njenog širenja u opštu sistemsku infekciju, odnosno sepsu. Krajnji rezultat nelečene parodontopatije je gubitak zahvaćenih zuba, čime organizam na najdrastičniji način odvajava lokalno obolelo tkivo i sprečava prenošenje infekcije na sistemski nivo. Tokom lokalnih imunskih procesa dolazi do aktivacije složenog sistema urođenog i stečenog imuniteta, do komunikacije između ćelija imunog odgovora sa lokalnim i udaljenim tkivima putem sistema interleukina i citokina. Osim toga, oslobođeni proizvodi razgradnje imunskih ćelija, lokalnih ćelija epitela i vezivnog tkiva ili ugrađenih molekula međućelijske supstance, takođe učestvuju u aktivaciji ovih procesa (96).

Ćelijska infiltracija i ekspresija složenog niza citokina, hemokina i lipidnih medijatora su ključne karakteristike u patogenezi parodontopatije. U ranim, aktivnim, lezijama prevladavaju neutrofilni infiltrati, dok kod naprednih, hroničnih, lezija dolazi do infiltracije limfocita, dentritičnih ćelija i makrofaga (97). Tokom lokalne inflamatorne reakcije produkuju se medijatori zapaljenja. Najznačajniji su: prostaglandin E₂ (PgE₂), interleukin 1β (IL-1β), interleukin 6 (IL-6) i faktor nekroze tumora alfa (TNF-α).

Prostaglandini su metaboliti arahidonske kiseline. PgE₂ je jedan od najčešće ispitivanih medijatora aktivnosti parodontalnog oboljenja (98). PgE₂ stimuliše resorpciju alveolarne kosti i smatra se medijatorom tkivne destrukcije (99, 100). Mnogobrojni inflamatorni procesi, među kojima i hronična parodontopatija, praćeni su porastom bioloških markera, tj. citokina, koji će na mnogobrojne mehanizme uticati i dati povećanje koncentracije PgE₂.

Proinflamatorni citokini (IL-1 β , IL-6 i TNF- α) su se izdvojili kao medijatori inflamacije čiji je intenzitet produkcije pokazatelj aktivnosti destrukcije tkiva parodonta. Dokazano je da pacijenti oboleli od hronične parodontopatije imaju povišene vrednosti ovih proinflamatornih citokina u perifernoj krvi u poređenju sa ispitanicima sa zdravim parodontom (101).

Burni biohemijski procesi u toku patogeneze hronične parodontopatije i oslobađanje različitih medijatora inflamacije i enzima utiču na promene na krvnim sudovima. Najpre se manifestuju povećanom propustljivošću krvnih sudova (102, 103).

Tokom zapaljenskih i imunoloških reakcija dolazi do staze, zadebljanja zidova krvnih sudova, pa i njihove obliteracije. Sve ove promene utiču na disbalans kiseonika i redukciju oksidativnog metabolizma, koji ima za posledicu redukciju tkivnog metabolizma. Ove promene utiču na reparatorni potencijal tkiva (104). Klinički simptom hronične parodontopatije – recesija gingive se javlja kao posledica svih ovih promena, ne samo vaskularnih, već i na vezivotkivnim elementima i na krznu gingive. Ove promene izazvane su pored štetnog uticaja dentalnog plaka i pokušajem domaćina da zaštiti tkivo oslobađanjem proteolitičkih enzima i medijatora zapaljenja (105).

Fagociti imaju krucijalnu ulogu u parodontu, kako u stanju zdravlja tako i u toku oboljenja potpornog aparata zuba. Osobe sa deficijentnom funkcijom fagocita već u najranijem uzrastu oboljevaju od parodontopatije. Jasno je da destrukcija parodontalnih tkiva koja se odigrava u toku hronične parodontopatije nije posledica direktnog uticaja bakterija koje su izbegle fagocitozu i druge elemente odbrane, nego posledica inflamatornog odgovora tkiva na prisustvo bakterija (106).

Dakle, bakterije su neophodne za inicijaciju ovih procesa (107). Aktivirani fagociti (neutrofili i makrofagi) su veoma važni u procesu destrukcije parodontijuma, u smislu da su odgovorni direktno ili indirektno za povećanu produkciju tkivno-degradirajućih enzima, uključujući i matriksne-metaloproteinaze (108). Tokom hronične parodontopatije, destruirana parodontalna tkiva bivaju donekle nadomešćena dobro vaskularizovanim granulacionim tkivom koje obiluje inflamatornim ćelijama što u biološkom smislu povećava otpornost pri invaziji bakterija.

Uloga imunološkog sistema prepoznata je i u koštanom metabolizmu. S toga se danas razvila čitava grana koja proučava vezu imunološkog sistema i koštanog metabolizma, tzv. osteoimunologija (109). Sa aspekta destrukcije nekalcifikovanog vezivnog tkiva parodontijuma ključan je MMP/TIMP sistem, dok se RANK/RANKL/OPG sistem smatra glavnim za destrukciju koštanog tkiva (110). U poslednje vreme dokazan je i mehanizam koštane resorpcije nezavisan od RANK/RANKL/OPG sistema, i ovde glavnu ulogu igra TNF α (111).

Biološka aktivnost **IL-1 β** je veoma raznovrsna, pri čemu je fokus delovanja usmeren na aktivaciju proteina akutne faze, prostaglandina, drugih citokina, indukciju sinteze kolagena i kolagenaze i resorpciju alveolarne kosti (112). Takođe, imaju mogućnost i da stimulišu proliferaciju limfocita, inhibišu sintezu interferona (IFN), kao i stimulaciju produžene produkcije limfokina od strane T ćelija i imunoglobulina od strane plazma ćelija. Ove funkcije IL-1 β ukazuju na njegovu izraženu proinflamatornu aktivnost. Značajna uloga IL-1 β je i mogućnost stimulacije gingivalnih fibroblasta da produkuju značajne nivoe PgE₂ i kolagenaza (113, 114). Takođe, ustanovljen je i demineralizujući efekat na alveolarnu kost (115). Povišeni nivoi IL-1 β su utvrđeni u gingivalnoj tečnosti, vezivnom tkivu gingive i u serumu pacijenata obolelih od hronične parodontopatije (116).

Alkalni fosfati su glikoproteini odgovorni za očuvanje alveolarne kosti i celokupni periodontalni ligament. Pretpostavlja se da je njihovo poreklo u gingivalnoj tečnosti prvenstveno iz polimorfonuklearnih leukocita. Smatra se da alkalna fosfataza igra ulogu u metabolizmu kosti i formiranju kolagena.

Aktivnost alkalne fosfataze je u korelaciji sa dubinom parodontalnog džepa i procenatom gubitka kosti i nađeno je da je ova aktivnost 20 puta veća u gingivalnoj tečnosti kod inflamiranih regija nego u serumu. Slični nivoi alkalne fosfataze u gingivalnoj tečnosti otkriveni su u zdravoj i inflamiranoj gingivi, ali longitudinalne studije koje je sproveo Nakashima potvrđuju da su nivoi alkalne fosfataze veći kod inflamiranih regija (117).

Matriks metaloproteinaze (MMP) su enzimi izvedeni od ćelija domaćina, poreklom iz veoma važne porodice neutral-proteinaza, i učestvuju u regularnom ciklusu parodonticijuma kao i u destruktivnom procesu hronične parodontopatije, koji može da se meri u gingivalnoj tečnosti (118-120). Neutrofili su glavne ćelije odgovorne za oslobađanje MMP na bolesnim mestima, posebno MMP-8 (kolagenaze-2) i MMP-9 (želatinaza-B) (121). MMP-8 je u stanju da potencijalno degradira tranzitivni kolagen, dok MMP-9 degradira nekoliko ekstracelularnih matriks proteina (122). Pokazano je da se aktivnost kolagenaze povećava sa povećanjem težine zapaljenja, povećanjem dubine džepa i gubitkom alveolarne kosti. Ovi aktivni oblici neutrofilne MMP-8 i MMP-13 u gingivalnoj tečnosti potvrđeni su kao učesnici u kolagenaznoj aktivnosti (123).

1.6. Klinička slika hronične parodontopatije

Patološke promene koje se odvijaju u toku hronične parodontopatije su destruktivne prirode i vode ka postepenom i progresivnom obolevanju parodonticijuma i njegovoj anatomskoj i funkcionalnoj dezintegraciji, što rezultira postepenim rasklaćenjem, a kasnije gubitkom jednog ili više zuba.

Hronična parodontopatija se klinički manifestuje zapaljenjem gingive, povlačenjem desni (recesija), formiranje parodontalnih džepova sa odgovarajućim sadržajem i pojavom subgingivalnih konkremenata, labavljenjem i patološkom migracijom zuba, a u završnoj fazi i ispadanjem zuba (124).

Osnovni klinički znaci hronične parodontopatije su:

- a. inflamacija gingive (gingivitis),
- b. ogolićenje korenova zuba (recesija),
- c. parodontalni džepovi,
- d. supuracija iz parodontalnih džepova,
- e. subgingivalni konkrementi,
- f. klaćenje zuba i
- g. migracija zuba

Kao krajnji ishod progresije parodontalnog oboljenja dolazi do gubitka zuba zahvaćenih parodontopatijom.

Hronična parodontopatija nije praćena bolom, osim ako ne dođe do komplikacija. Osnovni, patognomonični znak hronične parodontopatije je formiranje parodontalnih džepova koji nastaju kao posledica gubitka epitelnog pripoja i alveolarne kosti, uz prisustvo inflamatorne reakcije.

1.7. Dijagnoza i terapija hronične parodontopatije

Rana dijagnoza i lečenje hronične parodontopatije su veoma važni zbog recidiva bolesti. Svrha parodontalnih dijagnostičkih procedura je da pruži korisne informacije za lekara u vezi sa vrstom bolesti, njenom lokacijom i težinom. Ova otkrića koriste se kao osnova za planiranje parodontološkog tretmana i obezbeđivanje bitnih podataka tokom parodontološkog monitoringa, kao i za praćenje faza lečenja bolesti. Tradicionalni klinički pokazatelji (sondiranje parodontalnih džepova, detekcija krvarenja pri sondiranju, klinički gubitak pripoja, indeks plaka i radiografija) koji se koriste više od 50 godina i dalje funkcionišu kao osnovni model parodontološke dijagnoze (125). Za pacijente sa dijagnostifikovanom parodontopatijom neophodno je u okviru pregleda uključiti i radiografska ispitivanja. Radiografska procena je neophodna za pružanje informacija o obimu gubitka alveolarne kosti, vrsti koštane resorpcije i evaluaciji terapije (126).

Na osnovu ispravne prognoze mogu se donekle predvideti tok, trajanje i krajnji ishod bolesti. Ona se utvrđuje pre same terapije i to za svaki zub pojedinačno.

Za utvrđivanje prognoze se uzimaju u obzir sledeći faktori:

- količina izgubljene kosti,
- ugroženost susednih zuba,
- brzina i tip destrukcije kosti,
- položaj i značaj zuba u zubnom nizu,

- opšte zdravlje i starost bolesnika,
- oblik i dužina korena zuba,
- labavljenje zuba i
- odnos dužine tela zuba u vilici i dela van nje.

Pre svega se utvrđuje da li preostali deo kosti pruža dovoljnu potporu zubu, a odluka o tome se donosi na osnovu rendgenskog snimka. Prognoza će takođe zavisiti od tipa destrukcije kosti. Horizontalni tip dovodi do ravnomerne destrukcije i tada je prognoza bolja.

Vertikalni ili kosi tip resorpcije kosti se odvija veoma brzo i ugrožava opstanak zuba u vilici, pa je u ovom slučaju prognoza loša. Brzina koštane razgradnje se menja u toku same parodontopatije i ukoliko je tok razgradnje brži i sama prognoza će biti lošija. Kod višekorenih zuba prognoza će biti bolja ukoliko su korenovi rašireni, a takođe je bolje i ako su korenovi duži. Opšte zdravstveno stanje i starost menjaju reaktivnost organizma, a samim tim i parodontcijuma, što bitno utiče na prognozu (127).

S obzirom da su osnovni uzroci pojave parodontopatije parodontopatogeni mikroorganizmi i podložni domaćin, osnova terapije infekcije dubokih parodontalnih tkiva jeste upravo uklanjanje uzročnih mikroorganizama. Plan lečenja hronične parodontopatije obuhvata niz mera koje se primenjuju u dužem vremenskom periodu.

Ukoliko su kod bolesnika prisutne i neke subjektivne tegobe, prvo se saniraju one i ekstrahiraju zubi za koje je utvrđeno da se ne mogu izlečiti. Nakon toga sledi terapija, koja se odvija u pet faza.

Prva faza se odnosi na saniranje infekcije parodontcijuma i ona obuhvata identifikaciju i uklanjanje dentalnog plaka, uklanjanje zubnog kamenca, edukaciju bolesnika (u cilju boljeg održavanja oralne higijene) i kontrolne preglede (128, 129).

Druga faza lečenja je usmerena na tzv. parodontalne džepove sa ciljem da se oni smanje ili uklone. Ova faza se preduzima tek nakon završetka bazične terapije i primenjuje se kod svih bolesnika sa težim parodontalnim razaranjima. Suština delovanja na parodontalne džepove se ogleda u uklanjanju patološki izmenjenog potpornog tkiva zuba. U okviru druge faze vrše se i hirurške intervencije, tj. hirurško uklanjanje nekih anomalija gingive koje dovode do nastanka i napredovanja hronične parodontopatije (1, 130).

Treća faza obuhvata uspostavljanje povoljnih međuzubnih odnosa i ona se ne preduzima kod svih pacijenata. U cilju korekcije traumatskog odnosa zuba primenjuje se: brušenje zuba i razne ortodontske, protetske i hirurške mere. **Četvrta faza** lečenja obolelih od hronične parodontopatije odnosi se na program mera koje imaju za cilj održavanje postignutih rezultata lečenja (1, 131).

Nakon završene terapije, sledi još jedna faza koja obuhvata:

- kontrolne preglede,
- remotivaciju bolesnika za održavanje oralne higijene,
- odstranivanje recidiva

1.8. Probiotici

Probiotici se već duži niz godina koriste u opštoj medicini za lečenje zapaljenskih bolesti creva, vaginalnih infekcija, prevenciju alergija, i infekciju disajnih puteva (132). U stomatologiji probiotici se koriste poslednjih desetak godina u lečenju karijesa (133) i halitoze (134).

Lilly i Stillwell su 1965. godine definisali termin “probiotici” kao živi mikroorganizmi koji pružaju zdravlje domaćinu ako se primene u odgovarajućoj količini (135). Danas se izraz “probiotik” razvio i definiše se kao „živi mikroorganizmi”, uglavnom ne-patogene bakterije, koje se koriste kao dodatak ishrani, koje će nakon ingestije u odgovarajućoj količini, poboljšati ravnotežu crevnih mikroba i izazvati blagotvorno dejstvo na zdravlje onih koji ih koriste (136). Smatraju se sigurnim za zdravlje ljudi (137).

Probiotici su sposobni da izvrše rekolonizaciju i obnove simbiozu između domaćina i poremećene mikrobiote (138, 139). Njihova efikasnost zavisi od sledećih kriterijuma:

1. da su bakterije žive,
2. da poseduju otpornost na želudačnu kiselinu i delovanje žuči,
3. da postoji dokazana efikasnost u kontrolisanim studijama na ljudima,
4. da postoji dokazana sposobnost adhezije za ćelije epitela,
5. da je moguća sposobnost proizvodnje antimikrobnih faktora,
6. da je dokazana sposobnost dovoljne dužine boravka u digestivnom traktu nakon *per os* unosa radi ostvarivanja efekta,
7. da ne poseduju patogenost, toksičnost i alergijski potencijal,
8. da stabilnost preparata omogućava konstantan broj živih mikroorganizama u preparatu u toku kompletnog roka trajanja (140)

Najčešće korišćene vrste probiotika pripadaju rodovima *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus* i *Bacillus* (141, 146).

Bifidobakterije su normalni stanovnici kolona ljudi i životinja. Kod novorođenčadi dolazi do kolonizacije bifidobakterijama već prvih dana nakon rođenja. Bifidobakterije su, inače, prvi put izolovane iz fecesa novorođenčadi koja su dojena. Tokom života populacija ovih bakterija je relativno stabilna, ali starenjem organizma, njihov broj opada. Populacija bifidobakterija zavisi od brojnih faktora, kao što su: ishrana, antibiotici i stres. Bifidobakterije su Gram-pozitivne anaerobne bakterije. Nepokretne su, nesporogene i katalaza negativne. Mogu biti različitog oblika, uključujući kratke, zakrivljene štapiće, štapiće u obliku buzdovana ili ipsilon oblika, nastalog račvanjem. Ime su dobile po tome što su često ipsilon ili bifidnog oblika. Sadrže između 54 mol% i 67 mol% gvanina i citozina u svojoj DNK. To su saharolitični organizmi koji produkuju sirćetnu i mlečni kiselinu bez stvaranja CO₂ (142). Oni su klasifikovani kao laktoacidofne bakterije (LAB). Do danas je izolovano 30 vrsta bifidobakterija. Kao probiotici koriste se:

- *Bifidobacterium adolescentis*,
- *Bifidobacterium bifidum*,
- *Bifidobacterium animalis*,
- *Bifidobacterium thermophilum*,
- *Bifidobacterium breve*,
- *Bifidobacterium breve* soj Yakult,
- *Bifidobacterium breve* RO70,
- *Bifidobacterium longum*,
- *Bifidobacterium longum* ROI,
- *Bifidobacterium longum* BB536,
- *Bifidobacterium longum* SBT-2928,
- *Bifidobacterium infantis* R033,
- *Bifidobacterium lactis*.

Laktobacili su normalni stanovnici humanih creva i vagine. Laktobacili su Gram-pozitivne bakterije. Ne stvaraju sporu, nepokretni su, u obliku šapića ili kokobacila. Sadržaj gvanina i citozina u DNK kreće se od 32 mol% do 51 mol% (143). Oni su ili aerotolerantni ili anerobni. Fermentuju mlečnu kiselinu. Laktobacili se svrstavaju u laktoacidofne bakterije. Do danas je identifikovano 56 vrsta roda *Lactobacillus*. Kao probiotici primenjuju se:

- *Lactobacillus acidophilus*,
- *Lactobacillus brevis*,
- *Lactobacillus bulgaricus*,
- *Lactobacillus casei*,
- *Lactobacillus cenobiosus*,
- *Lactobacillus cenobiosus*,
- *Lactobacillus curvatus*,
- *Lactobacillus fermentum*,
- *Lactobacillus GG* (*Lactobacillus rhamnosus* ili *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*)-
Lactobacillus gasseri,
- *Lactobacillus johnsonii*,
- *Lactobacillus plantarum*,
- *Lactobacillus salivarius*

Mehanizam delovanja probiotika može varirati u zavisnosti od vrste, pa čak i soja probiotskih bakterija, njihove vijabilnosti, količine i načina unosa, kao i od zdravstvenog stanja domaćina (144, 145).

Predloženo je nekoliko mehanizama delovanja probiotika. Njihovi efekti se na lokalnom nivou mogu manifestovati na sledeće načine:

1. proizvodnjom mlečne kiseline koja penetrira u bakterijsku membranu, dovodi do smanjenja pH vrednosti u bakterijskoj citoplazmi i na taj način inhibira proliferaciju *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* (146) and *Prevotella intermedia* (147);
2. produkcijom vodonik peroksida koji inhibira rast patogenih bakterija (148-150);
3. proizvodnjom biosurfaktanata koji sprečavaju adheziju bakterija;
4. proizvodnjom inhibicijskih supstanci poput bakteriocina (peptidi sintetizovani na ribozomima) koji pokazuje antimikrobnu aktivnost;
5. proizvodnjom vitamina i drugih supstanci kao što su:
 - *Lactobacillus acidophilus* koji može učestvovati u proizvodnji niacin, folne kiseline i vitamina B₆;
 - *Bifidobacterium dentium* koji povećava apsorpciju gvožđa, cinka, kalcijuma i magnezijuma;
 - *Streptococcus thermophilus* koji sintetiše polisaharide kao što je hijaluronska kiselina i učestvuje u proizvodnji ureaze.
6. antioksidativnim efekatom koji se ogleda u inhibiciji formiranja linoleinske kiseline i smanjenju sinteze azot oksida (151-154).

Probiotici poseduju fiziološka svojstva kojima mogu delovati modulacijski na imuni sistem. Njihov uticaj na imunski sistem uključuje:

1. povećanje aktivnosti makrofaga i/ili NK ćelija
2. povećanu sekreciju imunoglobulina i/ili citokina
3. poboljšanje intestinalne epitelne barijere
4. kompetitivno isključenje patogenih mikroorganizama (155).

Važna karakteristika probiotskih bakterija je sposobnost adhezije na mukožu. Adhezija za epitelne ćelije važan je korak za patogene i probiotske bakterije što omogućava potencijalnu interakciju između njih (156).

Probiotici mogu pojačati imunsku reakciju aktivacijom makrofaga, NK ćelija i otpuštanjem različitih citokina. Istraživanja na životinjskim modelima pokazala su jaku reakciju nespecifičnog imunog odgovora nakon administracije probiotskih bakterija (157). Dokazano je da nekoliko sojeva probiotskih bakterija *in vitro* indukuje oslobađanje proupalnih citokina (TNF- α , Il-6) što dovodi do stimulacije nespecifičnog imuniteta (158).

TNF- α je citokin kojeg proizvode makrofagi i T limfociti a deluje na način da aktivira makrofage i tumorske ćelije na apoptozu. Il-6 deluje na način da podstiče proliferaciju B limfocita i njihovu diferencijaciju u plazma ćelije koje proizvode antitela. Mnogi probiotski sojevi mogu uticati na nespecifične mehanizme odbrane, kao što je fagocitoza. Istraživanje je pokazalo da su *L. acidophilus* i *L. casei* dovode do imunostimulacije povećanjem kapaciteta fagocitoze. Osim toga, pokazalo se da navedene probiotske bakterije povećavaju kapacitet fagocitoze leukocita izolovanih iz krvi ljudi koji su koristili probiotike (159).

Mnogi probiotski sojevi imaju izrazitu sposobnost stimulacije produkcije sekretornog imunoglobulina A (sIgA) i B limfocita. To su glavni imunoglobulini humoralnog imuniteta na mukoznim membranama i oni održavaju imunsku homeostazu vezivanjem za antigene pri čemu ograničavaju njihov pristup epitelnim ćelijama (160).

Tokom proteklih godina, istraživanja ukazuju na korisnost probiotika po oralno zdravlje (161, 162). Probiotici utiču na proizvodnju mlečne kiseline koja ima antibakterijsko dejstvo, vodonik peroksid sa antiseptičkim dejstvom, kao i antivirusnih i antigljivičnih sredstava koja suzbijaju patogene (163, 164). Studije su pokazale da kombinacija različitih vrsta probiotskih sojeva dovodi do sinergičnog pojačavanja njihovih pojedinačnih efekata.

Nove terapije probioticima uključuju odgovor domaćina i u modulaciji parodontalne bolesti (165, 166). U dostupnoj literaturi, predloženo je nekoliko mehanizama dejstva probiotika na oralno zdravlje:

1. konkurencija patogenim bakterijama za mesta adhezije na površinama zuba,
2. modifikacija uslova oralne sredine promenom PH vrednosti i/ili oksidoredukcionog potencijala,
3. proizvodnja antimikrobnih supstanci,
4. stimulacija nespecifičnog imuniteta i modulacija humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora (167, 168)

Probiotici zauzimaju veoma važnu ulogu u prevenciji i terapiji parodontopatije (161). Imunomodulatorno dejstvo probiotskih bakterija varira u zavisnosti od toga kom soju i vrsti pripadaju kao i od same vrste preparate (živi probiotik, mrtvi ili supernatant (169, 170). Iz tog razloga, njihova terapijska indikacija bi trebalo da bude veoma pažljivo odabrana.

Studije koje su se bavile proučavanjem uticaja probiotika na parodontalna tkiva, ukazuju na značajno smanjenje gingivalnog indeksa, plak indeksa, krvarenja pri sondiranju i gingivalne inflamacije u probiotičkim grupama (171, 172). Najčešće proučavani sojevi u terapiji parodontopatije pripadaju rodu *Lactobacillus* (173). Međutim pozitivan efekat probiotskih bakterija, kao i njihova mogućnost adherencije za sluzokože daju veliku nadu da će se njihovom jednostavnom primenom postići zadovoljavajući efekat u sanaciji inflamacije oralnih tkiva (165-167). Povećanjem probiotskih bakterija u parodontalnom džepu narušava se odnos između “dobrih” i parodontopatogenih bakterija. Ovako narušen odnos doprinosi smanjenju parodontopatogenih bakterija i na taj način i lečenju same parodontopatije.

1.9. Aktivni kiseonik

Aktivni kiseonik je ozon (O_3), gas koji je, hemijski gledano, alotropska modifikacija kiseonika. Lečenje kiseonikom, oksigenoterapija, hiperoksija, hiperbarična oksigenoterapija je jedna od metoda lečenja koja se zasniva na primeni medicinskog kiseonika u ispravljanju narušene koncentracije kiseonika u alveolama pluća (hipoksemije) i hipoksije u ćelijama i tkivima (174). Na osnovu ovoga proizilazi zaključak da svaki poremećaj koji izaziva hipoksiju u organizmu predstavlja potencijalni uslov za lečenje kiseonikom (175).

Uzroci tkivne hipoksije su različiti i na osnovu njih se određuju i ciljevi terapije:

- **Hipoksemijska hipoksija**, koja nastaje usled bolesti organa za disanje, odnosno insuficijencije respiracijskog sistema, je glavna indikacija lečenje kiseonikom.
- **Cirkulacijska hipoksija**, se javlja kada je količina oksihemoglobina normalna ali krv ne dospeva do tkiva u dovoljnim količinama, zbog smanjenja minutnog volumena srca, hipotenzije, šoka i insuficijencije arterijske cirkulacije u tkivima. Primena kiseonika kod ove vrste terapije ima mali efekat i zasniva se na povećanoj rastvorljivosti kiseonika u plazmi. Zato kod ove vrste hipoksije primena hiperbaričnog kiseonikom daje dobre rezultate lečenja.
- **Ćelijska hipoksija** (citotoksična) nastaje kod trovanja toksičnim materijama, usled blokade enzima koji regulišu potrošnju kiseonika. Kod ove hipoksije započinje se sa lečenjem kiseonikom, samo kao urgentna terapija, do primene antidota.
- **Hipoksija usled povećane potrošnje kiseonika**, koja je veća od brzine dopremanja (povećan metabolizam, stres), ne zahteva lečenje kiseonikom i u ovim stanjima ono se ne primenjuje.
- **Hipoksija usled poremećenog transporta kiseonika** (bolesti sa poremećenom funkcijom hemoglobina) praćena je sniženim vrednostima kiseonika u eritrocitima. Lečenje kiseonikom se u ovim poremećajima primenjuje kao palijativna terapija, kod teške anemije i trovanja ugljen-monoksidom. I kod ove hipoksije lečenje hiperbaričnim kiseonikom daje bolje rezultate (176).

Kiseonik je neophodan za aerobni metabolizam i njegova osnovna uloga je da smanji povoljne uslove za razvoj patogenih bakterija koje žive u anaerobnim uslovima (177). Dokazana dejstva tečnog kiseonika su: antimikrobna, analgetska, imunostimulirajuća, antihipoksična i detoksikaciona (178). Prednosti primene tečnog kiseonika u medicini su: dezinfekciona moć, antiinflamatorna aktivnost, aktivacija unutarćelijskog metabolizma, poboljšanje regionalne cirkulacije, stimulacija regenerativnih procesa, hemostaza kod kapilarnih krvarenja i dr. (179).

Povećanje količine kiseonika ubrzava proces zarastanja u mekim i tvrdim tkivima. (180-182). Kod infekcija izazvanih anaerobnim bakterijama povećanje količine kiseonika može stvoriti okruženje koje nije pogodno za replikaciju anaerobnih bakterija (183, 184). Pored toga, kiseonik ima i vazokonstriktorno dejstvo, dovodi do smanjenja edema, antiinflamatorno i antireaktivno dejstvo, olakšava kapilarno-vaskularnu proliferaciju i revaskularizaciju ishemijskih područja (185). Prednost primenjenog kiseonika na tkiva manifestuje se i podsticanjem proizvodnje kolagena, podstiče se replikaciju fibroblasta, stimuliše funkciju belih krvnih zrnaca (186).

Predominantni mikroorganizmi odgovorni za nastanak parodontalnog oboljenja su Gram-negativne anaerobne bakterije (1). Navedene bakterije, koje su glavni izazivači parodontopatije, razvijaju se u anaerobnim uslovima.

Hipoteza o upotrebi kiseonika u lečenju hronične parodontopatije zasniva se na činjenici da je koncentracija kiseonika u dubljim parodontalnim đepovima niska što podstiče bržu kolonizaciju parodontopatogenih bakterija koje dovode do progresije bolesti. (187-189). Površinski napon kiseonika (pO_2) u zdravom tkivu iznosi od 30-40 mmHg, ali kod ishemijskih izazvanih infekcijama, edema i trauma površinski napon kiseonika se spusti ispod 30 mmHg što izaziva narušavanje funkcije fibroblasta i leukocita (190).

Eksperimentalne studije su pokazale da terapija kiseonikom može imati blagotvorno dejstvo kod pacijenata obolelih od hronične parodontopatije uglavnom kroz dvostruki mehanizam delovanja: inhibiranje rasta anaerobnih bakterija u parodontalnim đepovima (191, 192) i povećanja protoka krvi čime se podstiče zarastanje tkiva (193). Pored toga kiseonik stimuliše funkciju belih krvnih zrnaca što dovodi do aktiviranja odbrambenih mehanizama domaćina.

Neosporna dezinfekciona moć tečnog kiseonika u odnosu na druge antiseptike čini upotrebu kiseonika u lečenju hronične parodontopatije veoma dobrom alternativom i/ili dodatnim dezinfekcijom standardnim antisepticima. Dokazano je da je tečni kiseonik efikasan za suzbijanje Gram-pozitivnih i Gram-negativnih oralnih mikroorganizama uključujući i gljivicu *Candida albicans* kao i bakterije u oralnom biofilmu (194, 195).

2.0. Klindamicin gel

Klindamicin je antibiotik širokog spektra dejstva, koji spada u grupu linkozamida i u medicini je u upotrebi više od 30 godina. Efikasan je u lečenju infekcija koje uključuju širok spektar fakultativnih bakterija, patogena koji proizvode beta-laktamazu i strogo anaerobnih bakterija uključujući: *Porphyromonasspecies*, *Prevotellaspecies*, *Tanerella forshythensis*, *Veillonella species* i *Fusobacterium species*. Zbog svog antibakterijskog efekta, klindamicin se smatra veoma efikasnim lekom u terapiji hronične parodontopatije (196).

Sistematska administracija klindamicina zahteva prilično visoke koncentracije usled kojih se on distribuira i akumulira u različitim delovima organizma (197). Najveći problem ovakve administracije je pojava neželjenih efekata. Najteži neželjeni efekt klindamicina je pseudomembranozni kolitis koji predstavlja poremećaj u digestivnom traktu koji može biti potencijalno letalan. Njegova pojava je posledica razvoja bakterije *Clostridium defficile* rezistentne na klindamicin koja nastaje usled dugotrajne oralne upotrebe visokih koncentracija ovog antibiotika (198).

Klindamicin ima prvenstveno bakteriostatski efekat. U većim koncentracijama može imati baktericidno dejstvo. Klindamicin deluje direktno vezivanjem za 50s ribozomalne subjedinice bakterija. Ovaj segment ometa sintezu proteina interferirajući sa reakcijom transpeptidacije što kao rezultat ima inhibiciju lanca izduženja. Ovo je direktni efekat klindamicina u inhibiciji bakterijske proliferacije (204).

Pored toga, klindamicin je jedini antibiotik koji smanjuje adheziju bakterija za epitelne ćelije na površini sluzokože tako što inhibira ekspresiju faktora virulencije (199). Takođe, klindamicin potiskuje oslobađanje proinflamatornih citokina kao što su TNF- α i IL-1 β (198). Smanjenje koncentracije proinflamatornih citokina dovodi do smanjenja inflamatorne reakcije a samim tim i regresiju hronične parodontopatije (200). Pored navedenih funkcija, klindamicin deluje tako što povećava kapacitet polimorfonuklearnih neutrofila (PMN), važnih ćelija u borbi protiv bakterijske infekcije (201). Eliminacija invazivnih patogena pomoću PMN ćelija u parodontalnom tkivu se postiže kroz povećanu fagocitozu i proizvodnju reaktivnog kiseonika (202).

Uprkos gore navedenim biološkim i farmakološkim osobinama klindamicina, njegovu primenu treba razmotriti u kontekstu mogućih neželjenih efekata. Generalno, klindamicin se smatra bezbednim lekom za većinu ljudi osim za trudnice i doilje (203).

Glavni cilj lokalne, kontrolisane dostave klindamicina je u prevazilaženju teškoća koje su vezane za ovaj antibiotik koji je inače izuzetno efikasan protiv glavnih izazivača infekcijskih bolesti koštanog tkiva. To se može postići najpre lokalizovanošću, koja isključuje i biodistribuciju leka u celom organizmu kao i potrebu za primenom visokih koncentracija.

Klindamicin se na tržištu nalazi u obliku kapsula (sadrže klindamicin hidrohlorid), oralnih suspenzija (sadrže klindamicin palmitat hidrohlorid), gela i losiona (205, 206).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni ciljevi ovog istraživanja su:

- analiza parodontopatije (prevalenca, raširenost i težina kliničke slike).
- analiza stanja parodontcijuma indeksima oralne higijene, gingivalnim i parodontalnim indeksima, pre i posle terapije parodontopatije kod svih ispitanika.
- utvrđivanje efikasnosti bazične terapije parodontopatije kod ispitanika.
- utvrđivanje efikasnosti lokalne primene probiotskih bakterija u parodontalni džep nakon završene bazične terapije parodontopatije kod ispitanika.
- utvrđivanje efikasnosti lokalne primene aktivnog medicinskog kiseonika u parodontalni džep nakon završene bazične terapije parodontopatije kod ispitanika.
- utvrđivanje efikasnosti lokalne primene klindamicin gela u parodontalni džep nakon završene bazične terapije parodontopatije kod ispitanika.
- molekularno-genetička analiza sadržaja parodontalnih džepova metodom PCR (eng. Polymerase Chain Reaction), pre i posle bazične terapije parodontopatije, lokalne primene probiotskih bakterija, aktivnog medicinskog kiseonika i klindamicin gela.
- komparativna analiza kojom bi se utvrdilo koji je od primenjenih načina terapije parodontopatije (bazična terapija, bazična terapija u kombinaciji sa probiotskim bakterijama, bazična terapija u kombinaciji sa aktivnim medicinskim kiseonikom ili bazična terapija u kombinaciji sa klindamicin gelom) ima veći uticaj na smanjenje prisustva parodontopatogenih bakterija.

3. MATERIJAL I METODE

U ovom istraživanju je bilo uključeno 160 ispitanika, oba pola, podeljenih u četiri grupe:

I grupa: 40 ispitanika sa hroničnom parodontopatijom kod kojih je primenjena bazična terapija (kontrolna grupa);

II grupa: 40 ispitanika sa hroničnom parodontopatijom kod kojih je primenjena bazična terapija i lokalna primena probiotika u parodontalne džepove;

III grupa: 40 ispitanika sa hroničnom parodontopatijom kod kojih je primenjena bazična terapija i lokalno primenjen aktivni kiseonik u parodontalne džepove;

IV grupa: 40 ispitanika sa hroničnom parodontopatijom kod kojih je primenjena bazična terapija i lokalno primenjen klindamicin gel u parodontalne džepove;

3.1. *Selekcija pacijenata*

Po prijemu svim ispitanicima je uzeta detaljna opšta anamneza. Da bi bili uključeni u istraživanje, pacijenti oboleli od parodontopatije morali su da zadovolje sledeće kriterijume:

1. da su uzrasta između 35-55 godina,
2. da su sistemski zdravi, bez hroničnih bolesti,
3. da nisu u periodu laktacije i trudnoće,
4. prisustvo parodontalnih džepova dubine 5 i više milimetara,
5. da imaju više od 20 zuba (ne računajući treće molare), bez fiksnih protetskih radova
6. da tri meseca unazad od momenta uzorkovanja nisu imali antibiotsku terapiju,

7. da dve nedelje unazad od trenutka uzimanja uzoraka nisu uzimali nesteroidne antiinflamatorne lekove,
8. da šest meseci unazad od momenta uzorkovanja nisu imali nikakav parodontološki tretman i
9. da tri meseca unazad od momenta uzorkovanja nisu koristili probiotike.

Isključujući kriterijumi bili su:

1. ispitanici sa nekim sistemskim oboljenjima,
2. prisustvo manje od 20 zuba,
3. pušači,
4. ispitanici koji su imali neki parodontalni zahvat unazad 6 meseci,
5. ispitanici koji su unazad 3 meseca primili antibiotsku terapiju,
6. ispitanici koji su unazad 3 meseca koristili probiotike,
7. ispitanici koji su unazad 2 nedelje koristili nesteroidne antiinflamatorne lekove,
8. trudnice i dojilje i
9. ispitanici alergični na klindamicin i antibiotike iz iste grupe.

Prilikom prve posete, na osnovu anamneze i kliničkog pregleda, selektovani su ispitanici za uključanje u studiju.

Dijagnoza hronične generalizovane parodontopatije je postavljena na osnovu poznatih kriterijuma:

- >30 % mesta svih prisutnih zuba je zahvaćeno oboljenjem,
- dubina parodontalnih džepova > 5 mm,
- prisutno krvarenje na provokaciju na više od 10 % regija (207).

Dijagnoza parodontopatije potvrđena je i primenom indeksa oralne higijene, gingivalnih indeksa i parodontalnog indeksa.

Svim ispitanicima je nakon uzete anamneze urađen klinički pregled kao i procena stanja oralne higijene (plak indeks, indeks zubnog kamenca, indeks subgingivalnih zubnih konkremenata), procena stanja zdravlja gingive (gingivalni indeks, indeks krvarenja gingive) i procena stanja parodontijuma (PDI po Ramfjordu). Dijagnoza parodontopatije je potvrđena i rendgenskim snimkom kod svih pacijenata.

Nakon što su bili ispunjeni svi kriterijumi na osnovu kojih je smatrano da je pacijent indikovao za ispitivanje, pristupilo se detaljnom usmenom i pismenom objašnjenju detalja, ciljeva i svrhe istraživanja i uloge ispitanika u njemu. Pisani dokument sa objašnjenjem i pristankom za istraživanje kao i anketu o osnovnim podacima ispitanika i osnovnim pitanjima o poznavanju parodontopatije ispitanici i istraživač su potpisali svojeručno.

Kontrolnu grupu (**grupa I**) činili su ispitanici koji su bili podvrgnuti jednoseansnoj mehaničkoj obradi parodontalnih džepova. Obuhvatala je identifikaciju i uklanjanje dentalnog plaka uz pomoć paste za uklanjanje plaka (Vantal- Galenika) i rotirajuće četkice. Čvrste naslage (zubni kamenac i konkrementi) su uklonjeni ultrazvučnim aparatom (Woodpecker UDS-J) i srpastim instrumentom. Nakon toga izvršena je obrada parodontalnih džepova parodontalnim kiretama a džepovi su ispirani 3% vodonik peroksidom. Nakon izvršene bazične terapije urađena je motivacija i obuka ispitanika o pravilnoj oralnoj higijeni, kao i eliminacija mogućih faktora rizika.

Kod **II grupe** ispitanika nakon izvršene bazične terapije aplikovane su probiotske bakterije u parodontalne džepove. Smeša probiotskih bakterija dobijena je rastvaranjem jedne kapsule Probiotic® (Ivančić i sinovi, Hemofarm Stada Grupa, Vršac) sa 1 ml fiziološkog rastvora. Probiotik koji je korišćen u studiji sadržao je 6,5 biliona živih *Lactobacillus acidophilus* bakterija, koncentracije 10^7 CFU, najmanje 10^7 *Bifidobacterium infantis* i najmanje 10^6 CFU *Enterococcus faecium* po kapsuli. Kod svakog pacijenta ukupno je 3 zuba, koji su ispunjavali kriterijume dizajna studije, bilo odabrano, 2 u gornjoj vilici u bočnom sektoru i jedan u donjoj vilici u bočnom sektoru. Svi klinički parametri su evidentirani sa dve strane zuba (mezijalne i mezio-bukalne).

Terapijska primena probiotika sprovodila se u trajanju od pet dana, kontinuirano. Jedna kapsula probiotskih bakterija, rastvorena u 1 ml fiziološkog rastvora, bila je dovoljna za 3 parodontalna džepa. Smesa probiotskih bakterija i fiziološkog rastvora unošena je parodontalnom kiretom u parodontalne džepove.

Kod **III grupe** ispitanika nakon postavljene dijagnoze, utvrđenih kliničkih parametara i bazične terapije, aplikovan je lokalno medicinski čist kiseonik (aktivni kiseonik) u tečnom stanju (Deverra, Deverra Farm DOO, Lebane, Srbija) u količini od 2 ml putem šprica i igle u parodontalni džep. U istraživanju se koristio 0,05 % rastvor koji je namenjen za unutrašnju upotrebu. Terapijska primena aktivnog kiseonika sprovodila se u trajanju od pet dana, kontinuirano. Jedan doza aktivnog kiseonika u količini od 2 ml bila je dovoljna za 3 parodontalna džepa.

Kod **IV grupe** ispitanika nakon izvršene bazične terapije parodontopatije aplikovan je klindamicin gel putem aplikatora za jednokratnu upotrebu u parodontalni džep. U istraživanju se koristio 2% klindamicin hidrohlorid gel. Gel je pripremljen na sledeći način: klindamicin hidrohlorid se rasturja sa propilenglikolom i uz postepeno mešanje dodaje se gel karbomera da bi se dobio preparat homogenog izgleda. 100 grama gela sadrži 2,26 grama klindamicin hidrohlorida. Nakon izvršene izrade gel se pakuje u aluminijumske tube, čuva se dobro zatvoren, zaštićen od svetlosti, na temperaturi do 25 stepeni. Klindamicin gel je aplikovan samo jednom u parodontalni džep, zbog produženog dejstva klindamicina. Klindamicin gel je aplikovan u sve parodontalne džepove koji su po dizajnu studije bili indikovani.

Kod svih grupa ispitanika, pre same bazične terapije, a u II, III i IV grupi i 7-og i 30-og dana nakon lokalne primene medicinskih sredstava određeni su indeksi oralne higijene (Pli, Izk, Ikon), gingivalni (Gi, Ikrv) i parodontalni (PDI) indeks. Kod svih grupa ispitanika uzeti su uzorci za molekularno-genetičko ispitivanje papirnatim poenima pre same bazične terapije parodontopatije i 30 dana nakon terapijske primene probiotskih bakterija, aktivnog kiseonika i klindamicin gela kao i u kontrolnoj grupi.

3.2. Klinička istraživanja

Svim ispitanicima pre početka terapije, 7-og i 30-og dana nakon terapije određeni su indeksi oralne higijene, gingivalni indeksi i parodontalni indeks.

3.2.1. Indeksi oralne higijene

Plak indeks- PlI

Plak indeks po Silness Loe (208) bodovan je od 0 do 3 pri čemu je 0 bodova potpuno odsustvo plaka u gingivalnom delu krunice zuba; 1 bod je tanak sloj dentalnog plaka koji je lociran u predelu ivice gingive i na okolnoj gingivalnoj trećini krunice zuba; 2 boda označava umerenu količinu plaka koja se i vizuelno može detektovati, plak se nalazi na ivici gingive i na površini zuba a može se otkriti i u gingivalnom sulkusu; 3 boda označava veliku količinu dentalnog plaka koja pokriva ivicu gingive i okolnu površinu zuba ali je njime u potpunosti ispunjen i gingivalni sulkus, odnosno gingivalni ili parodontalni džep.

Tabela 1. Vrednosti i kriterijumi plak indeksa

vrednost plak indeksa po Loe-Silness-u	Kriterijumi
0	nema naslaga
1	naslage prekrivaju do 1/3 površine zuba
2	naslage prekrivaju do 2/3 površine zuba
3	naslage prekrivaju preko 2/3 površine zuba

Prosečan indeks plaka dobija se kada se vrednosti indeksa za pojedine zube saberu, a potom podele brojem pregledanih zuba. Dentalni plak je određivan nakon primene 1% rastvora gencijane violet radi lakše vizuelizacije. Plak indeks, u ovoj studiji, određivan je na zubima koji su bili selektovani za istraživanje.

Indeks zubnog kamenca- Izk

Indeks zubnog kamenca označava količinu zubnog kamenca lociranu na kliničkom delu krunice. Bodovanje se vrši tako što se zub pregleda sa sve četiri strane (vestibalarno, oralno, mezijalno i distalno). Prosečan indeks dobija se kada se vrednosti indeksa za pojedine zube saberu, a potom podele brojem pregledanih zuba (208). Bodovanje je vršeno na zubima koji su bili selektovani za istraživanje.

Indeks zubnog kamenca bodovan je od 0 do 3. Nula bodova označava odsustvo zubnog kamenca; 1 bod označava prisustvo zubnog kamenca koji ne prekriva više od 1/3 visine krunice zuba; 2 boda označava da zubni kamenac prekriva više od 1/3 a manje od 2/3 visine krunice zuba; 3 boda označava da je više od 2/3 visine krunice zuba prekriveno zubnim kamencem.

Tabela 2. Vrednosti i kriterijumi indeksa zubnog kamenca

vrednost plak indeksa po Green-Vermilion-u	Kriterijumi
0	nema naslaga
1	naslage prekrivaju do 1/3 površine zuba
2	naslage prekrivaju do 2/3 površine zuba
3	naslage prekrivaju preko 2/3 površine zuba

Indeks subgingivalnih zubnih konkremenata- Ikon

Ovaj indeks označava količinu subgingivalnih konkremenata. Bodovanje se vrši na istoimeni način kao i za indeks zubnog kamenca bodovanjem od 0 do 3. Nula bodova označava odsustvo konkremenata; 1 bod označava da su konkrementi prisutni ali ne prekrivaju više od 1/3 obima korena zuba; 2 boda označava da konkrementi prekrivaju više od 1/3 a manje od 2/3 obima zuba; 3 boda označava da je više od 2/3 obima korena zuba prekriveno konkrementima (208).

Tabela 3. Vrednost i kriterijumi indeksa konkremenata

vrednost plak indeksa po Green-Vermilion-u	Kriterijumi
0	nema naslaga
1	naslage prekrivaju do 1/3 obima korena zuba
2	naslage prekrivaju do 2/3 obima korena zuba
3	naslage prekrivaju preko 2/3 obima korena zuba

Bodovanje se vrši tako što se zub pregleda sa sve četiri strane (vestibularno, oralno, mezijalno i distalno). Prosečan indeks se dobija kada se vrednosti indeksa za pojedine zube saberu, a potom podele brojem pregledanih zuba. Bodovanje je vršeno na zubima koji su bili selektovani za istraživanje.

3.2.2. Gingivalni indeksi

Gingivalni indeks- Gi

Gingivalni indeks po Silness Løe (208) služi za određivanje stepena inflamacije gingive. Merenje vrednosti gingivalnog indeksa vršeno je inspekcijom zuba i upotrebom graduisane parodontalne sonde.

Tabela 4. Vrednost i kriterijumi gingivalnog indeksa

vrednosti gingivalnog indeksa po Løe-Silnessu	kriterijumi
0	normalna gingiva
1	blaga inflamacija-blage promene u boji i blagi edem; nema krvarenja pri sondiranju ili krvari 20sec posle sondiranja
2	umerena inflamacija-crvenilo, edem i napetost gingive, krvarenje pri sondiranju
3	jaka inflamacija-jako crvenilo, moguće ulceracije; tendencija ka spontanom krvarenju

Ukupan gingivalni indeks dobija se kada se saberu sve vrednosti stanja gingive sa vestibularne, mezijalne, oralne i distalne strane za sve zube, a potom dobijeni zbir podeli sa četiri. Dobijena vrednost se potom podeli sa brojem prisutnih zuba. Ispitanici, od kojih se gingivalni indeks kreće od 0,1 do 1,0 imaju blagu inflamaciju gingive, a oni sa indeksom od 1,1 do 2,0 umerenu inflamaciju. Ako srednja vrednost gingivalnog indeksa iznosi od 2,1 do 3,0 inflamacija gingive se procenjuje kao teška, odnosno jako izražena. Gingivalni indeks je određivan na zubima koji su bili selektovani za istraživanje.

Indeks krvarenja- Ikr

Indeks krvarenja predstavlja prisustvo krvarenja na provokaciju, nakon sondiranja (208). Ovaj indeks se uzima tako što se parodontalni džepovi sondiraju i beleži prisustvo ili odsustvo krvarenja po povlačenju sonde. Merenje se vrši na četiri strane (oralno, vestibularno, mezijalno i distalno) oko svakog zuba. Ukupan indeks krvarenja se dobija ako se saberu sve vrednosti prisutnog krvarenja gingive sa sve četiri strane za sve zube, a potom se dobijeni zbir podeli sa četiri. Dobijena vrednost se potom podeli sa brojem prisutnih zuba. U ovom istraživanju indeks krvarenja je utvrđen na zubima koji su bili selektovani za terapijsku proceduru.

Tabela 5. Vrednost i kriterijumi indeksa krvarenja

vrednost indeksa krvarenja po Cowellu	kriterijumi
0	nema krvarenja
1	krvarenje 20-30sec nakon sondiranja
2	krvarenje u toku sondiranja
3	tendencija ka spontanom krvarenju

3.2.3. Parodontalni indeks

Parodontalni indeks po Ramfjordu – (Periodontal Disease Index – PDI)

Da bi se odredilo stanje parodonticijuma ali i izolovano stanje gingive koristi se indeks po Ramfjordu. Stanje se određuje na 6 reprezentativnih zuba. To su: gornji desni prvi molar (16), gornji levi prvi inciziv (21), gornji levi prvi premolar (24), donji levi prvi molar (36), donji desni prvi inciziv (41) i donji desni prvi premolar (44).

Ovim indeksom se utvrđuje rastojanje od gleđno-cementne granice do dna parodontalnog džepa (NPE- nivo pripojnog epitela). Ova merenja vršena su graduisanom parodontalnom sondom tako što je sonda blagom silom uvedena vertikalno u parodontalni džep. PDI indeks je određivan samo na reprezentativnim zubima koji su bili obuhvaćeni terapijom.

Vrednosti i kriterijumi parodontalnog indeksa po Ramfjordu prikazani su u tabeli 6.

Tabela 6. Vrednosti i kriterijumi Parodontalnog indeksa po Ramfjordu – PDI

Za utvrđivanje stanja gingive

- | | |
|----------|---|
| 0 | Odsustvo znakova inflamacije gingive |
| 1 | Blaga ili umerena inflamacija koja ne zahvata gingivu oko cele krunice zuba |
| 2 | Blaga ili umerena inflamacija koja zahvata gingivu oko cele krunice zuba |
| 3 | Jaka inflamacija: intenzivna hiperemija i izražen edem gingive (mogu postojati ulceracije i spontano krvarenje) |

Za utvrđivanje stanja parodoncijuma

- | | |
|----------|--|
| 4 | Rastojanje od gleđno-cementne granice do dna parodontalnog džepa (NPE) ne prelazi 3 mm |
| 5 | Kada je to rastojanje 3,1 mm - 6mm |
| 6 | Kada je to rastojanje veće od 6,1 mm |

3.3. Uzimanje uzoraka za laboratorijske analize

3.3.1. Selekcija mesta uzorkovanja

Na osnovu anamneze, kliničkog pregleda i analize digitalnog ortopantomograma definisana su mesta uzorkovanja. Uzorci subgingivalnog dentalnog plaka su uzimani u najdubljem paradontalnom džepu na reprezentativnim zubima koji su odabrani po modelu studije (#30 Spident, Korea) (209).

3.3.2. Uzimanje uzoraka subgingivalnog dentalnog biofilma

Mesta uzorkovanja su izolovana vaterolnoma da bi se izbegla kontaminacija uzoraka pljuvačkom. Reprezentativna mesta su bila mesta sa najvećom dubinom sondiranja kod obolelih od parodontopatije u koja su aplikovana po 3 papirna poena do dna selektovanog paradontalnog džepa. Nakon 20 sekundi papirni poeni su odlagani u sterilne ependorfice (Ismaning, Germany) uz dodavanje 100 µl sterilne destilovane vode i čuvani na -70° C do PCR analize. Izolacija bakterijske DNK vršena je tretiranjem uzoraka proteinazom K (*Thermo Fisher scientific, Waltham, MA*) na temperaturi od 56° tokom 30 minuta, nakon čega je izvršena inaktivacija enzima zagrevanjem uzoraka na temperaturi od 94° C tokom 20 minuta. Tako pripremljen materijal je čuvan na -20° C do PCR procedure. Uzorkovanje uzoraka vršeno je pre same bazične terapije u svim ispitivanim grupama i 30 dana nakon sprovedenih terapijskih procedura.

Papirni poeni kontaminirani pljuvačkom i krvlju su isključivani iz studije. Nakon odmrzavanja uzorci su centrifugirani na $3000 \times g$ 15 min kako bi se supernatant koristio za dalje analize.

Na uzorku izolovane DNK iz subgingivalnog dentalnog biofilma ispitivano je prisustvo parodontopatogenih mikroorganizama: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* i *Treponema denticola*. Za izvođenje tehnike PCR korišćene su poznate sekvence prajmera. (Tabela 7). Multipleks PCR tehnika, koja omogućava simultanu amplifikaciju različitih genskih sekvenci uz korišćenje odgovarajućih prajmera. Amplifikacija je obavljena u aparatu Termocycler (Eppendorf US) za PCR.

Tabela 7. Bakterije, prajmeri, broj baznih parova i sekvence prajmera

Bakterija	Prajmer	Broj baznih parova	Sekvence prajmera
<i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i>	AAF AAV	500	5'„-GCTAATACCGCGTAGAGTCGG-3" 5'“-ATTCACACCTCACTTAAAGGT-3"
<i>Prevotella Intermedia</i>	PrevoF PrevoR	259	5'“-CGTGGACCAAAGATTCATCGGTGGA-3" 5'“-CCGCTTTACTCCCCAACAAA-3"
<i>Porphyromonas Gingivalis</i>	PGF PGR	392	5'“-CTG TGT GTT TAT GGC AAA CTT C -3" 5'“-AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A-3"
<i>Tannerella Forsythensis</i>	TanF TanR	600	5'“-GCGTATGTAACCTGCCCGCA-3" 5'“-TGCTTCAGTGTTCAGTTATACCT-3"
<i>Treponema Denticola</i>	TDF TDR	316	5'“-TAATACCGAATGTGCTCATTACAT-3" 5'“-TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTCTTA-3"

Ključna komponenta u PCR procesu jeste DNK polimeraza izolovana iz bakterije *Thermus aquaticus*, koja je rezistentna na visoke temperature (živi i replicira se pri temperaturama do 95°C). Ta termostabilna polimeraza nazvana je Taq polimeraza (po bakteriji domaćinu) i koristi se za replikaciju in vitro čime se omogućava geometrijski porast broja kopija ciljane DNK.



Slika 7. Aparat za merenje koncentracije DNK (BiospecNano, Schimadzu Japan), DNK kabinet (Captair, US)

Za PCR reakciju potrebne su sledeće komponente:

1. izolovana DNK čiji određeni fragment želimo da amplifikujemo,
2. prajmeri (oligonukleotidne sekvence), pri čemu se u PCR reakciji neophodan par prajmera (nishodni i ushodni) koji se dizajniraju tako da budu komplementarni sekvencama koji okružuju ciljani region DNK (npr. gen) koji se želi umnožiti.
3. Taq polimeraza, termostabilna polimeraza (nazvana po bakteriji domaćinu), koristi se za replikaciju *in vitro* čime se omogućava geometrijski porast broja kopija ciljane DNK, f
4. slobodni nukleotidi, odnosno gradivne jedinice za sintezu novih lanaca DNK, u vidu mešavine dezoksiribonukleotid trifosfata (dNTP): adeninskih (dATP), timinskih (dTTP), guaninskih (dGTP) i citozinskih (dCTP), f
5. Magnezijumovi joni (Mg^{2+}), kofaktori neophodni za aktivnost Taq polimeraze i polimerizaciju (vezuju se za slobodne nukleotide i obezbeđuju njihovo ugrađivanje u rastući lanac DNK). Uloga Mg^{2+} jona u PCR reakciji: PCR puffer i sterilna dejonizovana voda.

Proces PCR amplifikacije obuhvatao je sledeće korake:

1. Inicijalna denaturacija DNK u trajanju od dva do četiri minuta (zavisno od udela GC parova).
2. Denaturacija DNK – rasplitanje i razdvajanje lanaca DNK. Obavlja se na 94-96°C u trajanju od 30 sec do nekoliko minuta (zavisno od udela GC parova),
3. Hibridizacija para prajmera sa komplementarnim sekvencama koji okružuju ciljani region DNK. Obavlja se na temperaturi od 45-65°C u trajanju od 30 sekundi do nekoliko minuta,
4. Elongacija prajmera (ekstenzija), odnosno sinteza novih DNK lanaca počev od prajmera, tako što se Taq polimeraza vezuje za mesta hibridizacije prajmera i katalizuje ugrađivanje novih nukleotida komplementarnih inicijalnim sekvencama. Ovaj proces se obavlja na 72°C i traje od 45 sec do 1 minuta. Koraci od 2. do 4. ponavljaju se tokom 25 do 40 ciklusa, kako bi se obezbedilo umnožavanje dovoljnog broja kopija ciljnog fragmenta DNK. Umnoženi ciljni fragmenti DNK nazivaju se amplikoni ili PCR produkti. U svakom ciklusu količina amplikona se duplicira (u prvom ciklusu nastaju 2 aplikona, u drugom 4, u trećem 8, u četvrtom 16, u petom 32, u šestom 64 ...) tako da na kraju PCR procesa nastaje od milion do bilion amplikona.
5. Elongacija preostalih produkata (na 72 °C, u trajanju od dva do četiri minuta).

Nakon završenog PCR dobijeni PCR amplifikati identifikovani su vertikalnom elektroforezom na 8% poliakrilamid gelu.

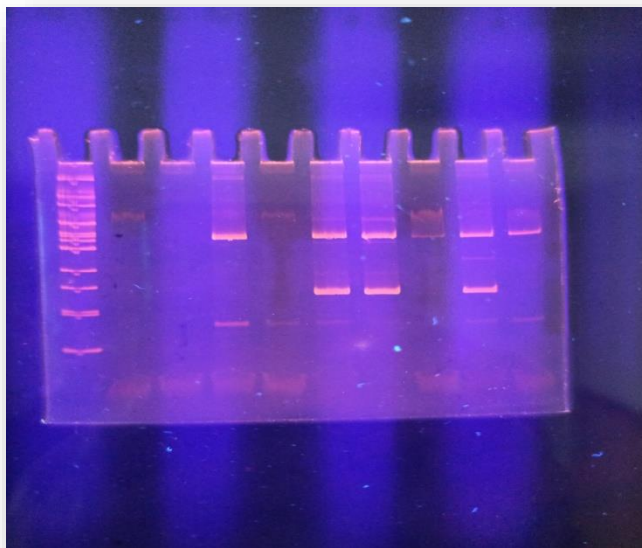
Elektroforeza obezbeđuje razdvajanje molekula različite dužine pod uticajem električnog polja prilikom njihovog kretanja kroz inertan i porozan matriks (agarozni gel) potopljen u rastvor slabog elektrolita. Fragmenti DNK različite dužine imaju različitu elektropokretljivost (jer je ukupna količina naelektrisanja DNK proporcionalna njegovoj veličini), te kroz gel putuju različitom brzinom (od – ka + polu).

Zbog toga fragmenti različite dužine tokom trajanja elektroforeze prolaze različiti put: kraći fragmenti se kreću brže i pređu duži put u odnosu na duže fragmente koji se kreću sporije. Međutim, to se ne vidi ako se ne primene određene boje jer je DNK bezbojna.

Za praćenje kretanja DNK kroz gel uzorci su pre nanošenja na gel mešani sa puferom za bojenje uzoraka (tzv. loading buffer) koji ima dve funkcije: omogućava praćenje toka elektroforeze (zbog boje) i čini uzorke težim čime se sprečava njihovo izlivanje van gela.

Pri svakom puštanju elektroforeze, osim uzoraka koji se ispituju, nanosi se i DNK standard (tzv. DNA ladder) koji predstavlja mešavinu fragmenata tačno određene dužine (npr. 100, 200, 300, 500, 1000 bp) i služi kao „lenjir“ za određivanje veličine ispitujućih fragmenata. Kada je elektroforeza završena, fragmenti različitih dužina su razdvojeni ali još uvek nisu vidljivi, pa je bilo neophodno gel obojiti inkubiranjem u rastvoru etidijum bromida – EtBr i 1xTBE (210).

EtBr (ili alternativna „boja“) fluorescira pod UV svetlošću, te je za konačnu vizuelizaciju rezultata bilo neophodno da se gel (nakon bojenja sa EtBr) postavi na UV transiluminator. Kvalitativno očitavanje rezultata obavljalo se odmah (dok je gel na transiluminatoru) kada su uzorci bili vidljivi kao fluorescentne trake. (Slika 8).



Slika 8. Vizuelizacija amplifikovanih fragmenata DNK na poliakrilamidnom gelu

3.4. Statistička obrada podataka

Kompletna statistička analiza podataka izvršena je pomoću komercijalnog statističkog softvera SPSS, verzija 22. Kod varijabli koje su bile predstavljene u vidu frekvencija pojedinih obeležja (kategorija), statistička značajnost razlika proveravana je primenom χ^2 testa.

U slučaju kontinuiranih varijabli, podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Normalnost distribucije podataka utvrđivana je primenom *Kolmogorov-Smirnov testa*. Za poređenje numeričkih varijabli korišćen je *Studentov t- test*, dok se u slučaju nepravilne distribucije podataka koristio *Mann-Withney test*. Za analizu među zavisnosti korišćen je *Pearson-ov* koeficijent linearne korelacije kao i *Spearman* test rang korelacije ukoliko su bile varijable rangirane vrednosti.

Za definisanje prediktivnih faktora za nastanak NRF korišćena je univarijantna kao i naknadna multivarijantna regresiona analiza. Iz regresione analize, a na osnovu regresionih koeficijenata formiran je scoring sistem za stratifikaciju rizika za pojavu NRF-a. Statistička hipoteza je testirana na nivou signifikantnosti za rizik od $\alpha=0,05$, tj. statistički značajna razlika procenjivana je na minimalnom nivou $p<0,05$, pri čemu su utvrđena tri nivoa značajne razlike: statistički značajna razlika, gde je $p<0,05$; umerena statistički značajna razlika, gde je $p<0,01$ i visoka statistički značajna razlika, gde je $p<0,001$.

3.5. Institucije u kojima je rađeno istraživanje

Istraživanje je obavljeno u sledećim institucijama:

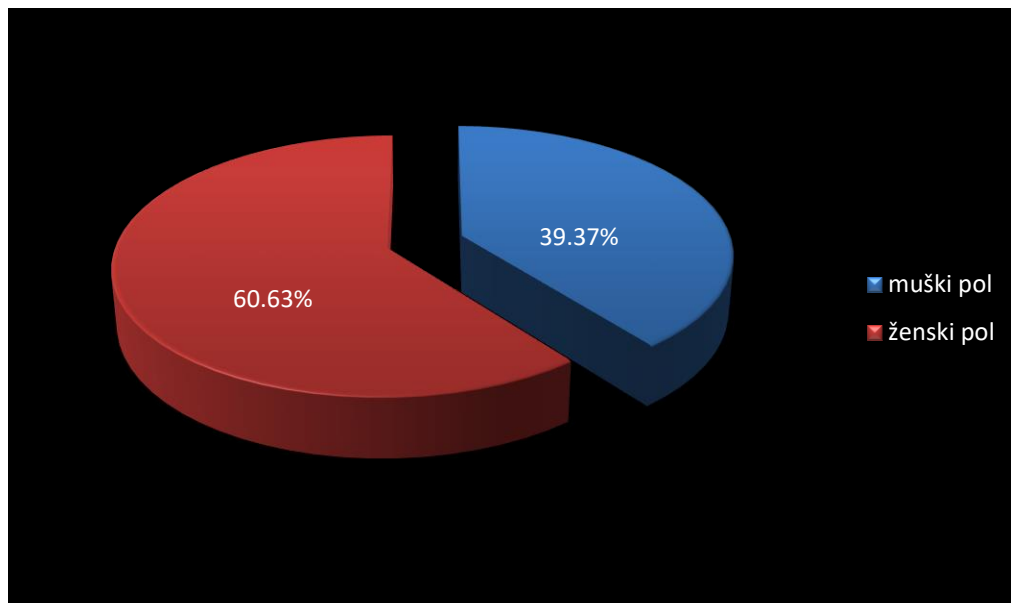
1. Klinika za stomatologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, Srbija.
2. Laboratorija za funkcionalnu genomiku i proteomiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, Srbija.
3. Stomatološka ordinacija "Insta Smile" Niš.

Metodologija doktorske disertacije odobrena je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu, odlukom broj No.20/11-2017-5EO, dana 15.10. 2019.godine.

4. REZULTATI

4.1. Demografske karakteristike ispitanika

U ovo istraživanje je bilo uključeno 160 ispitanika (63 muškaraca (39.37%) i 97 žena (60.63%)) (Grafikon 1), prosečne starosti 43,30 godina.



Grafikon 1. Distribucija ispitanika prema polu

4.2. . Klinički parametri

Procena stanja oralne higijene, gingive i parodonticijuma

4.2.1. Indeksi oralne higijene

4.2.1.1. Plak indeks - *Pli*

U Tabeli 8 prikazane su prosečne vrednosti plak indeksa u svim grupama ispitanika pre terapije, 7 i 30 dana nakon terapije, kao i promena ovog parametra 7-og i 30-og dana nakon primene opisanih terapijskih pristupa u okviru odgovarajuće grupe. Vrednosti ovog parametra su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Promena prosečne vrednosti plak indeksa u svim grupama tokom celog opservacionog perioda predstavljena je na Grafikonu 2.

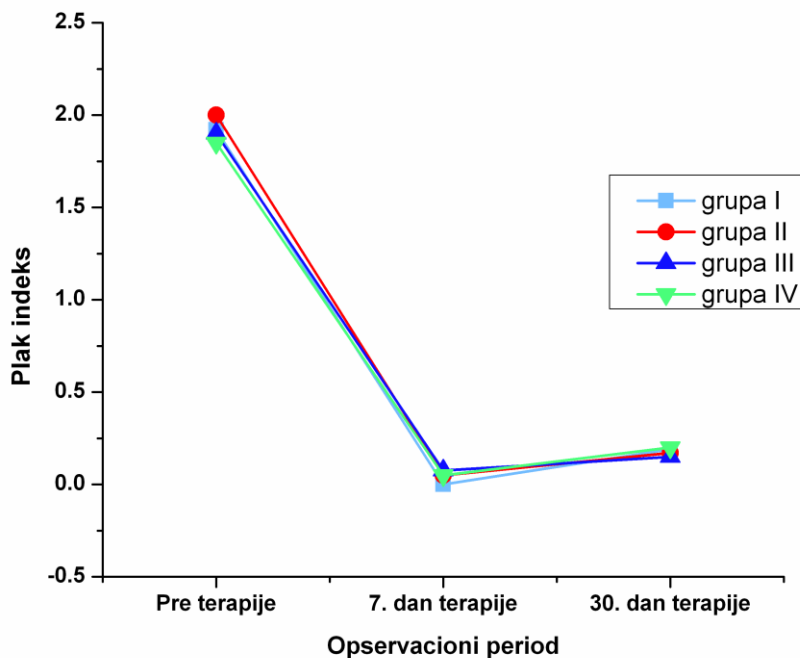
Tabela 8. Prosečne vrednosti *Pli* u kontrolnoj grupi i terapijskim grupama pre, 7 i 30 dana nakon terapije

Period	Bazična terapija (kontrolna grupa) (grupa I)	Bazična terapija + probiotska terapija (grupa II)	Bazična terapija + lokalna primena aktivnog O ₂ (grupa III)	Bazična terapija + terapija klindamicinom (grupa IV)
Pre terapije	1,92 \pm 0,53 ^{A,B}	2,00 \pm 0,56 ^{A,B}	1,90 \pm 0,58 ^{A,B}	1,89 \pm 0,57 ^{A,B}
Sedam dana nakon terapije	0,00 \pm 0,00	0,05 \pm 0,01	0,075 \pm 0,006	0,05 \pm 0,005
Mesec dana nakon terapije	0,19 \pm 0,03	0,17 \pm 0,04	0,15 \pm 0,07	0,20 \pm 0,06
Prosečna razlika (početak vs 7. dan)	1,92 \pm 0,51	1,95 \pm 0,57	1,82 \pm 0,55	1,84 \pm 0,52
Prosečna razlika (početak vs 30. dan)	1,73 \pm 0,44	1,83 \pm 0,51	1,75 \pm 0,49	1,69 \pm 0,43

A: pre terapije vs 7 dana nakon terapije;

B: pre terapije vs 30 dana nakon terapije; ($p < 0,001$, Vilkinsonov test ranga).

Posmatrajući prosečne vrednosti plak indeksa u sve četiri ispitivane grupe pre primenjivanih odgovarajućih terapijskih protokola, primenom Man-Vitnijeovog testa utvrđeno je da se vrednosti ovog parametra nisu statistički značajno razlikovale ($p>0,05$).



Grafikon 2. Promena prosečnih vrednosti *Pl* u svim grupama ispitanika tokom celog opsrevacionog perioda (pre terapije, 7-og i 30-og dana tokom primene terapije)

Sedam dana nakon početka terapijskih protokola, gotovo kod svih ispitanika (153; 95,62%) vrednost ovog parametra je svedena na nulu, dok su dva ispitanika iz grupe II, tri ispitanika iz grupe III i dva iz grupe IV imali vrednost 1 (7; 4,38%) (Grafikon 2). Takođe, korišćenjem Vikoksonovog testa, u svim posmatranim grupama uočeno je statistički značajno smanjenje prosečne vrednosti ovog parametra u odnosu na prosečne vrednosti pre terapije ($p<0,001$). Srednje vrednosti promena indeksa plaka nakon prvih 7 dana terapije kretale su se od $1,82 \pm 0,55$ za grupu III, $1,84 \pm 0,52$ za grupu IV, $1,92 \pm 0,51$ za grupu I do $1,95 \pm 0,57$ za grupu II i primenom Man-Vitnijeovog testa utvrđeno je da se ove vrednosti nisu međusobno statistički značajno razlikovale ($p>0,05$).

Daljim upoređivanjem prosečnih vrednosti pre i nakon mesec dana od početka navedenih terapijskih protokola, u svim analiziranim grupama ispitanika je utvrđena statistički značajno niža vrednost ovog parametra nakon mesec dana terapije ($p < 0,001$). Upoređivanjem dobijenih prosečnih vrednosti plak indeksa nakon 30 dana od početka terapije, nije utvrđena statistički značajna razlika ovog parametra među grupama ($p > 0,05$). Pored toga, prosečne vrednosti promena ovog parametra 30 dana nakon terapije kretale su se od $1,69 \pm 0,43$ za grupu IV, $1,73 \pm 0,44$ za grupu I, $1,75 \pm 0,49$ za grupu III do $1,83 \pm 0,51$ za grupu II. Iako je primenom Man-Vitnijevog testa utvrđeno da se ove vrednosti nisu međusobno statistički značajno razlikovale ($p > 0,05$), može se izvesti zaključak da su sva četiri terapijska pristupa dovela do statistički značajnog poboljšanja prosečne vrednosti plak indeksa u sve četiri ispitivane grupe i da su takođe vrednosti ovog parametra statistički značajno niže i posle mesec dana od početka primene svih opisanih terapijskih pristupa (Grafikon 2).

Uticaj primenjenog terapijskog protokola na izmerene vrednosti *Pli*

Na osnovu dobijenih rezultata u Tabeli 8 unutar sve četiri grupe ispitanika, kao i za celokupnu populaciju ispitanika u ovom istraživanju, uočeno je statistički značajno smanjenje plak indeksa tokom celokupnog perioda primene ovih terapijskih protokola u odnosu na vrednosti pre početka terapije ($p < 0,001$).

Najpre su praćeni efekti unutar grupa sa ciljem da bi se utvrdila da li postoji statistički značajna promena *Pli* za datu grupu ispitanika. Ispitivana je statistička značajnost promene (p), kao i veličina efekta koja je numerički definisana (η^2).

Pokazano je da sva četiri terapijska protokola imaju statistički značajno visok efekat na promene vrednosti *Pli* (grupa I $\eta^2 = 0,854$; grupa II $\eta^2 = 0,827$; grupa III $\eta^2 = 0,816$; grupa IV $\eta^2 = 0,811$), pa se može zaključiti da je svaki pojedinačni terapijski protokol pokazao značajan i izražen efekat na vrednosti plak indeksa za sve ispitanike u svakoj pojedinačnoj grupi u kojoj je taj protokol primenjen (efekat unutar grupa) (Tabela 9).

Takođe, na osnovu dobijenih vrednosti parcijalnog eta kvadrat koeficijenta (η^2) može se zaključiti da su svi terapijski protokoli pokazali veoma sličan uticaj na smanjenje vrednosti ovog parametra unutar grupe u kojoj su primenjivani (Tabela 9).

Pored svega navedenog, praćen je i efekat vrste primenjenog terapijskog protokola koji bi utvrdio da li postoji statistička značajnost u promeni vrednosti *Pl_i* u zavisnosti od vrste primenjenog terapijskog protokola. Rezultati ove analize su pokazali statistički značajan i relativno visoki uticaj sva četiri primenjena terapijska protokola na smanjenje vrednosti plak indeksa (grupa I $\eta^2 = 0,911$; grupa II $\eta^2 = 0,873$; grupa III $\eta^2 = 0,824$; grupa IV $\eta^2 = 0,867$), a ponovo je potvrđeno, na osnovu dobijenih vrednosti parcijalnog eta kvadrat koeficijenta, da su svi terapijski protokoli pokazali veoma sličnu efikasnost na smanjenje vrednosti ovog parametra (Tabela 9).

Daljom analizom određen je i uticaj interakcije definisanog faktora (tj. vrste terapijskog protokola i vremena njegove primene). Veoma slično kao i kod analize efekata terapijskih protokola u prethodnom pasusu, upoređujući efekte primenjenih terapijskih protokola na vrednost *Pl_i* tokom celog perioda njihove primene (grupa I $\eta^2 = 0,832$; grupa II $\eta^2 = 0,841$; grupa III $\eta^2 = 0,851$; grupa IV $\eta^2 = 0,818$) na osnovu dobijenih rezultata može se izvesti zaključak da su sva četiri terapijska protokola pokazala visok uticaj i značajan efekat na smanjenje vrednosti plak indeksa tokom celog perioda primene terapija od 30 dana.

Tabel 9. Uticaj primenjenog terapijskog protokola na izmerene vrednosti *Pli* u analiziranim grupama tokom perioda ispitivanja

Izvor odstupanja (variranja) (vrednost <i>Pli</i>)	Grupa		Efekti unutar grupe	Efekat u odnosu na vrstu terapijskog protokola	Interakcija terapijski protokol x vreme	
	I	<i>p</i>		<0,001***	<0,001***	<0,001***
		Veličina efekta (η^2)		0,854	0,911	0,832
	II	<i>p</i>		<0,001***	<0,001***	<0,001***
		Veličina efekta (η^2)		0,827	0,873	0,841
	III	<i>p</i>		<0,001***	<0,001***	<0,001***
		Veličina efekta (η^2)		0,816	0,824	0,851
	IV	<i>p</i>		<0,001***	<0,001***	<0,001***
		Veličina efekta (η^2)		0,811	0,867	0,818

** – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$

4.2.1.2. Indeks zubnog kamenca - *Izk*

U Tabeli 10 prikazane su prosečne vrednosti indeksa zubnog kamenca u svim grupama ispitanika pre terapije, 7 i 30 dana nakon terapije, kao i promena ovog parametra 7-og i 30-og dana nakon primene opisanih terapijskih pristupa u okviru odgovarajuće grupe.

Vrednosti ovog parametra su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Promena prosečne vrednosti indeksa zubnog kamenca u svim grupama tokom celog opservacionog perioda predstavljena je na Grafikonu 3.

Tabela 10. Prosečne vrednosti *Izk* u kontrolnoj grupi i terapijskim grupama pre, 7 i 30 dana nakon terapije

Period	Bazična terapija (kontrolna grupa) (grupa I)	Bazična terapija + probiotska terapija (grupa II)	Bazična terapija + lokalna primena aktivnog O ₂ (grupa III)	Bazična terapija + terapija klindamicinom (grupa IV)
Pre terapije	1,72 \pm 0,33 ^{A,B}	1,75 \pm 0,35 ^{A,B}	1,77 \pm 0,31 ^{A,B}	1,68 \pm 0,33 ^{A,B}
Sedam dana nakon terapije	0,05 \pm 0,005	0,075 \pm 0,005	0,075 \pm 0,006	0,05 \pm 0,005
Mesec dana nakon terapije	0,62 \pm 0,07 ^{C,D}	0,25 \pm 0,08	0,20 \pm 0,03	0,47 \pm 0,09 ^{E,F}
Prosečna razlika (početak vs 7. dan)	1,67 \pm 0,28	1,67 \pm 0,27	1,69 \pm 0,32	1,63 \pm 0,26
Prosečna razlika (početak vs 30. dan)	1,10 \pm 0,21 ^{C,D}	1,50 \pm 0,25	1,57 \pm 0,29	1,21 \pm 0,23 ^{E,F}

A: pre terapije vs 7 dana nakon terapije;

B: pre terapije vs 30 dana nakon terapije; (**p<0,001, Vilkinsonov test ranga**);

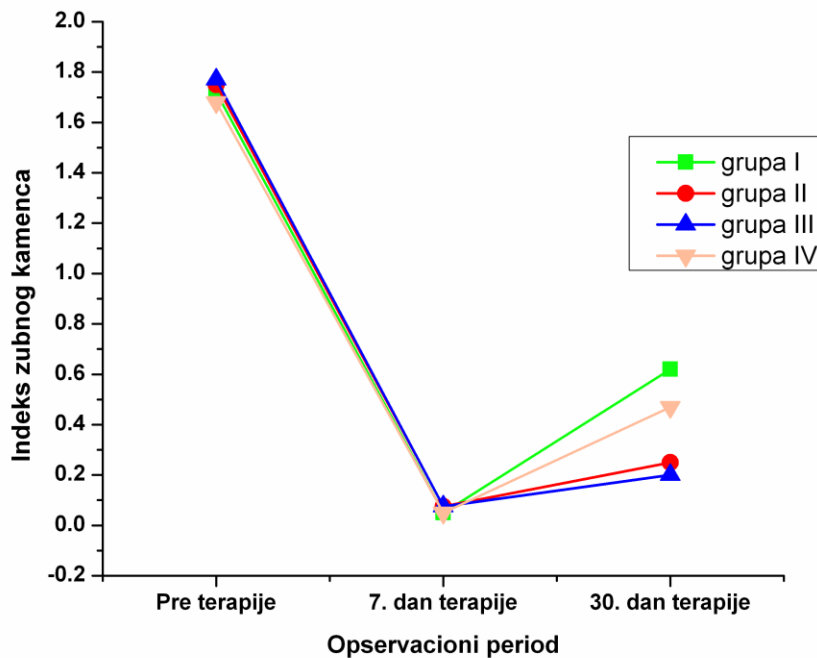
C: bazična terapija vs bazična+probiotska terapija;

D: bazična terapija vs bazična+terapija aktivnim O₂;

E: bazična+terapija klidamicinom vs bazična+probiotska terapija;

F: bazična+terapija klidamicinom vs bazična+terapija aktivnim O₂; (**p<0,05, Man-Vitnjev test**).

Upoređujući prosečne vrednosti indeksa zubnog kamenca u sve četiri ispitivane grupe pre primenjivanih odgovarajućih terapijskih protokola, primenom Man-Vitnjevog testa utvrđeno je da se vrednosti ovog parametra nisu statistički značajno razlikovale ($p>0,05$).



Grafikon 3. Promena prosečnih vrednosti I_{zk} u svim grupama ispitanika tokom celog opsrevacionog perioda (pre terapije, 7-og i 30-og dana tokom primene terapije)

Sedam dana nakon početka terapijskih protokola, gotovo kod svih ispitanika (150; 93,75%) vrednost ovog parametra je svedena na nulu, dok su po dva ispitanika iz grupa I i IV i po tri ispitanika iz grupe II i III imali vrednost 1 (10; 6,25%) (Grafikon 3). Takođe, korišćenjem Vikoksonovog testa, u svim posmatranim grupama uočeno je statistički značajno smanjenje prosečne vrednosti ovog parametra u odnosu na prosečne vrednosti pre početka terapije ($p<0,001$). Srednje vrednosti promena ovog parametra nakon prvih 7 dana terapije kretale su se od $1,63 \pm 0,26$ za grupu IV, $1,67 \pm 0,27$ za grupu II, $1,67 \pm 0,28$ za grupu I do $1,69 \pm 0,32$ za grupu III i primenom Man-Vitnjevog testa utvrđeno je da se ove vrednosti nisu međusobno statistički značajno razlikovale ($p>0,05$).

Daljim upoređivanjem prosečnih vrednosti pre i nakon mesec dana od početka navedenih terapijskih protokola, u svim analiziranim grupama ispitanika je utvrđena statistički značajno niža vrednost ovog parametra nakon mesec dana terapije ($p < 0,001$).

Takođe, značajno je istaći da su mesec dana nakon sprovedenih terapijskih pristupa prosečne vrednosti indeksa zubnog kamenca koje su zabeležene u grupi ispitanika kod kojih je lokalno primenjen aktivni kiseonik (grupa III) i grupi ispitanika kod kojih je primenjena probiotska terapija (grupa II) bile statistički značajno niže u odnosu na grupu I kod koje je primenjena samo bazična terapija i grupu IV kod koje je pored bazične terapije primenjena i terapija klindamicinom ($p < 0,05$, Man-Vitnijev test). Ovo je dodatno potvrđeno i upoređivanjem prosečnih vrednosti promena ovog indeksa za grupu I i IV koje su bile statistički značajno manje u odnosu na prosečne vrednosti za preostale dve grupe ($p < 0,05$, Man-Vitnijev test; Tabela 10).

Dobijeni rezultati ukazuju na to da primena svih terapijskih procedura dovodi do statistički značajnog smanjenja indeksa zubnog kamenca i ove vrednosti su, takođe, statistički značajno manje u odnosu na one pre terapije, kao i da su nešto bolji rezultati postignuti primenom bazične terapije u kombinaciji sa probioticima ili aktivnim kiseonikom u odnosu na druge dve primenjene terapijske procedure (Grafikon 3).

Uticaj primenjenog terapijskog protokola na izmerene vrednosti *Izk*

Na osnovu dobijenih rezultata unutar sve četiri grupe ispitanika, kao i za celokupnu populaciju ispitanika u ovom istraživanju (Tabela 10), uočeno je statistički značajno smanjenje indeksa zubnog kamenca tokom celokupnog perioda primene ovih terapijskih protokola u odnosu na vrednosti pre početka terapije ($p < 0,001$).

Analizom efekata unutar grupa, pokazano je da sva četiri terapijska protokola imaju statistički značajno visok efekat na promene vrednosti *Izk* (grupa I $\eta^2 = 0,534$; grupa II $\eta^2 = 0,676$; grupa III $\eta^2 = 0,616$; grupa IV $\eta^2 = 0,528$), pa se na osnovu ovih rezultata može zaključiti da je svaki pojedinačni terapijski protokol pokazao značajan i izražen efekat na vrednosti indeksa zubnog kamenca za sve ispitanike u svakoj pojedinačnoj grupi u kojoj je taj protokol primenjen (efekat unutar grupa) (Tabela 11).

Pored toga, na osnovu dobijenih vrednosti η^2 može se zaključiti da su svi terapijski protokoli pokazali vrlo sličnu efikasnost na smanjenje vrednosti ovog parametra unutar grupe u kojoj su primenjivani.

Testiranjem efekata u odnosu na vrstu primenjenog terapijskog protokola, pokazano je da svi terapijski protokoli imaju statistički značajan efekat na smanjenje vrednosti *Izk* (grupa I $\eta^2 = 0,423$; grupa II $\eta^2 = 0,619$; grupa III $\eta^2 = 0,632$; grupa IV $\eta^2 = 0,475$), ali na osnovu dobijenih vrednosti parcijalnog η^2 može se izvesti zaključak da su primenjeni terapijski protokoli u grupama I i IV pokazali nešto manju efikasnost na smanjenje vrednosti indeksa zubnog kamenca u odnosu na kombinovane protokole u grupama II i III.

Sličan zaključak može se izvesti i kada se uporede efekti primenjenih terapijskih protokola na vrednost *Izk* tokom celog perioda njihove primene (grupa I $\eta^2 = 0,397$; grupa II $\eta^2 = 0,533$; grupa III $\eta^2 = 0,512$; grupa IV $\eta^2 = 0,288$). Sva četiri terapijska protokola su pokazala statistički značajan i visok efekat ($\eta^2 > 0,14$), s tim da su terapijski protokoli u grupama I i IV ponovo pokazali nešto manji uticaj (manju efikasnost) na smanjenje vrednosti indeksa zubnog kamenca u odnosu na kombinovane protokole u grupama II i III. Pored toga, može se zaključiti da se promene vrednosti *Izk* u grupama I i IV dešavale na malo drugačiji način u odnosu na preostale dve grupe (manje vrednosti η^2) i to prvenstveno u periodu od 7-og do 30-og dana terapije kada u ovim grupama došlo do statistički značajno veće promene (tj. povećanja) vrednosti indeksa zubnog kamenca, što nasuprot tome nije toliko izraženo u preostale dve grupe (Tabela 10).

Tabela 11. Uticaj primenjenog terapijskog protokola na izmerene vrednosti *Izk* u analiziranim grupama tokom perioda ispitivanja

Izvor odstupanja (variranja) (vrednost <i>Izk</i>)	Grupa		Efekte unutar grupe	Efekat u odnosu na vrstu terapijskog protokola	Interakcija terapijski protokol x vreme
	I		<i>p</i>	<0,001***	0,011**
		Veličina efekta (η^2)	0,534	0,423	0,397
II		<i>p</i>	<0,001***	<0,001***	<0,001***
		Veličina efekta (η^2)	0,676	0,619	0,533
III		<i>p</i>	<0,001***	<0,001***	<0,001***
		Veličina efekta (η^2)	0,616	0,632	0,512
IV		<i>p</i>	<0,001***	0,009**	0,034**
		Veličina efekta (η^2)	0,528	0,475	0,288

** – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$

4.2.2. Gingivalni indeksi

4.2.2.1. Gingivalni indeks – Gi

U Tabeli 12 prikazane su prosečne vrednosti gingivalnog indeksa u svim grupama ispitanika pre terapije, 7 i 30 dana nakon terapije, kao i promena ovog parametra 7-og i 30-og dana nakon primene opisanih terapijskih pristupa u okviru odgovarajuće grupe. Vrednosti ovog parametra su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Promena prosečne vrednosti gingivalnog indeksa u svim grupama tokom celog opservacionog perioda predstavljena je na Grafikonu 4.

Tabela 12. Prosečne vrednosti *Gi* u kontrolnoj grupi i terapijskim grupama pre, 7 i 30 dana nakon terapije

Period	Bazična terapija (kontrolna grupa) (grupa I)	Bazična terapija + probiotska terapija (grupa II)	Bazična terapija + lokalna primena aktivnog O ₂ (grupa III)	Bazična terapija + terapija klindamicinom (grupa IV)
Pre terapije	1,72 \pm 0,42 ^{A,B}	1,75 \pm 0,46 ^{A,B}	1,79 \pm 0,48 ^{A,B}	1,77 \pm 0,49 ^{A,B}
Sedam dana nakon terapije	0,47 \pm 0,16 ^C	0,42 \pm 0,13 ^D	0,20 \pm 0,04	0,52 \pm 0,18 ^E
Mesec dana nakon terapije	0,70 \pm 0,17 ^{C,F}	0,22 \pm 0,07	0,17 \pm 0,03	0,20 \pm 0,15
Prosečna razlika (početak vs 7. dan)	1,25 \pm 0,22 ^{C,F,G}	1,33 \pm 0,30 ^D	1,59 \pm 0,39	1,25 \pm 0,27 ^E
Prosečna razlika (početak vs 30. dan)	1,02 \pm 0,22 ^{C,F,G}	1,53 \pm 0,32	1,62 \pm 0,42	1,57 \pm 0,34

A: pre terapije vs 7 dana nakon terapije;

B: pre terapije vs 30 dana nakon terapije; ($p < 0,001$, Vilkinsonov test ranga);

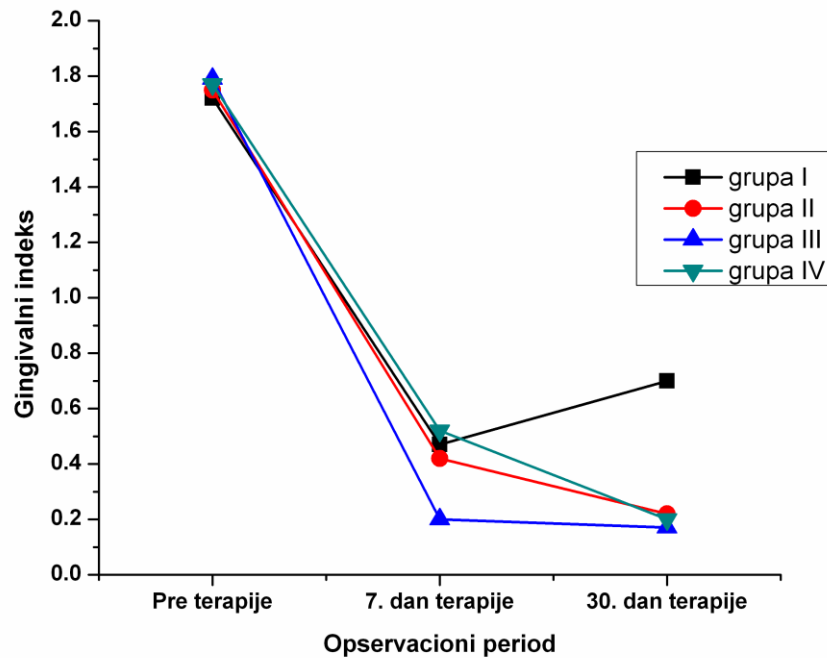
C: bazična terapija vs bazična+terapija aktivnim O₂;

D: bazična+probiotska terapija vs bazična+terapija aktivnim O₂;

E: bazična+terapija klindamicinom vs bazična+terapija aktivnim O₂;

F: bazična terapija vs bazična+probiotska terapija; **G:** bazična terapija vs bazična+terapija klindamicinom, ($p < 0,05$, Man-Vitnjev test).

Posmatrajući prosečne vrednosti gingivalnog indeksa u sve četiri ispitivane grupe pre primenjivanih odgovarajućih terapijskih pristupa (protokola), primenom Man-Vitnijevog testa utvrđeno je da se vrednosti ovog parametra nisu statistički značajno razlikovale ($p>0,05$).



Grafikon 4. Promena prosečnih vrednosti G_i u svim grupama ispitanika tokom celog opservacionog perioda (pre terapije, 7-og i 30-og dana tokom primene terapije)

Sedam dana nakon početka terapijskih protokola, kod 100 ispitanika (62,50%) vrednost ovog parametra je bila svedena na nulu, dok se kod preostalih 60 ispitanika (37,50%) vrednost ovog parametra kretala u rasponu od 1 do 2. Primenom Vikoksonovog testa, u svim posmatranim grupama uočeno je statistički značajno smanjenje prosečne vrednosti ovog parametra u odnosu na prosečne vrednosti pre početka terapije ($p<0,001$).

Upoređivanjem prosečnih vrednosti dobijenih za svaku grupu ispitanika, u grupi III (bazična terapija + O₂), zabeležena je statistički značajno niža vrednost gingivalnog indeksa ($0,20 \pm 0,04$; Tabela 12) u odnosu na preostale tri grupe ($p < 0,05$, Man-Vitnijev test) jer je u ovoj grupi zabeležen najveći broj ispitanika kod kojih je ovaj parametar sveden na nulu (33; 82,50%), dok su ostali ispitanici iz ove grupe (7; 7,50%) imali vrednost 1. U ostalim grupama broj ispitanika kod kojih je gingivalni indeks iznosio 0 nakon sedmodnevne terapije iznosio je 23 za grupu I, 22 za grupu II i 21 za grupu IV, dok se kod preostalih ispitanika iz sve tri grupe vrednost ovog parametra kretala od 1 do 2.

Daljim upoređivanjem prosečnih vrednosti pre i nakon mesec dana od početka navedenih terapijskih protokola, u svim analiziranim grupama ispitanika je utvrđena statistički značajno niža vrednost ovog parametra nakon mesec dana terapije ($p < 0,001$). Pored toga, značajno je istaći da su mesec dana nakon sprovedenih terapijskih pristupa srednje vrednosti gingivalnog indeksa u grupama sa kombinovanom terapijom (II, III i IV) bile statistički značajno niže u odnosu na grupu I kod koje je primenjena samo bazična terapija ($p < 0,05$, Man-Vitnijev test). Ovaj nalaz je dodatno potvrđen i upoređivanjem prosečnih vrednosti promena ovog indeksa za grupu I ($1,02 \pm 0,22$) koja je bila statistički značajno manja u odnosu na prosečne vrednosti promena za preostale tri grupe ($p < 0,05$, Man-Vitnijev test; Tabela 12). Takođe, može se zaključiti da se primenom kombinovanih terapijskih procedura tokom 30 dana može obezbediti statistički značajno poboljšanje vrednosti ovog parametra u odnosu na bazičnu terapiju čijom je samostalnom primenom zabeleženo povećanje vrednosti gingivalnog indeksa u periodu od 7-og do 30-og dana (Tabela 12).

Uticaj korišćenog terapijskog protokola na izmerene vrednosti *Gi*

Na osnovu dobijenih rezultata u Tabeli 12 unutar sve četiri grupe ispitanika, kao i za celokupnu populaciju ispitanika u ovom istraživanju, uočeno je statistički značajno smanjenje gingivalnog indeksa tokom celokupnog perioda primene ovih terapijskih protokola u odnosu na vrednosti pre početka terapije ($p < 0,001$).

Pored toga, praćeni su i efekti unutar grupa sa ciljem da bi se utvrdila da li postoji statistički značajna promena G_i za datu grupu ispitanika. Pokazano je da sva četiri terapijska protokola imaju statistički značajno visok efekat na promene vrednosti G_i (grupa I $\eta^2=0,345$; grupa II $\eta^2=0,487$; grupa III $\eta^2=0,556$; grupa IV $\eta^2=0,521$), pa se može zaključiti da je svaki pojedinačni terapijski protokol pokazao značajan efekat na vrednosti gingivalnog indeksa za sve ispitanike u svakoj pojedinačnoj grupi u kojoj je taj protokol primenjen (efekat unutar grupa) (Tabela 13). Takođe, na osnovu dobijenih vrednosti parcijalnog eta kvadrat koeficijenta (η^2) može se zaključiti da je terapijski protokol koji čini bazična terapija (grupa I) pokazao manju efikasnost na smanjenje vrednosti gingivalnog indeksa unutar te grupe.

Praćen je i efekat vrste primenjenog terapijskog protokola koji bi utvrdio da li postoji statistička značajnost u promeni vrednosti G_i u zavisnosti od vrste primenjenog terapijskog protokola. Rezultati ovog testiranja su pokazali relativno visoki uticaj sva četiri primenjena terapijska protokola na smanjenje vrednosti gingivalnog indeksa (grupa I $\eta^2=0,222$; grupa II $\eta^2=0,386$; grupa III $\eta^2=0,456$; grupa IV $\eta^2=0,428$), a ponovo je potvrđeno da je terapijski protokol iz grupe I pokazao najmanju efikasnost u odnosu na preostala tri kombinovana terapijska protokola.

Daljom analizom je određen i uticaj interakcije definisanog faktora (tj. vrste terapijskog protokola i vremena njegove primene). Veoma slično kao i kod analize efekata terapijskih protokola u prethodnom pasusu, upoređujući efekte primenjenih terapijskih protokola na vrednost G_i tokom celog perioda njihove primene (grupa I $\eta^2=0,177$; grupa II $\eta^2=0,376$; grupa III $\eta^2=0,408$; grupa IV $\eta^2=0,383$) dolazi se do zaključka da su sva četiri terapijska protokola pokazala relativno visoki uticaj na smanjenje vrednosti gingivalnog indeksa tokom celog perioda primene terapija, dok je bazična terapija pokazala najmanji uticaj.

Pored toga, može se zaključiti da su promene vrednosti G_i u grupi I dešavale na potpuno drugačiji način u odnosu na preostale tri grupe (manje vrednosti η^2 u odnosu na ostale grupe), kao i da je u periodu od 7-og do 30-og dana terapije u ovoj grupi došlo do povećanja vrednosti gingivalnog indeksa, što nije slučaj u ostalim grupama gde je došlo do daljeg smanjenja ovog parametra.

Tabela 13. Uticaj primenjenog terapijskog protokola na izmerene vrednosti *Gi* u analiziranim grupama tokom perioda ispitivanja

Izvor odstupanja (variranja za <i>Gi</i>)	Grupa		Efekti unutar grupe	Efekat u odnosu na vrstu terapijskog protokola	Interakcija terapijski protokol x vreme
	I		<i>p</i>	<0,001***	0,026**
		Veličina efekta (η^2)	0,345	0,222	0,177
II		<i>p</i>	<0,001***	0,011**	0,025**
		Veličina efekta (η^2)	0,487	0,386	0,376
III		<i>p</i>	<0,001***	<0,001***	0,007**
		Veličina efekta (η^2)	0,556	0,456	0,408
IV		<i>p</i>	<0,001***	0,009**	0,016**
		Veličina efekta (η^2)	0,521	0,428	0,383

** – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$

4.2.2.2. Indeks krvarenja – *Ikrv*

U Tabeli 14 prikazane su prosečne vrednosti indeksa krvarenja u svim grupama ispitanika pre terapije, 7 i 30 dana nakon terapije, kao i promena ovog parametra 7-og i 30-og dana nakon primene opisanih terapijskih pristupa u okviru odgovarajuće grupe. Vrednosti ovog parametra su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Promena prosečne vrednosti indeksa krvarenja u svim grupama tokom celog opservacionog perioda predstavljena je na Grafikonu 5.

Tabela 14. Prosečne vrednosti *Ikrv* u kontrolnoj grupi i terapijskim grupama pre, 7 i 30 dana nakon terapije

Period	Bazična terapija (kontrolna grupa) (grupa I)	Bazična terapija + probiotska terapija (grupa II)	Bazična terapija + lokalna primena aktivnog O ₂ (grupa III)	Bazična terapija + terapija klindamicinom (grupa IV)
Pre terapije	1,87 \pm 0,38 ^{A,B}	1,80 \pm 0,35 ^{A,B}	1,90 \pm 0,42 ^{A,B}	1,82 \pm 0,36 ^{A,B}
Sedam dana nakon terapije	0,28 \pm 0,06	0,30 \pm 0,09	0,20 \pm 0,04	0,85 \pm 0,32 ^{C,D,E}
Mesec dana nakon terapije	0,82 \pm 0,13 ^{F,G}	0,18 \pm 0,06	0,15 \pm 0,05	0,95 \pm 0,28 ^{C,D,E}
Prosečna razlika (početak vs 7. dan)	1,69 \pm 0,33	1,50 \pm 0,28	1,70 \pm 0,36	0,97 \pm 0,17 ^{C,D,E}
Prosečna razlika (početak vs 30. dan)	1,05 \pm 0,21 ^{F,G}	1,62 \pm 0,31	1,75 \pm 0,34	0,87 \pm 0,15 ^{D,E}

A: pre terapije vs 7 dana nakon terapije;

B: pre terapije vs 30 dana nakon terapije; (**p<0,001, Vilkinsonov test ranga**);

C: bazična+terapija klidamicinom vs bazična terapija;

D: bazična+terapija klidamicinom vs bazična+probiotska terapija;

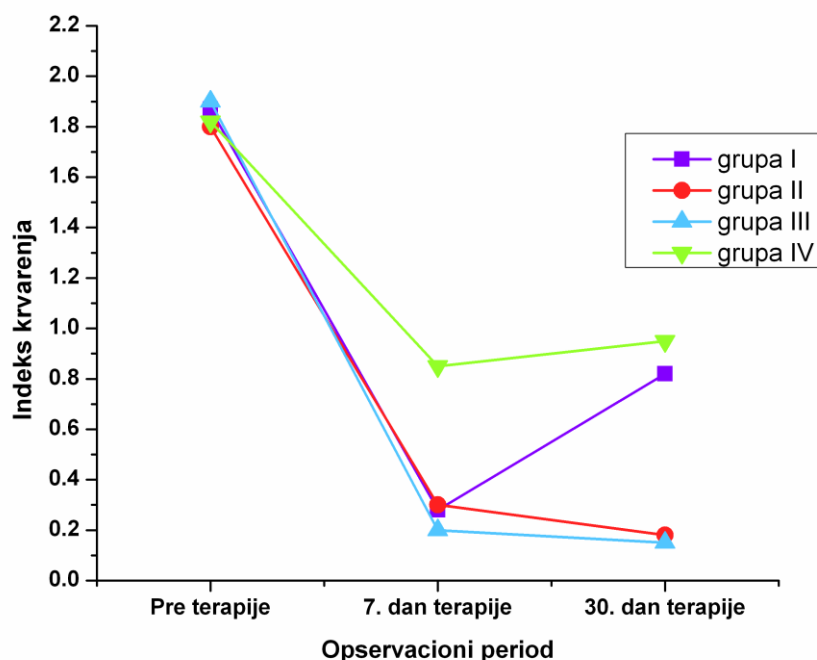
E: p<0,05 bazična+terapija klidamicinom vs bazična+terapija aktivnim O₂;

F: bazična terapija vs bazična+probiotska terapija;

G: bazična terapija vs bazična+terapija aktivnim O₂; (**p<0,05, Man-Vitnijev test**).

Upoređujući prosečne vrednosti indeksa krvarenja u sve četiri ispitivane grupe pre primenjivanih odgovarajućih terapijskih protokola, primenom Man-Vitnjevog testa utvrđeno je da se vrednosti ovog parametra nisu statistički značajno razlikovale ($p > 0,05$).

Sedam dana nakon početka terapijskih protokola, kod 102 ispitanika (63,75%) vrednost ovog parametra je bila svedena na nulu, dok se kod preostalih 58 ispitanika (36,25%) vrednost ovog parametra kretala u rasponu od 1 do 2. Primenom Vikoksonovog testa, u svim posmatranim grupama uočeno je statistički značajno smanjenje prosečne vrednosti ovog parametra u odnosu na prosečne vrednosti pre početka terapije ($p < 0,001$).



Grafikon 5. Promena prosečnih vrednosti *Ikrv* u svim grupama ispitanika tokom celog opservacionog perioda (pre terapije, 7-og i 30-og dana tokom primene terapije)

Upoređivanjem srednjih vrednosti dobijenih za svaku grupu ispitanika, u grupi IV je zabeležena statistički značajno viša vrednost indeksa krvarenja ($0,85 \pm 0,32$; Tabela 14) u odnosu na preostale tri grupe ($p < 0,05$, Man-Vitnijev test) jer je u ovoj grupi zabeležen najmanji broj ispitanika kod kojih je ovaj parametar bio sveden na nulu (12; 30%), dok su ostali ispitanici iz ove grupe (28; 70%) imali vrednosti u rasponu od 1 do 2. U ostalim grupama broj ispitanika kod kojih je indeks krvarenja iznosio 0 nakon sedmodnevne terapije iznosio je 29 za grupu I, 29 za grupu II i 32 za grupu IV, dok se kod preostalih ispitanika iz sve tri grupe vrednost ovog parametra kretala od 1 do 2 (Grafikon 5).

Daljim upoređivanjem prosečnih vrednosti pre i nakon mesec dana od početka navedenih terapijskih protokola, u svim analiziranim grupama ispitanika je utvrđena statistički značajno niža vrednost ovog parametra nakon mesec dana terapije ($p < 0,001$). Pored toga, značajno je istaći da su mesec dana nakon sprovedenih terapijskih pristupa prosečne vrednosti indeksa krvarenja koje su zabeležene u grupi ispitanika kod kojih je lokalno primenjen aktivni kiseonik (grupa III) i grupi ispitanika kod kojih je primenjena probiotska terapija (grupa II) bile statistički značajno niže u odnosu na grupu I kod koje je primenjena samo bazična terapija i grupu IV kod koje je pored bazične terapije primenjena i terapija klindamicinom ($p < 0,05$, Man-Vitnijev). Ovo je dodatno potvrđeno i upoređivanjem prosečnih vrednosti promena ovog indeksa za grupu I i IV sa prosečnim vrednostima promena za preostale dve grupe ($p < 0,05$, Man-Vitnijev test; Tabela 14). Dobijeni rezultati ukazuju na to da primena svih terapijskih procedura dovodi do statistički značajnog smanjenja vrednosti indeksa krvarenja i one su statistički značajno manje u odnosu na vrednosti pre terapije, kao i da su bolji rezultati postignuti primenom bazične terapije u kombinaciji sa probioticima ili aktivnim kiseonikom (Grafikon 5).

Uticaj korišćenog terapijskog protokola na izmerene vrednosti *Ikrv*

Na osnovu gore navedenih rezultata, unutar sve četiri grupe ispitanika, kao i za celokupnu populaciju ispitanika u ovom istraživanju, uočeno je statistički značajno smanjenje indeksa krvarenja tokom celokupnog perioda primene ovih terapijskih protokola u odnosu na vrednosti pre početka terapije ($p < 0,001$).

Pored toga, analizom efekata unutar grupa, pokazano je da sva četiri terapijska protokola pokazuju statistički značajno veliki efekat na promene vrednosti *Ikrv* (grupa I $\eta^2=0,575$; grupa II $\eta^2=0,522$; grupa III $\eta^2=0,517$; grupa IV $\eta^2=0,465$), pa se može zaključiti da je svaki pojedinačni terapijski protokol pokazao značajan efekat na vrednosti indeksa krvarenja za sve ispitanike u svakoj pojedinačnoj grupi u kojoj je taj protokol primenjen (efekat unutar grupa) (Tabela 15).

Tabela 15. Uticaj primenjenog terapijskog protokola na izmerene vrednosti *Ikrv* u analiziranim grupama tokom perioda ispitivanja

Izvor odstupanja (variranja zavrednost <i>Ikrv</i>)	Grupa		Efekte unutar grupe	Efekat u odnosu na vrstu terapijskog protokola	Interakcija terapijski protokol x vreme
	I		<i>p</i>	<0,001***	0,015**
		Veličina efekta (η^2)	0,575	0,339	0,225
II		<i>p</i>	<0,001***	0,009**	0,016**
		Veličina efekta (η^2)	0,522	0,395	0,327
III		<i>p</i>	<0,001***	0,007**	0,013**
		Veličina efekta (η^2)	0,517	0,364	0,353
IV		<i>p</i>	<0,001***	0,039**	0,047**
		Veličina efekta (η^2)	0,465	0,238	0,172

** – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$

Daljim testiranjem efekata u odnosu na vrstu primenjenog terapijskog protokola, pokazano je da svi terapijski protokoli imaju statistički značajan efekat na smanjenje vrednosti *Ikrv* (grupa I $\eta^2=0,339$; grupa II $\eta^2=0,395$; grupa III $\eta^2=0,394$; grupa IV $\eta^2=0,238$). Sličan zaključak može se izvesti i kada se uporede efekti primenjenih terapijskih protokola na vrednost *Ikrv* tokom celog perioda njihove primene (grupa I $\eta^2=0,308$; grupa II $\eta^2=0,327$; grupa III $\eta^2=0,353$; grupa IV $\eta^2=0,172$). U periodu od 7-og do 30-og dana terapije u grupi I (bazična terapija) ove promene su bile veoma slične (sličnog trenda) kao i u grupi IV, što je doprinelo da prosečne vrednosti *Ikrv* nakon primenjenih terapijskih protokola budu veoma slične (Tabela 14; $0,82 \pm 0,13$ vs. $0,95 \pm 0,28$) i statistički značajno više u odnosu na grupe II (terapija probioticima) i III (terapija aktivnim O₂) (Tabela 15; $0,18 \pm 0,06$ vs. $0,15 \pm 0,05$).

4.2.3. Parodontalni indeks

4.2.3.1. Parodontalni indeks po Ramfjordu – (Periodontal Disease Index –PDI)

U Tabeli 16 prikazane su prosečne vrednosti parodontalnog indeksa u svim grupama ispitanika pre terapije, 7 i 30 dana nakon terapije, kao i promena ovog parametra 7-og i 30-og dana nakon primene opisanih terapijskih pristupa u okviru odgovarajuće grupe. Vrednosti ovog parametra su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Promena prosečne vrednosti parodontalnog indeksa u svim grupama tokom celog opservacionog perioda predstavljena je na Grafikonu 6.

Tabela 16. Prosečne vrednosti *PDI* u kontrolnoj grupi i terapijskim grupama pre, 7 i 30 dana nakon terapije

Period	Bazična terapija (kontrolna grupa) (grupa I)	Bazična terapija + probiotska terapija (grupa II)	Bazična terapija + lokalna primena aktivnog O ₂ (grupa III)	Bazična terapija + terapija klindamicinom (grupa IV)
Pre terapije	5,22 \pm 0,56 ^A	5,30 \pm 0,46 ^A	5,22 \pm 0,50 ^A	5,27 \pm 0,51
Sedam dana nakon terapije	5,19 \pm 0,46	5,25 \pm 0,47	5,17 \pm 0,45	5,25 \pm 0,45
Mesec dana nakon terapije	4,52 \pm 0,36 ^{E,F}	4,08 \pm 0,22	3,95 \pm 0,31	5,22 \pm 0,27 ^{B,C,D}
Prosečna razlika (početak vs 7. dan)	0,04 \pm 0,003	0,05 \pm 0,005	0,05 \pm 0,002	0,02 \pm 0,001
Prosečna razlika (početak vs 30. dan)	0,70 \pm 0,12 ^{E,F}	1,22 \pm 0,19	1,27 \pm 0,17	0,05 \pm 0,005 ^{B,C,D}

A: pre terapije vs 30 dana nakon terapije; (**p<0,001, Vilkinsonov test ranga**);

B: bazična+terapija klindamicinom vs bazična terapija;

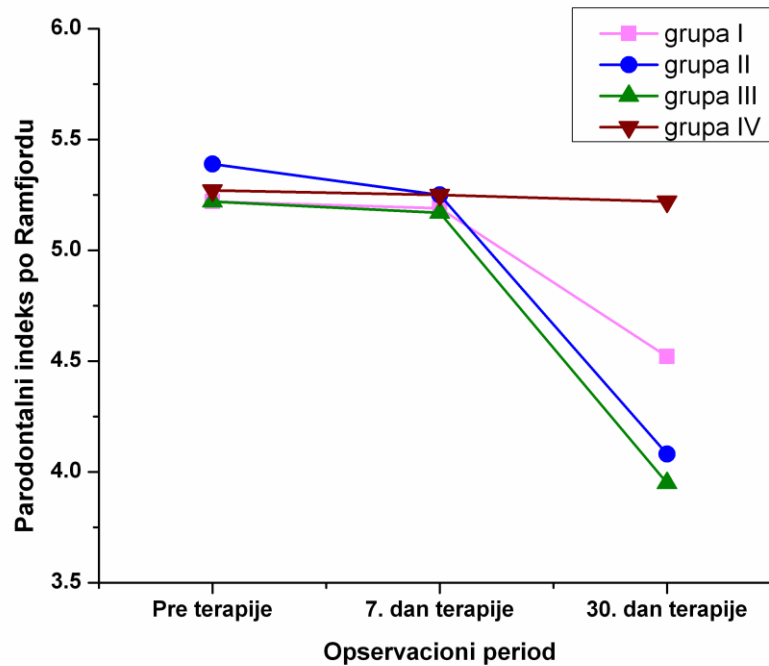
C: bazična+terapija klindamicinom vs bazična+probiotska terapija;

D: p<0,05 bazična+terapija klindamicinom vs bazična+terapija aktivnim O₂;

E: bazična terapija vs bazična+probiotska terapija;

F: bazična terapija vs bazična+terapija aktivnim O₂; (**p<0,05, Man-Vitnijev test**).

Upoređujući prosečne vrednosti parodontalnog indeksa u sve četiri ispitivane grupe pre primenjivanih odgovarajućih terapijskih pristupa (protokola), primenom Man-Vitnjevog testa utvrđeno je da se vrednosti ovog parametra nisu statistički značajno razlikovale ($p>0,05$).



Grafikon 6. Promena prosečnih vrednosti PDI u svim grupama ispitanika tokom celog opsrevacionog perioda (pre terapije, 7-og i 30-og dana tokom primene terapije)

Sedam dana nakon početka terapijskih protokola, korišćenjem Vikoksonovog testa, u svim posmatranim grupama nije zabeleženo statistički značajno smanjenje prosečne vrednosti ovog parametra u odnosu na prosečne vrednosti pre početka terapije ($p>0,05$). Takođe, dobijene prosečne vrednosti u svim grupama nakon sedmodnevne terapije vrednosti nisu se međusobno statistički značajno razlikovale (Man-Vitnjev test, $p>0,05$).

Daljim upoređivanjem prosečnih vrednosti pre i nakon mesec dana od početka navedenih terapijskih protokola, u grupama I, II i III je utvrđena statistički značajno niža vrednost ovog parametra nakon mesec dana terapije ($p < 0,001$) (Tabela 16). Takođe, značajno je istaći da su mesec dana nakon sprovedenih terapijskih pristupa prosečne vrednosti parodontalnog indeksa koje su zabeležene u grupi ispitanika kod kojih je lokalno primenjen aktivni kiseonik (grupa III; $3,95 \pm 0,31$) i grupi ispitanika kod kojih je primenjena probiotska terapija (grupa II; $4,08 \pm 0,22$) bile statistički značajno niže u odnosu na grupu I ($4,52 \pm 0,36$) kod koje je primenjena samo bazična terapija i grupu IV ($5,22 \pm 0,27$) kod koje je pored bazične terapije primenjena i terapija klindamicinom ($p < 0,05$, Man-Vitnijev test) (Grafikon 6). Ovo je dodatno potvrđeno i upoređivanjem prosečnih vrednosti promena ovog indeksa za grupu II i III sa prosečnim vrednostima promena za preostale dve grupe ($p < 0,05$, Man-Vitnijev test; Tabela 16). Dobijeni rezultati ukazuju na to da primena bazične terapije samostalno ili u kombinaciji sa probioticima ili aktivnim kiseonikom dovodi do statistički značajnog smanjenja vrednosti parodontalnog indeksa i one su statistički značajno manje u odnosu na vrednosti pre terapije (Tabela 16).

Uticaj korišćenog terapijskog protokola na izmerene vrednosti *PDI*

Na osnovu gore navedenih rezultata (Tabela 16), uočeno je statistički značajno smanjenje vrednosti parodontalnog indeksa u prve tri grupe ispitanika u periodu od 7-og do 30-og dana primene ovih terapijskih protokola u odnosu na vrednosti pre početka terapije ($p < 0,001$).

Praćenjem efekata unutar grupa utvrđeno je da postoji statistički značajna promena vrednosti *PDI* u prve tri grupe. Za prve dve grupe ovaj efekat se može smatrati srednjim, ali značajnim ($\eta^2 > 0,01$ i $\eta^2 < 0,14$) (grupa I $\eta^2 = 0,066$; grupa II $\eta^2 = 0,127$), dok je terapijski protokol iz treće grupe pokazao veliki efekat na promene vrednosti parodontalnog indeksa među ispitanicima u toj grupi i ovaj efekat se na osnovu dobijene vrednosti može smatrati izraženijim ($\eta^2 > 0,14$) (grupa III $\eta^2 = 0,155$) (Tabela 17).

Takođe, praćen je i efekat vrste primenjenog terapijskog protokola koji bi utvrdio da li postoji statistička značajnost u promeni vrednosti parodontalnog indeksa u zavisnosti od vrste primenjenog terapijskog protokola. Rezultati ovog testiranja su pokazali statistički značajan uticaj primenjenih terapijskih protokola u prve tri grupe na smanjenje vrednosti *PDI* (grupa I $\eta^2=0,158$; grupa II $\eta^2=0,196$; grupa III $\eta^2=0,229$).

Veoma slično kao i kod analize efekata terapijskih protokola u prethodnom pasusu, upoređujući efekte primenjenih terapijskih protokola na vrednost *PDI* tokom celog perioda njihove primene (grupa I $\eta^2=0,155$; grupa II $\eta^2=0,218$; grupa III $\eta^2=0,327$; grupa IV $\eta^2=0,0037$) dolazi se do zaključka da su prva tri terapijska protokola pokazala relativno visoki uticaj smanjenja vrednosti parodontalnog indeksa tokom celog perioda primene terapija.

Pored toga, možemo zaključiti da su ove statistički značajne promene vrednosti *PDI* u prve tri grupe naizraženije u periodu od 7-og do 30-og dana terapije kada i dolazi do daljeg smanjenja ovog parametra (Tabela 16) i da se po prosečnim vrednostima tih promena mogu uporediti sledećim redosledom grupa III>grupa II>grupa I (Tabela 17).

Tabela 17. Uticaj primenjenog terapijskog protokola na izmerene vrednosti *PDI* u analiziranim grupama tokom perioda ispitivanja

Izvor odstupanja, (variranja) za <i>PDI</i>	Grupa		Efekte unutar grupe	Efekat u odnosu na vrstu terapijskog protokola	Interakcija terapijski protokol x vreme	
	I	<i>p</i>		0,048**	0,039**	0,036**
		Veličina efekta (η^2)		0,066	0,158	0,155
	II	<i>p</i>		0,039**	0,025**	0,017**
		Veličina efekta (η^2)		0,127	0,196	0,218
	III	<i>p</i>		0,036**	0,018**	0,007**
		Veličina efekta (η^2)		0,155	0,229	0,327
	IV	<i>p</i>		0,533	0,723	0,764
		Veličina efekta (η^2)		0,008	0,0052	0,0037

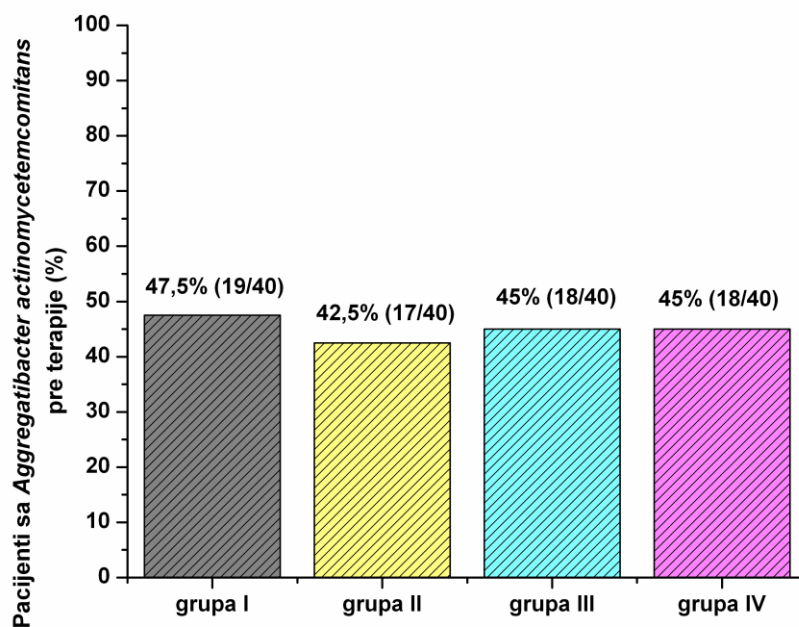
** – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$

4.3. Mikrobiološki parametri

U ovoj studiji PCR tehnikom vršeno je detektovanje sledećih vrsta bakterija pre i 30 dana nakon terapije hronične parodontopatije: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Tannerella forsythensis* (*T. forsythensis*) i *Treponema denticola* (*T. denticola*).

4.3.1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans je izolovana u sve četiri grupe ispitanika pre terapije i njena zastupljenost u ovim grupama se kretala u interval od 42,5% do 47,5% (Grafikon 7).



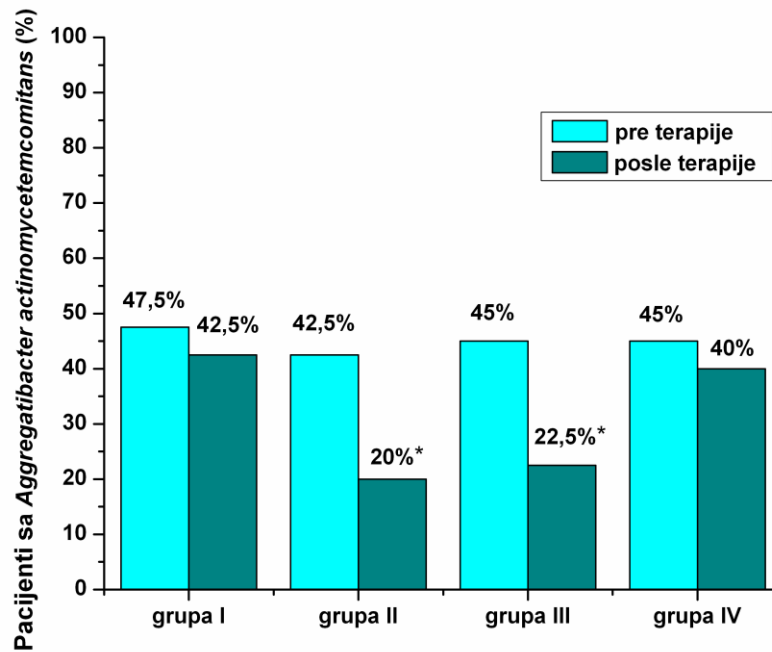
Grafikon 7. Pacijenti u terapijskim grupama sa pozitivnim nalazom na patogenu bakteriju *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pre terapije

Nakon sprovedenih terapijskih protokola statistički značajna redukcija zastupljenosti ove bakterije ($p < 0.05$) (Tabela 18), postignuta je u grupama kod kojih je pored bazične terapije parodontopatije primenjena i lokalna terapija probiotikom i aktivnim kiseonikom (grupe II i III; od 42,5% na 20% u II grupi dok je u trećoj grupi redukcija bila sa 45% na 22,5%), u IV grupi ispitanika, u kojoj je pored bazične terapije lokalno primenjen i klindamicin gel, nije došlo do statistički značajne redukcije zastupljenosti ove bakterije (sa 45% na 40%) (Grafikon 8).

Tabela 18. Pozitivnost rezultata na patogenu bakteriju *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pre i posle terapije u ispitivanim grupama (vrednosti su izražene u % (pozitivni nalazi/broj ispitanika u grupi))

Period	Bazična terapija (kontrolna grupa) (grupa I)	Bazična terapija + probiotska terapija (grupa II)	Bazična terapija + lokalna primena aktivnog O ₂ (grupa III)	Bazična terapija + terapija klindamicinom (grupa IV)
Pre terapije	47,5% (19/40)	42,5% (17/40)	45% (18/40)	45% (18/40)
Mesec dana nakon terapije	42,5% (17/40)	20% (8/40) ^A	22,5% (9/40) ^A	40% (16/40)

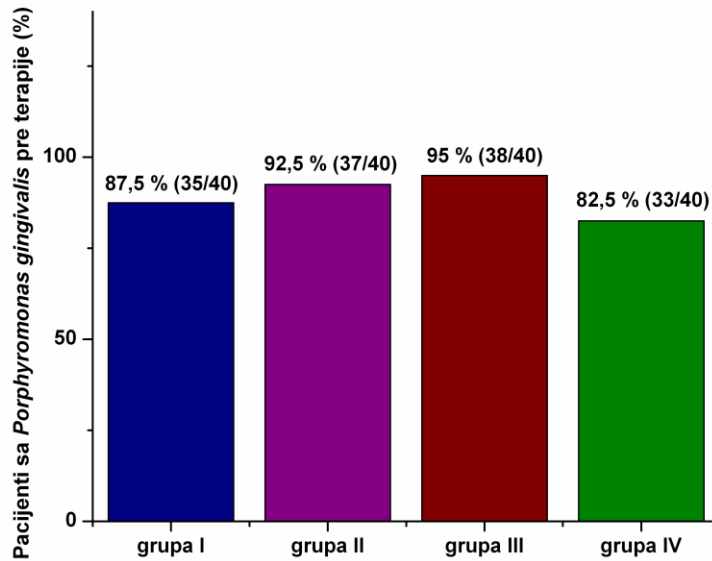
A: pre terapije vs 30 dana nakon terapije; ($p < 0,05$)



Grafikon 8. Pacijenti u terapijskim grupama sa pozitivnim nalazom na patogenu bakteriju *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pre i posle terapije (*-p<0,05)

4.3.2. *Porphyromonas gingivalis*

Prisustvo bakterije *P. gingivalis* detektovano je u svim grupama ispitanika pre terapije. Ovaj parodontopatogen izolovan je u rasponu od 82,5% do 95% unutar analiziranih grupa (Grafikon 9).



Grafikon 9. Pacijenti u terapijskim grupama sa pozitivnim nalazom na patogenu bakteriju *Porphyromonas gingivalis* pre terapije

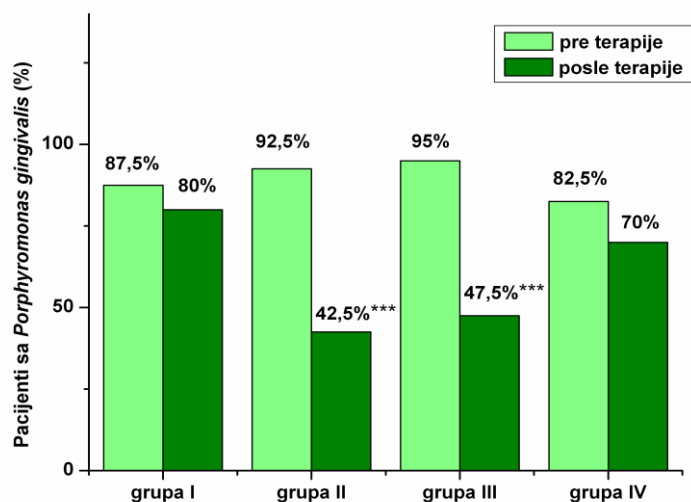
Nakon sprovedene terapije statistički značajno smanjenje prisustva ove bakterije zabeleženo je u II grupi ispitanika (od 92,5% na 42,5%), gde su pored bazične terapije parodontopatije lokalno primenjene i probiotske bakterije ($p < 0,001$). U III grupi ispitanika, gde je pored bazične terapije lokalno primenjen i aktivni kiseonik u parodontalne džepove, zabeležen je pad *P. gingivalis*-a sa 95% na 47,5% što je takođe predstavljalo statistički značajnu redukciju ovog parodontopatogena ($p < 0,001$) (Tabela 19).

Tabela 19. Pozitivnost rezultata na patogenu bakteriju *Porphyromonas gingivalis* pre i posle terapije u ispitivanim grupama (vrednosti su izražene u % (pozitivni nalazi/broj ispitanika u grupi))

Period	Bazična terapija (kontrolna grupa) (grupa I)	Bazična terapija + probiotska terapija (grupa II)	Bazična terapija + lokalna primena aktivnog O ₂ (grupa III)	Bazična terapija + terapija klindamicinom (grupa IV)
Pre terapije	87,5% (35/40)	92,5% (37/40)	95% (38/40)	82,5% (33/40)
Mesec dana nakon terapije	80% (25/40)	42,5% (17/40) ^C	47,5% (19/40) ^C	70% (28/40)

C: pre terapije vs 30 dana nakon terapije; (p<0,001)

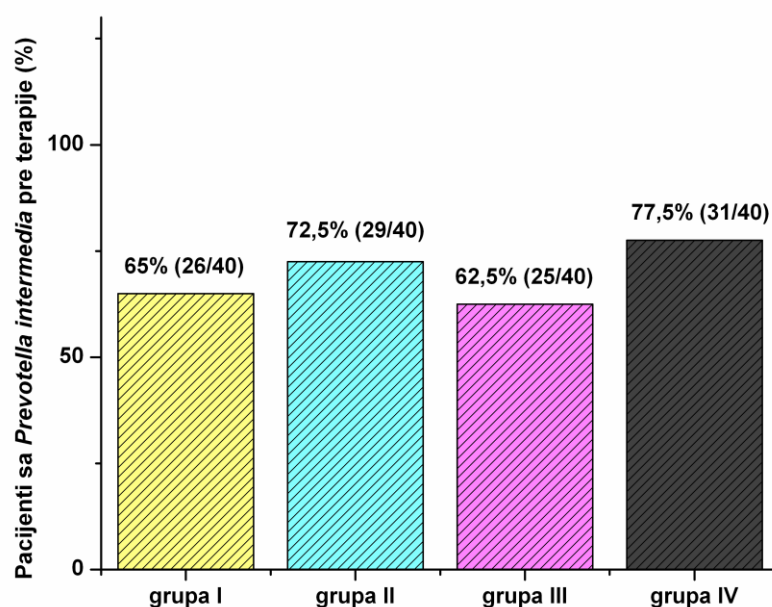
U IV grupi ispitanika, gde je pored bazične terapije primenjen klindamicin gel u paradontalne džepove, nije došlo do statistički značajne redukcije zastupljenosti *Porphyromonas gingivalis-a* (Grafikon 10). Ovakav nalaz je veoma sličan nalazu u kontrolnoj, prvoj grupi ispitanika, gde je primenjena samo bazična terapija.



Grafikon 10. Pacijenti u terapijskim grupama sa pozitivnim nalazom na patogenu bakteriju *Porphyromonas gingivalis* pre i posle terapije (***- p<0,001)

4.3.3. *Prevotella intermedia*

Procenat zastupljenosti bakterije *P. intermedia* u ovom istraživanju pre terapije kretao se u intervalu od 62,5% do 77,5%, unutar ispitivanih grupa (Grafikon 11).



Grafikon 11. Pacijenti u terapijskim grupama sa pozitivnim nalazom na patogenu bakteriju *Prevotella intermedia* pre terapije

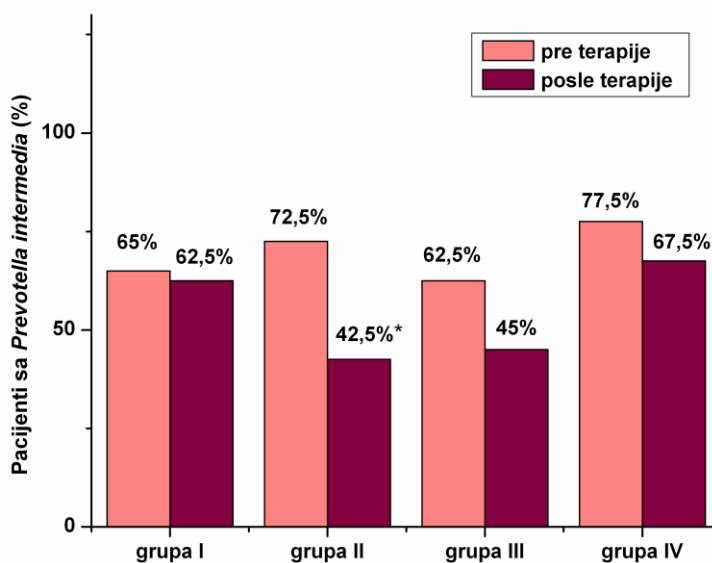
Statistički signifikantno smanjenje ($p < 0,05$) procenta zastupljenosti ove bakterije nakon terapije zabeleženo je u grupama sa kombinovanom bazičnom i probiotskom terapijom (sa 72,5% na 42,5%), kao i u grupi gde je pored bazične terapije lokalno primenjen i aktivni kiseonik (sa 62,5% na 45%) (Tabela 20).

Tabela 20. Pozitivnost rezultata na patogenu bakteriju *Prevotella intermedia* pre i posle terapije u ispitivanim grupama (vrednosti su izražene u % (pozitivni nalazi/broj ispitanika u grupi))

Period	Bazična terapija (kontrolna grupa) (grupa I)	Bazična terapija + probiotska terapija (grupa II)	Bazična terapija + lokalna primena aktivnog O ₂ (grupa III)	Bazična terapija + terapija klindamicinom (grupa IV)
Pre terapije	65% (26/40)	72,5% (29/40)	62,5% (25/40)	77,5% (31/40)
Mesec dana nakon terapije	62,5% (25/40)	42,5% (17/40) ^A	45% (18/40)	67,5% (27/40)

A: pre terapije vs 30 dana nakon terapije; ($p < 0,05$)

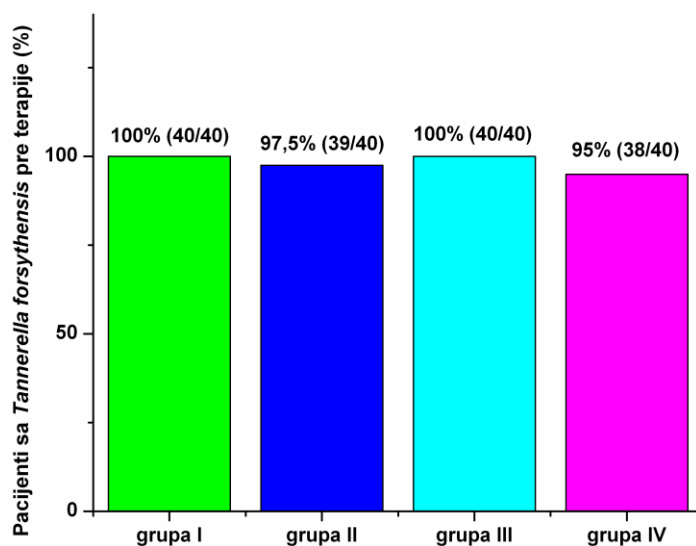
U IV grupi ispitanika, gde je pored bazične terapije primenjen klindamicin gel u parodontalne džepove, nije došlo do statistički značajne redukcije zastupljenosti ove bakterije. Ovakav nalaz je veoma sličan nalazu u kontrolnoj, prvoj grupi ispitanika, gde je primenjena samo bazična terapija (Grafikon 12).



Grafikon 12. Pacijenti u terapijskim grupama sa pozitivnim nalazom na patogenu bakteriju *Prevotella intermedia* pre i posle terapije (*- $p < 0,05$)

4.3.4. *Tannerella forsythensis*

U ovoj studiji, *T. forsythensis* je bila najzastupljenija u svim grupama ispitanika pre terapije i to gotovo kod svih ispitanika (raspon zastupljenosti u ispitivanim grupama kretao se od 95% do 100%) (Grafikon 13).



Grafikon 13. Pacijenti u terapijskim grupama sa pozitivnim nalazom na patogenu bakteriju *Tannerella forsythensis* pre terapije

Značajna redukcija zastupljenosti ovog parodontopatogena registrovana je u grupi ispitanika u kojoj je pored bazične terapije primenjena lokalna terapija probioticima (sa 97,5% na 35%) i u grupi u kojoj je primenjena i lokalna terapija aktivnim kiseonikom (sa 100% na 47,5%), dok je u grupi sa bazičnom terapijom registrovana manja redukcija zastupljenosti ove bakterije (Tabela 21).

Tabela 21. Pozitivnost rezultata na patogenu bakteriju *Tannerella forsythensis* pre i posle terapije u ispitivanim grupama (vrednosti su izražene u % (pozitivni nalazi/broj ispitanika u grupi))

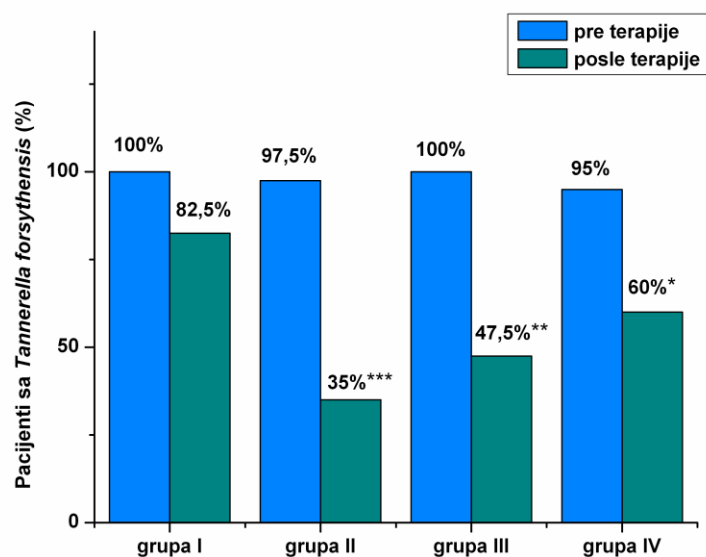
Period	Bazična terapija (kontrolna grupa) (grupa I)	Bazična terapija + probiotska terapija (grupa II)	Bazična terapija + lokalna primena aktivnog O ₂ (grupa III)	Bazična terapija + terapija klindamicinom (grupa IV)
Pre terapije	100% (40/40)	97,5% (39/40)	100% (40/40)	95% (38/40)
Mesec dana nakon terapije	82,5% (33/40)	35% (14/40) ^C	47,5% (19/40) ^B	60% (24/40) ^A

A: pre terapije vs 30 dana nakon terapije; ($p < 0,05$);

B: pre terapije vs 30 dana nakon terapije; ($p < 0,01$);

C: pre terapije vs 30 dana nakon terapije; ($p < 0,001$)

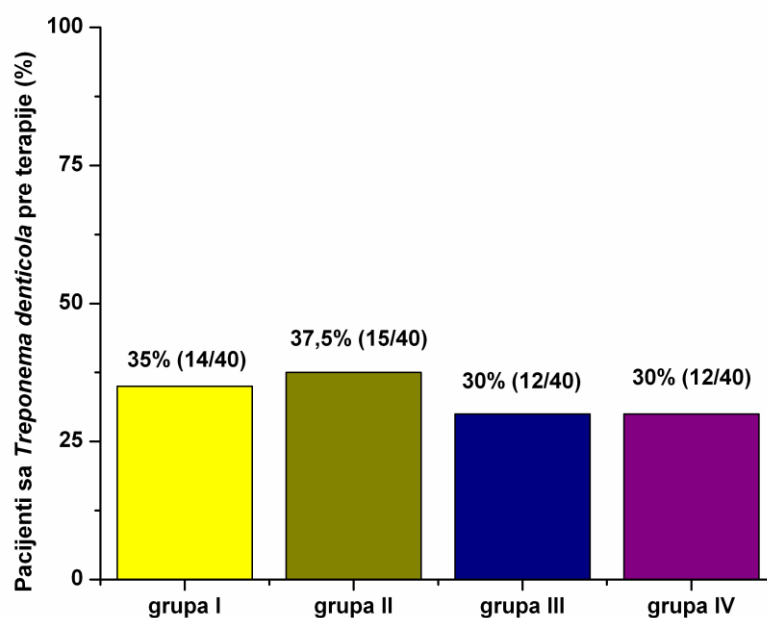
U grupi ispitanika sa lokalno primenjenim klindamicin gelom takođe je pokazana statistički značajna redukcija zastupljenosti ovog parodontopatogena, ali procentualno manja u odnosu na grupe sa primenjenim probiotikom i aktivnim kiseonikom (Grafikon 14).



Grafikon 14. Pacijenti u terapijskim grupama sa pozitivnim nalazom na patogenu bakteriju *Tannerella forsythensis* pre i posle terapije (*- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$)

4.3.5. *Treponema denticola*

T. denticola je, u ovom istraživanju, pre terapije bila registrovana u svim grupama ispitanika, ali u najmanjem procentu od svih prethodno ispitivanih bakterija. Njena zastupljenost se kretala u opsegu od 30% do 37,5% (Grafikon 15).



Grafikon 15. Pacijenti u terapijskim grupama sa pozitivnim nalazom na patogenu bakteriju *Treponema denticola* pre terapije

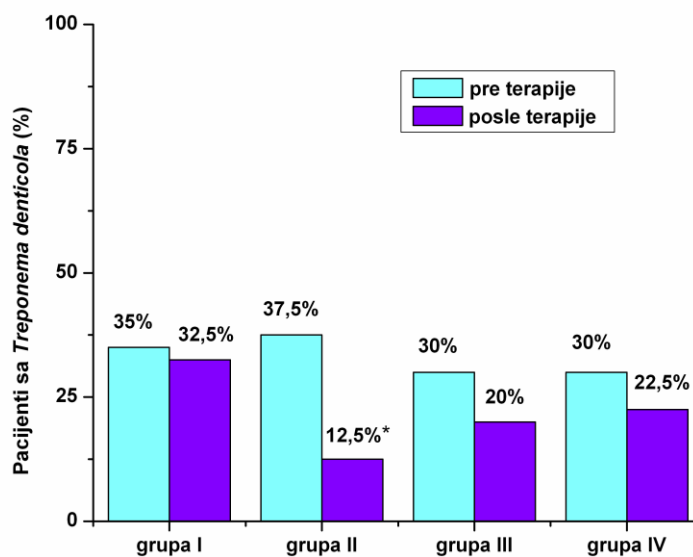
Nakon terapije, statistički značajno smanjenje zabeleženo je samo u II grupi ispitanika u kojoj je pored bazične terapije bila primenjena i lokalna terapija probiotskih bakterija ($p < 0,05$). (Tabela 22, Grafikon 15).

Tabela 22. Pozitivnost rezultata na patogenu bakteriju *Treponema denticola* pre i posle terapije u ispitivanim grupama (vrednosti su izražene u % (pozitivni nalazi/broj ispitanika u grupi))

Period	Bazična terapija (kontrolna grupa) (grupa I)	Bazična terapija + probiotska terapija (grupa II)	Bazična terapija + lokalna primena aktivnog O ₂ (grupa III)	Bazična terapija + terapija klindamicinom (grupa IV)
Pre terapije	35% (14/40)	37,5% (15/40)	30% (12/40)	30% (12/40)
Mesec dana nakon terapije	32,5% (13/40)	12,5% (5/40) ^A	20% (8/40)	22,5% (9/40)

A: pre terapije vs 30 dana nakon terapije; ($p < 0,05$)

U grupama III i IV nije zabeležena statistički značajna redukcija navedenog parodontopatogena, što se bilo veoma slično i sa nalazom u kontrolnoj grupi (Grafikon 16).



Grafikon 16. Pacijenti u terapijskim grupama sa pozitivnim nalazom na patogenu bakteriju *Treponema denticola* pre i posle terapije (*- $p < 0,05$)

5. DISKUSIJA

Savremena istraživanja usmerena su ka pronalaženju novih, neinvazivnih, terapijskih procedura sa ciljem smanjenja i eliminacije uzročnika, kao i ka prevenciji nastanka parodontalne infekcije. Nove terapijske procedure u lečenju hronične parodontopatije umnogome bi doprinele menadžmentu ove bolesti kao i samom ishodu a posledice svele na što manji stepen. U ovoj kliničkoj studiji sprovedeni su terapijski protokoli koji su obuhvatali kombinaciju bazične terapije i lokalnu primenu probiotskih bakterija, lokalnu primenu aktivnog kiseonika kao i lokalnu primenu klindamicin gela kod pacijenata sa dijagnostifikovanom hroničnom parodontopatijom.

Probiotici su danas široko primenjivani u terapiji mnogih bolesti poput hronične dijareje, imunoloških bolesti, alergija, upalnih procesa u digestivnom traktu (211). U poslednje vreme postoji sve veće interesovanje za primenu probiotika za lečenje oralnih infekcija poput karijesa i parodontopatije (172). Međutim, dostupne informacije o uticaju probiotika na zdravlje parodontijuma i dalje su minimalne. Pozitivan efekat probiotskih bakterija, kao i njihova mogućnost adherencije sa sluzokože daju veliku nadu da će se njihovom jednostavnom primenom postići zadovoljavajući efekat u sanaciji inflamacije oralnih tkiva (212).

Oksigenoterapija se danas koristi za mnoga medicinska stanja (213). Efekat aktivnog kiseonika zasniva se na pozitivnom dejstvu kiseonika u ispravljanju narušene smanjene koncentracije kiseonika (hipoksije) u ćelijama i tkivima (179). Osnovna uloga kiseonika je da smanji povoljne uslove za bakterije koje žive i metabolišu se u anaerobnim uslovima, koje su glavni izazivači parodontalnog oboljenja, na taj način što će prisustvo kiseonika u parodontalnim džepovima dovesti do aerobne sredine koja je svakako nepovoljna za većinu parodontopatogenih bakterija.

Sistemske antibiotici ulaze u tkivo parodonta i parodontalni džep preko krvi i efikasni su u lečenju hronične parodontopatije. Glavni nedostatak sistemske primene antibiotika je da samo mali deo od ukupne doze dolazi do subgingivalne mikroflore. Takođe, sistemska primena antibiotika rezultira bakterijskom rezistencijom i često izaziva nus pojave. Lokalna primena antibiotika je, sa druge strane, jednostavnija procedura, postiže se maksimalna koncentracija leka na mestu primene, a nus pojave su svedene na minimum (214).

Unutar svih grupa u ovoj kliničkoj studiji došlo je do statistički značajnog smanjenja vrednosti plak indeksa ($p < 0,001$). Ovakav nalaz je bio očekivan, s obzirom na činjenicu da su svi ispitanici bili obavešteni i obučeni o pravilnom održavanju oralne higijene. Vrednost plak indeksa u svim ispitivanim grupama je bio na vrednosti 0 i sedam dana nakon primenjene terapije. Ovi rezultati su u saglasnosti sa podacima i radovima Buduneli i sar. kao i Quirynen i sar. (215, 216).

Što se tiče indeksa zubnog kamenca i indeksa konkremenata nakon 5. terapijske procedure, u svim terapijskim grupama vrednosti ovog parametra su svedene na nulu, a na tom nivou su ostale i sedam dana posle terapije.

U ovoj kliničkoj studiji u svim ispitivanim grupama došlo je do statistički značajnog smanjenja inflamacije gingive izraženo kroz gingivalni indeks u odnosu na rezultat pre terapije ($p < 0,001$). Sedam dana nakon primenjene terapije u II i III grupi ispitanika, gde su pored bazične terapije lokalno primenjene probiotske bakterije odnosno aktivni kiseonik nije došlo do pogoršanja vrednosti gingivalnog indeksa. Poređenjem vrednosti gingivalnih indeksa između grupa utvrđeno je da su vrednosti ovog parametra statistički značajno niže u grupama sa kombinovanom bazičnom terapijom i lokalnom primenom probiotskih bakterija (II grupa) i u grupi gde je primenjena bazična terapija i lokalno primenjen aktivni kiseonik (III) nego u grupi koja je imala samo bazičnu terapiju posle 5. terapije ($p < 0,01$) ali i sedam dana nakon terapije ($p < 0,01$). Nameće se konstatacija da su sve tri terapijske procedure nakon 5. terapije dovele do statistički značajnog poboljšanja gingivalnih indeksa, kao i da su najbolji rezultati postignuti kombinacijom bazične terapije i lokalne terapije probiotskih bakterija i aktivnog kiseonika odnosno u II i III grupi ispitanika.

Kao i u ovom istraživanju Vivekananda i sar. ističu da je lokalna primena probiotika kod pacijenata sa hroničnom parodontopatijom dovela do smanjenja gingivalnog indeksa u ispitivanoj grupi ($p < 0.05$). Istraživači takođe navode da je primena probiotika, kod ovih pacijenata, dovela do signifikantke redukcije zastupljenosti *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* i *P. intermedia* (217). U svom radu Teughels i sar. su takođe potvrdili da je došlo do znatnog smanjenja stepena inflamacije, kod pacijenata kod kojih je nakon bazične terapije primenjena i terapija probiotskim bakterijama. Oni su pored toga naveli i da je u grupi u kojoj su pacijenti bili podvrgnuti i terapiji probioticima, došlo do redukcije dubine parodontalnih džepova kao da je primećena redukcija *P. gingivalis* ($p < 0.05$) (218). Tekce i sar. sproveli su kontrolisanu, dvostruko slepu, studiju kako bi procenili efekat probiotskih pastila. U obe grupe je prvo sprovedena bazična terapija a u ispitivanoj grupi su primenjene probiotske pastile u trajanju od tri nedelje.

Rezultati su pokazali da su indeksi oralne higijene ali gingivalni indeksi bili niži u ispitivanoj grupi u poređenju sa kontrolnom grupom u kojoj je bila primenjena samo bazična terapija parodontopatije ($p < 0.05$) (219).

Ramzy i sar. su primenjivali ozoniranu vodu plasiranu u parodontalne džepove kod pacijenata sa hroničnom parodontopatijom. U odnosu na kontrolnu grupu, gde su pacijenti bili podvrgnuti samo bazičnoj terapiji parodontopatije, uočili su značajno niže vrednosti plak indeksa i gingivalnog indeksa u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe su zabeležili i smanjenje parodontopatogenih bakterija na mestima koja su tretirana ozoniranom vodom (220). Kshitish i Laxman sproveli su randomizovanu, dvostruko slepu, unakrsnu studiju na 16 pacijenata, podeljenih u dve grupe, koji su bolovali od generalizivane, hronične parodontopatije. Studija je trajala 18 dana. Parodontalni džepovi u kontrolnoj grupi bili su tretirani 0.2 % hlorheksidinom a u ispitivanoj grupi su parodontalni džepovi bili, subgingivalno, ispirani tečnim ozonom u dva vremenska intervala, prvi u trajanju od 7 dana i drugi, nakon pauze od 4 dana, u naredna 7 dana. Istraživači su primetili veći procenat smanjenja plak indeksa (12%), gingivalnog indeksa (29%), indeksa krvarenja (26%) u grupi u kojoj je primenjen tečni ozon u odnosu na grupu gde je primenjen hlorheksidin (221).

Slično rezultatima ovog istraživanja Pejčić i sar. su potvrdili da je došlo do znatnog smanjenja stepena inflamacije, kod pacijenata kod kojih je nakon primenjene bazične terapije parodontopatije primenjena i lokalna terapija 2% klindamicin gelom merenjem gingivalnih indeksa (222). Thomas P. Johnston i sar. sprovedli su kliničko istraživanje na psima sa ciljem utvrđivanja efikasnosti 2% klindamicin hidrohlorid gela u lečenju hronične parodontopatije. Ova klinička studija dokazala je da je postojalo statistički značajno smanjenje gingivalnog indeksa (16%), kao i broja mesta krvarenja (64%) kod pasa koji su bili lokalno tretirani klindamicin gelom (223).

U ovoj kliničkoj studiji vršena je i procena vrednosti PDI indeksa pre terapije u svim grupama ispitanika i 30 dana nakon terapije.

Rezultati ove doktorske disertacije, 30 dana nakon sprovedene terapije, pokazali su da su vrednosti ovog parametra statistički niži u grupi sa kombinovanom bazičnom terapijom i lokalno primenjenim probiotskim bakterijama (grupa II), i u grupi gde je kombinovana bazična terapija i aktivni kiseonik (grupa III) u odnosu na kontrolnu grupu gde je primenjena samo bazična terapija (grupa I) ($p < 0.05$). Objavljeno je nekoliko naučnih radova koji su imali za cilj da istraže dostupne kliničke dokaze o efikasnosti terapije probioticima kod pacijenata obolelih od hronične parodontopatije.

Studija Matsubara i sar. pokazala je da je došlo do redukcije vrednosti PDI indeksa u grupi koja je kao dodatak terapije hronične parodontopatije imala i lokalnu primenu probiotika u odnosu na kontrolnu grupu koja je lečena samo bazičnom terapijom parodontopatije (224). Slično ovim rezultatima studija Martin-Cabezasa i sar. dokazala je smanjenje dubine parodontalnog džepa za 1,31–1,74 mm u grupi ispitanika u kojoj je primenjena terapija probioticima u odnosu na kontrolnu grupu, gde je primenjena samo bazična terapija parodontopatije i u kojoj je smanjenje dubine parodontalnog džepa na sondiranje iznosilo 0,49–1,39 mm (225). Navedeni autori su zaključili da se lokalno primenjena terapija probioticima kao dodatak bazičnoj terapiji može smatrati efikasnijom u terapiji hronične parodontopatije u odnosu na samo bazičnu terapiju. Takođe su naveli da bi primena probiotika u terapiji parodontopatije generalno smanjila upotrebu antibiotika u lečenju ovih pacijenata (226, 227).

Različiti mehanizmi delovanja, lokalno primenjenih probiotika, mogli bi da objasne njihov pozitivan efekat u terapiji hronične parodontopatije. Dokazano je njihovo dejstvo na modulaciju imunskog sistema domaćina kako lokalno tako i sistemski (228). Probiotici stimulišu dentritične ćelije (antigen prezentujuće ćelije), što rezultira ekspresijom Th1 i Th2 ćelija (T helper ćelija 1 i 2) koje će izvršiti modulaciju imunskog odgovora domaćina. Probiotici povećavaju urođeni imunitet i modeluju upalu izazvanu putem “Toll like” receptora na dentritičnim ćelijama. Intraćelijski patogeni bivaju fagocitovani od strane Th1 ćelija, a vanćelijski patogeni bivaju fagocitovani od strane Th2 ćelija (229).

Apoptoza je još jedan predloženi mehanizam. Probiotici stimulišu apoptozu tumorskih ćelija formiranjem krajnjih proizvoda (230). Takođe je objavljeno da probiotske bakterije inhibiraju apoptozu mukoznih ćelija (231). Navodi se da probiotici imaju zaštitnu ulogu epitelne barijere održavanjem ekspresije proteina čime sprečavaju apoptozu mukozne membrane (232).

Pod dejstvom probiotske bakterije *Lactobacillus reutri* dolazi do smanjenja proupalnih citokina u gingivalnom cervikalnom fluidu kod pacijenata sa hroničnom parodontopatijom što se smatra veoma važnim mehanizmom dejstva probiotika kod ovih pacijenata (233).

Lactobacillus salivaris i *Lactobacillus gasseri*, dve veoma zastupljene probiotske bakterije, pokazuju snažnu inhibiciju parodontopatogenih bakterija (132). Izlučivanje bakteriocina pomoću *Lactobacillus reutri*, pokazuje inhibiciju rasta parodontopatogenih bakterija, a pored toga pokazuje i protivupalno dejstvo inhibicijom proinflamatornih medijatora (135).

U ovoj kliničkoj studiji vrednosti PDI indeksa merena su i u grupi pacijenata koji su kao dodatak bazičnoj terapiji imali i lokalnu primenu aktivnog kiseonika u parodontalne džepove. Studija je pokazala da je nakon mesec dana od primenjene terapije došlo do redukcije dubine parodontalnih džepova ($p < 0.05$).

Sabatini i sar. dokazali su u svojoj studiji da je grupa ispitanika, u kojoj je primenjen aktivni kiseonik pod pritiskom u parodontalne džepove, nakon sprovedene bazične terapije, pokazala statistički značajno smanjenje PDI indeksa u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika u kojoj je primenjena samo bazična terapija. Ispitivana grupa je nakon 6 nedelja pokazala smanjenje dubine parodontalnog džepa za 1,9 mm, dok je u kontrolnoj grupi smanjenje bilo za 1,3 mm (234). Literaturni podaci su pokazali da kod inicijalne dubine parodontalnih džepova od 4 do 6 mm prosečna redukcija dubine džepova iznosi 1,29 mm dok kod početne dubine džepova preko 7 mm prosečna redukcija iznosi 2,16 mm (235, 236).

Postoji nekoliko mogućih mehanizama koji mogu da objasne pozitivan efekat lokalno primenjenog aktivnog kiseonika u lečenju parodontopatije. Kiseonik ima antiedematozno dejstvo. Poznato je da se edemi obično formiraju nakon trauma tkiva i nastaju zbog cikličnog mehanizma “trauma-edem-hipoksija-vazodilatacija-edem”. Kiseonik primenjen lokalno prekida ovaj ciklični mehanizam izazivajući ćelijsku vazokonstrikciju i na taj način povećava venski protok što rezultira eliminaciju limfe. U parodontalnom polju, ovaj aspekt doprinosi većoj stabilnosti slobodnih ivica parodontalnog džepa. Primenjeni kiseonik u parodontalne džepove dovodi do oslobađanja faktora rasta vaskularnog endotela što je od suštinskog značaja za obnavljanje mikrocirkulacije i ponovnog uspostavljanja vaskularnog protoka (237-239).

Shoukheba i sar. vršili su ispitivanje na 30 pacijenata, obolelih od hronične parodontopatije, podeljenih u dve grupe. Prva grupa ispitanika je činila kontrolnu grupu i oni su bili podvrgnuti samo bazičnoj terapiji parodontopatije, druga grupa ispitanika je pored bazične terapije bila podvrgnuta i lokalnoj primeni kiseoničnog gela.

Rezultati ovog istraživanja su jasno pokazali da je nakon 21-og dana od primenjene terapije došlo do statistički značajnog smanjenja vrednosti svih indeksa uključujući i PDI indeks ($p > 0,05$). Poboljšanje svih kliničkih parametara u ispitivanoj grupi detektovano je i nakon 6 meseci od inicijalne terapije ($P < 0,05$) (240).

Autori smatraju da je došlo do ovako pozitivnih rezultata u ispitivanoj grupi zbog moćnog antibakterijskog efekta kiseonika koji se primarno ogleda u činjenici da kiseonik dovodi do poremećaja integriteta bakterijske, fosfolipidne membrane (241). Pored toga, inhibitorni efekat kiseonika na sistem "NF-kappaB" čini ga snažnim protivupalnim sredstvom koje može zaustaviti aktivnost bolesti (242). Nekoliko kliničkih studija sa istom ili sličnom metodologijom primene kiseonika u terapiji hronične parodontopatije došlo je do sličnih rezultata koji govore u prilog statistički značajnog smanjenja kliničkih parametara i poboljšanja kliničke slike parodontopatije (243-245).

U ovoj studiji nije došlo do statistički značajnog smanjenja PDI indeksa u grupi pacijenata kod kojih je pored bazične terapije bila primenjena i lokalna terapija klindamicin gelom. Autori Pejčić i sar. došli su do statistički značajnog poboljšanja u vrednostima PDI indeksa 3 meseca nakon lokalno primenjene terapije klindamicin gela u parodontalne džepove ($p < 0,05$). Šest meseci nakon inicijalnog tretmana pacijenata u ispitivanoj grupi zabeleženi su statistički značajni rezultati u odnosu na kontrolnu grupu u kojoj je primenjena samo bazična terapija (222). Studija iz 2011.godine sprovedena na psima ukazuje da lokalna primena 2% klindamicin hidrohlorid gela ima terapijski efekat u lečenju hronične parodontopatije. U ovoj studiji dokazano je da je nakon 3 meseca od inicijalne terapije došlo do redukcije dubine parodontalnog džepa za 19% u odnosu na kontrolnu grupu koja je bila tretirana samo bazičnom terapijom (223).

Pozitivan terapijski efekat klindamicin hidrohlorida poznat je decenijama. Klindamicin deluje tako što inhibira sintezu protein u bakterijskim ćelijama (246). Smatra se da je mesto vezivanja 50s ribozomalna subjedinica. Uspostavljanjem veze između klindamicina i ribozoma sprečava se vezivanje aminokiselina. Ova reakcija izaziva nepovratnu modifikaciju proteinskih subcelularnih elemenata na nivou ribozoma. Takođe je dokazano da klindamicin smanjuje biosintezu bakterijske kapsule, čineći bakterije podložnije fagocitozi (247).

Klindamicin ima visok stepen *in vitro* aktivnosti protiv različitih fakultativnih i strogo anaerobnih bakterija (248). Klindamicin je jedini dokazani antibiotik koji smanjuje prijanjanje bakterija za epitelne ćelije na površini mukoze i inhibira faktore virulencije (249). Svi navedeni mehanizmi delovanja klindamicina govore u prilog tezi da je klindamicin hidrohlorid veoma potentan antibiotik koji se može koristiti u lečenju hronične parodontopatije.

U ovoj doktorskoj disertaciji *PCR* tehnikom vršeno je otkrivanje sledećih vrsta bakterija pre i posle terapije hronične parodontopatije: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Tannerella forsythensis* (*T. forsythensis*) i *Treponema denticola* (*T. denticola*).

A. actinomycetemcomitans bila je zastupljena u sve četiri grupe ispitanika pre terapije i to u opsegu od 42,5% do 47,5%. Nakon sprovedenih terapijskih protokola, statistički značajna redukcija (preko 20% u odnosu na početnu zastupljenost) ($p < 0,05$) postignuta je u grupama kod kojih je pored bazične terapije parodontopatije primenjena i lokalna terapija probiotikom i aktivnim kiseonikom (grupe II i III).

A. actinomycetemcomitans pored sposobnosti produkcije enzima koji vrše direktna lokalna oštećenja parodontalnog tkiva, raspolaže faktorima virulencije koji značajno ometaju, suprimiraju i usmeravaju u negativnom smeru imunološke faktore i mehanizme.

Među njima su leukotoksin, citoletalni toksin rastezanja, faktori imunosupresije koji inhibiraju blastogenezu, produkciju antitela i aktiviraju T-regulatorne ćelije, takođe, inhibitori funkcije polimorfonukleara i elementi koji ih čine otpornim na komplement (250). Agresivnost ovog mikroorganizama odnosi se, posebno, na njegovu sposobnost da direktnim i indirektnim mehanizmima indukuje specifičnu imunost i modifikuju imunološke mehanizme u destruktivnom smeru, što je, upravo, ključni element parodontalnog oboljenja (251, 252).

Vivekananda i sar. su u svojoj studiji analizirali efekat lokalno primenjenih probiotika u terapiji parodontopatije. Dokazali su da je došlo do statistički značajne redukcije *A. actinomycetemcomitans* u grupi u kojoj je pored bazične terapije primenjena i terapija probiotskih bakterija, kao što je dokazano i u ovoj studiji. Statistička značajnost iznosila je $p < 0.05$ (217).

Kornman i sar. i Mombelli i sar. su pronašli da bazična terapija nije efektivna u redukciji parodontopatogena *A. actinomycetemcomitans* (253, 254). Eicke i sar. u *in vitro* studiji su naveli da je primenom aktivnog kiseonika došlo do redukcije parodontopatogenih mikroorganizama prvenstveno *A. actinomycetemcomitans*-a. (255). Kulik i sar. u svojoj studiji su naveli da nakon lokalne primene klindamicin gela nije došlo do statistički značajne redukcije *A. actinomycetemcomitans* bakterije, a kao razlog navode rezistenciju ove bakterije na veliku grupu antibiotika, među kojima je i klindamicin (256). U istraživanju koje je deo ove doktorske disertacije, takođe, nije došlo do značajne redukcije ove bakterije u grupi u kojoj je pored bazične terapije lokalno primenjen i klindamicin gel.

P. gingivalis je glavni parodontopatogen odgovoran za destruktivne promene u periodoncijumu kod pacijenata obolelih od parodontopatije. Otkrivanje i kvantifikacija ovog mikroorganizma relevantni su za dijagnozu i planiranje lečenja (257). *P. gingivalis* se retko može izolovati u zdravom periodoncijumu (258, 259). Prisustvo bakterije *P. gingivalis* detektovano je u svim grupama ispitanika pre terapije. Ovaj parodontopatogen detektovan je u subgingivalnom dentalnom plaku svih ispitanika i kretao se od 82,5% do 95%.

Nakon sprovedene terapije statistički značajno smanjenje prisustva ove bakterije (50%) zabeleženo je u II grupi ispitanika gde su pored bazične terapije parodontopatije lokalno primenjene i probiotske bakterije ($p < 0,001$). U III grupi ispitanika, gde je pored bazične terapije lokalno primenjen i aktivni kiseonik u parodontalne džepove, zabeležen je pad zastupljenosti *P. gingivalis*-a sa 95% na 47,5% što je takođe statistički značajna redukcija ovog parodontopatogena ($p < 0,001$).

Neeraj i sar. su u svojoj studiji pratili nivo *P. gingivalis-a*. U odnosu na kontrolnu grupu, u grupi ispitanika koja je u terapiji primila probiotike zabeležen je statistički značajan pad u koncentraciji navedenog parodontopatogena (260). Do sličnih rezultata, koji govore u korist lokalne primene probiotika i redukcije broja *P. gingivalis-a* došle su i studije Köll-Klais i sar. (261), Qgaard i sar. (262) i Hillman i sar. (263).

U ovoj studiji dokazan je efekat aktivnog kiseonika u redukciji parodontopatogena, među kojima i *P. gingivalis-a* (za 47,5%). Shoukheba i sar. su u svojoj studiji ukazali na antibakterijsko dejstvo kiseonika primenjenog u lečenju hronične parodontopatije. U grupi ispitanika kod kojih je primenjen kiseonik, putem PCR metode, dokazana je statistički značajna redukcija *P. gingivalis-a* ($p < 0,01$) (240).

Studija Carlos-a i sar. pokazala je visok stepen rezistencije *A. Actinomycescomitans-a* i *P. gingivalis-a* na lokalnu primenu klindamicina u terapiji hronične parodontopatije (264). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima ove studije.

Utvrđeno je da postoji heterogenost unutar *P. intermedia* sojeva u smislu serologije i homologije DNK. Godine 1992 sveobuhvatna studija hibridizacije DNK predložila je da se *P. intermedia* razvrsta u dva genotipa: *P. intermedia* i *P. nigrescens* (71). Studije pokazuju da je *P. intermedia* povezana sa parodontalnim oboljenjem a *P. nigrescens* sa zdravom gingivom (265-267).

Procenat zastupljenosti bakterije *P. intermedia* u istraživanju koje je deo ove doktorske disertacije pre terapije kretao se u intervalu od 62,5% do 77,5%. Jedino je statistički signifikantno smanjenje ($p < 0,05$) procenta nakon terapije zabeleženo u grupama sa kombinovanom bazičnom i probiotskom terapijom (sa 72,5% na 42,5%), kao i u grupi gde je pored bazične terapije lokalno primenjen i aktivni kiseonik (sa 62,5% na 45%).

Teughels i sar. su u svojoj studiji pokazali da subgingivalna primena probiotskih bakterija dovodi do suzbijanja rekolonizacije *P. intermedia-e* (268). Koll i sar. ukazuju da lokalno primenjene probiotske bakterije dovode do suprimiranja bakterijskog rasta *A. Actinomycetemcomitans-a*, *P. gingivalis-a* i *P. intermedie* (269). Gianluca i sar. navode da grupa ispitanika kod kojih je lokalno primenjen kiseonik beleži pad u količini parodontopatogenih bakterija, među kojima i *P.intermedia-e* (270). Istraživanja (271-273) su pokazala da *P. Intermedia* reaguje dobro na parodontalnu terapiju, što je u skladu sa rezultatima u ovoj studiji.

U ovoj studiji , *T. forsythensis* je statistički zastupljena u svim grupama ispitanika pre terapije. Značajna redukcija ovog parodontopatogena registrovana je u grupi ispitanika u kojoj je pored bazične terapije primenjena lokalna terapija probioticima (62,5%) i u grupi u kojoj je primenjena i lokalna terapija aktivnim kiseonikom (52,5%), dok je u grupi sa bazičnom terapijom registrovana neznačajna redukcija ove bakterije (svega 12,5%). Grupa ispitanika sa lokalno primenjenim klindamicin gelom takođe je imala je statistički značajnu redukciju ovog parodontopatogena (35%), ali ona je bila manja u odnosu na grupe sa probiotikom i aktivnim kiseonikom.

Berzukova i sar. kao i Huth i sar. u svojim studijama naveli su da lokalna primena ozona dovodi do redukcije rasta sledećih parodontopatogenih bakterija: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, i *Tannerella forsythia*. Dokazana je statistički značajna redukcija navedenih bakterija nakon sprovedene terapije (274, 275). Matsubara i sar. u svojoj studiji dokazali su da lokalna administracija probiotika dovodi do redukcije kliničkih parametara inflamacije ali i bakterija koje su odgovorne za progresiju parodontopatije, među kojima i bakterije *T. Forsythensis* (221).

T. denticola zajedno sa ostalim proteolitičkim Gram-negativnim bakterijama u velikim količinama u parodontalnim džepovima igra važnu ulogu u progresiji parodontopatije (276). Akumulacija ovih bakterija i njihovih produkata u parodontalnom džepu dovodi do lize i oštećenja ćelija epitela. Pokazano je da *T. denticola* lepi fibroblaste i epitelne ćelije, kao i vanćelijske komponente matriksa prisutne u parodontalnim tkivima, i da stvara nekoliko štetnih faktora koji mogu doprineti virulenciji bakterija (277). *T. denticola* je u ovom istraživanju, pre terapije bila registrovana u svim grupama ispitanika. Nakon terapije, statistički značajno smanjenje zabeleženo je samo u grupi ispitanika u kojoj je pored bazične terapije bila primenjena i lokalna terapija probiotskih bakterija (za 25%). U ostalim grupama nije zabeležena statistički značajna redukcija navedenog parodontopatogena. Penala i sar. u svojoj studiji dokazali su PCR metodom da nakon lokalne primene probiotskih bakterija dolazi do statistički značajne redukcije *T. dentocole* u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika gde je bila primenjena samo bazična terapija parodontopatije (278).

Za razliku od mikrobiološkog ispitivanja, rezultati kliničkih studija se međusobno značajno ne razlikuju. Različite studije koriste različite metode za uzorkovanje bakterija (pljuvačka, dentalni plak, sluzokoža usne duplje, subgingivalna regija) i različite metode analiziranja (kultura ćelija, mikroskopija tamnog polja, *PCR*), što znatno otežava poređenje dobijenih rezultata (279, 280).

Treba ukazati na činjenicu da primenjena tehnika *PCR* u ovom istraživanju nije vršila kvantitativnu, već samo kvalitativnu analizu parodontopatogena.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu postavljenih ciljeva, sprovedene metodologije i dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

1. Indeksi oralne higijene (plak indeks, indeks zubnog kamenca i indeks konkremenata) su nakon sprovedene terapije u svim grupama ispitanika bili 0, a pre terapije u svim grupama su zabeležene znatno veće vrednosti navedenih indeksa.
2. Vrednosti gingivalnih indeksa (indeks krvarenja, gingivalni indeks) nakon sprovedene terapije hronične parodontopatije, su bili sniženi u svim grupama ispitanika. Najbolji rezultati su postignuti u grupi ispitanika kod kojih je pored bazične terapije primenjena i lokalna terapija probiotikom kao i u grupi gde je pored bazične terapije primenjena i lokalna terapija aktivnim kiseonikom.
3. Parodontalni indeks (PDI indeks), nakon mesec dana od sprovedene terapije, imao je statistički niže vrednosti u svim grupama, međutim najbolji rezultati su postignuti u grupi ispitanika gde je kombinovana bazična terapija i lokalna primena probiotika kao i u grupi u kojoj je kombinovana bazična terapija i lokalna primena aktivnog kiseonika.
4. Rezultati istraživanja pokazali su smanjenje prisustva sledećih bakterija: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* i *Treponema denticola*, u svim grupama ispitanika posle sprovedene terapije u odnosu na količinu navedenih bakterija pre terapije. Statistički značajnije smanjenje detektovano je u grupama ispitanika u kojima je kombinovana bazična terapija parodontopatije i lokalna terapija probiotskim bakterijama kao i u grupi gde je kombinovana bazična terapija i lokalna terapija aktivnim kiseonikom.
5. Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja, uočeno je značajno smanjenje aktivnosti parodontopatije primenom kombinovane bazične terapije i terapije probioticima kao i kombinovanjem bazične terapije i terapije aktivnim kiseonikom u odnosu na primenu kombinovane bazične terapije i terapije klindamicin gelom kao i samo bazične terapije.

6. Lokalana primena probiotskih bakterija i aktivnog kiseonika pokazala je efikasnost u eliminaciji inflamacije gingive ali i u održavanju postignutih terapijskih rezultata pa se na osnovu ovog istraživanja mogu preporučiti kao nove terapijske procedure u lečenju hronične parodontopatije kao dodatak bazičnoj terapiji.
7. Navedene terapijske procedure nisu pokazale neželjene efekte pa se slobodno mogu preporučiti i kao vid prevencije i terapije kod pacijenata sa početnim oblicima parodontalnog oboljenja.

Literatura

1. Kojović D, Pejčić A, Obradović R. Parodontologija. Niš: Galaksija; 2015.
2. Menon R, Torloni MR, Voltolini C et al. Biomarkers of spontaneous preterm birth: An overview of the literature in the last four decades. *Reprod Sci* 2011; 18 (11): 1046-1070.
3. Palmer RJr. Composition and development of oral bacterial communities. *Periodontol* 2000 2014; 64: 20-39.
4. Colombo AP, Boches SK, Cotton SL et al. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* 2009; 80(9): 1421-1432.
5. Popova C, Dosseva-Panova V, Panov V. Microbiology of Periodontal diseases. A review. *Biotechnol Biotech EQ* 2013; 27(3): 3754-3759.
6. Teles R, Teles F, Frias-Lopez J et al. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol* 2000 2013; 62(1): 95-162.
7. Muhammad AN. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)* 2017; 11(2): 72–80.
8. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 2004; 34: 9-21.
9. Aykol G, Baser U, Maden I et al. The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. *J Periodontol* 2011; 82(3): 481- 488.
10. Walsh LJ. The current status of laser applications in dentistry. *Aust Dent J* 2003; 48(3): 146–155.
11. Schwarz F, Aoki A, Becker J et al. Laser application in non-surgical periodontal therapy: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2008; 35(8 Suppl): 29–44.
12. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4(1): 1- 6.
13. American Academy of Periodontology Task Force Report on the update to the 1999 classification of periodontal diseases and conditions. *J Periodontol* 2015; 86(7): 835-838.
14. 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 Clin Periodontol* 2018; 45: 162-170.

15. Yamamoto M, Kobayashi R, Kono T et al. Induction of IL-10- producing CD4 T-cells in Chronic Periodontitis. *J Dent Res* 2011; 90(5): 653-658.
16. Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D et al. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographic locations. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci* 2000; 108(5): 383-392.
17. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm community life-style. *J Clin Periodontol* 2005; 32(6): 7-15.
18. Yost KG, Mallatt ME, Liebman J. Interproximal gingivitis and plaque reduction by four interdental products. *J Clin Dent* 2006; 17(3): 79-83.
19. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000 2013; 62(1): 59–94.
20. Charalampakis G, Dahlen G, Carlen A et al. Bacterial markers vs. clinical markers to predict progression of chronic periodontitis: a 2-yr prospective observational study. *Eur J Oral Sci* 2013; 121(5): 394–402.
21. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001; 183(12): 3770-3783.
22. Velsko IM, Overmyer KA, Speller C et al. The dental calculus metabolome in modern and historic samples. *Metabolomics* 2017; 13(11): 134.
23. Hannig C, Hannig M. The oral cavity—a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig* 2009; 13(2): 123–139.
24. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Rickard AH et al. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000 2006; 42: 47-79.
25. Singh R, Ren Z, Shi Y et al. Affordable oral healthcare: Dental biofilm disruption using chloroplast made enzymes with chewing gum delivery. *Plant Biotechnol J* 2021; 19(10): 2113–2125.
26. Lang NP, Lindhe J, eds. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 2 Volume Set. Copenhagen: John Wiley & Sons; 2015.
27. Koo H, Yamada KM. Dynamic cell-matrix interactions modulate microbial biofilm and tissue 3D microenvironments. *Curr Opin Cell Biol* 2016; 42: 102–112.
28. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14(9): 563–575.

29. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *Isme J* 2013; 7(5): 1016–1025.
30. Pejčić A, Kesić LJ, Milašin J. C- reactive protein as a systemic marker of inflamacion in periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30(3): 407-414.
31. Coenye T, Nelis, HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2010; 83(2): 89–105.
32. Sim, CPC, Dashper SG, Reynolds EC. Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. *J Dent* 2016; 50: 1–11.
33. Ravel J, Gajer P, Abdo Z et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108 (Suppl 1): 4680–4687.
34. Foglio Bonda PL, Migliario M, Rocchetti V et al. Daily and annually variation of unstimulated whole saliva flow rate and pH and their relation with body profile in healthy young adults. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17(18): 253.
35. Scoransky SS, Haffajee AD, Cugini MA et al. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25(2): 134-144.
36. Ledder RG, Madhwani T, Sreenivasan PK et al. An in vitro evaluation of hydrolytic enzymes as dental plaque control agents. *J Med Microbiol* 2009; 58(Pt 4): 482–491.
37. Head DA, Marsh PD, Devine DA. Non-lethal control of the cariogenic potential of an agent-based model for dental plaque. *PLoS ONE* 2014; 9(8): e105012.
38. Chetrus V, Ion IR. "Dental Plaque - Classification, Formation, and Identification." *Int J Med* 2013; 3(2): 139-143.
39. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community–implications for health and disease. *BMC Oral Health* 2006; 6(1): S14. doi:10.1186/1472-6831-6-S1-S14.
40. Quirynen M, Teughels W, Haake SK et al. Microbiology of Periodontal Diseases. In: Newman MG, Takei HH, et al. (Eds.), *Carranza's Clinical Periodontology* 2006; 134-169.
41. Marsh PD. *Dental Biofilms in Health and Diseases*. Springer International Publishing 2016; 41-52.
42. Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Invest* 2003; 7(4): 181-188.

43. Hua X, Cook GS, Costerton JW et al. Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *J Bacteriol* 2000; 182(24): 7067-7069.
44. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Research* 2004; 38(3): 204-211.
45. Zijng V, van Leeuwen MBM, Degener JE et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PloS One* 2010; 5(2): e9321. doi.org/10.1371/journal.pone.0009321.
46. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA et al. Microbial complexes in subgingival plaque *J Clin Periodontol* 1998; 25(2): 134–144.
47. Ang CS, Veith PD, Dashper SG et al. Application of ¹⁶O /¹⁸O reverse proteolytic labeling to determine the effect of biofilm culture on the cell envelope proteome of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Proteomics* 2008; 8(8): 1645–1660.
48. Chalmers NI, Palmer RJ Jr, Cisar JO et al. Characterization of a *Streptococcus sp.*-*Veillonella sp.* community micromanipulated from dental plaque. *J Bacteriol* 2008; 190(24): 8145–8154.
49. Chen W, Honma K, Sharma A et al. A universal stress protein of *Porphyromonas gingivalis* is involved in stress responses and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 264(1): 15–21.
50. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 2018; 16(12): 745–759.
51. Cvetković A, Mitić A, Mitić T et al. Procena povezanosti nivoa ukupnih proteina pljuvačke, IGA pljuvačke i karijes iskustva u dece. *Praxis Med* 2013; 42(2): 13-18.
52. Pucar LJ. Ana. Ispitivanje prisustva mikroorganizama oralne mikroflore kao faktora rizika u nastanku i razvoju okluzivne arterijske bolesti. *Doktorska teza*, 2007; 66-97.
53. Fine HD, Markowitz K, Furgang D et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol* 2007; 45(12): 3859–3869.
54. Perry MB, Maclean LM, Brisson JR et al. Structures of the antigenic O-Polysaccharides of lipopolysaccharides produced by *actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, c, d and e. *Eur J Biochem* 1996; 242(3): 682–688.
55. Henderson B, Wilson M, Sharp L et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Med Microbiol* 2002; 51(12): 1013–1020.

56. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP et al. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000 1999; 20: 136-167.
57. Balashova NV, Shah C, Patel JK et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LtxC is required for leukotoxin activity and initial interaction between toxin and host cells. *Gene* 2009; 443(1-2): 42-47.
58. Kachlany SC. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. *J Dent Res* 2010; 89(6): 561–570.
59. Korostoff J, Yamaguchi N, Miller M et al. Perturbation of mitochondrial structure and function plays a central role in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin-induced apoptosis. *Microb Pathog* 2000; 29(5): 267– 278.
60. Claesson R, Johansson A, Belibasakis G et al. Release and activation of matrix metalloproteinase 8 from human neutrophils triggered by the leukotoxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* 2002; 37(5): 353–359.
61. Johansson A, Claesson R, Hanstrom L et al. Polymorphonuclear leukocyte degranulation induced by leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* 2000; 35(2): 85–92.
62. Johansson A, Sandstrom G, Claesson R et al. Anaerobic neutrophil dependent killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in relation to bacterial leukotoxicity. *Eur J Oral Sci* 2000; 108 (2): 136–146.
63. Karkelian D, Lear JD, Lally ET et al. Characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin pore formation in HL60 cells. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1406(2): 175–187.
64. DiRienzo JM, McKay TL. Identification and characterization of genetic cluster groups of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from the human oral cavity. *J Clin Microbiol* 1994; 32(1): 75– 81.
65. Mayer MP, Bueno LC, Hansen EJ et al. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1990; 67(3): 1227–1237.
66. Lara-Tejero M, Galan JE. Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends Microbiol* 2002; 10(3): 147–152.

67. Kelk P, Claesson R, Hänström L et al. Abundant secretion of bioactive interleukin-1beta by human macrophages induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect Immun* 2005; 73(1): 453-458.
68. Antony B, Thomas S, Chandrashekar SC et al. Osteomyelitis of the mandible due to *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Indian J Pathol Microbiol* 2009; 52(1): 115-116.
69. Malek R, Gharibi A, Khilil N et al. Necrotizing ulcerative gingivitis. *Contemp Clin Dent* 2017; 8(3): 496-500.
70. Mättö J, Asikainen S, Vaisanen ML et al. Role of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in extraoral and some odontogenic infections. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 194–198.
71. Shah HN, Gharbia SE. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42(4): 542–546.
72. Könönen E. Pigmented *Prevotella* species in the periodontally healthy oral cavity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993; 6(2-3): 201–205.
73. Naito M, Belvin BR, Shoji M et al. Insertional Inactivation of *Prevotella intermedia* OxyR Results in Reduced Survival with Oxidative Stress and in the Presence of Host Cells. *Microorganisms* 2021; 9(3): 551.
74. López NJ. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. *J Periodontol* 2000; 71(6): 948–954.
75. Lally ET, Hill RB, Kieba IR et al. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol* 1999; 7(9): 356-361.
76. Greenwood D, Slack R, Peutherer J. *Medical microbiology*. 16th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2002.
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(9): 2135–2146.

78. Kesić Lj, Milašin J, Igić M et al. Microbial etiology of periodontal disease—mini review. *Med Biol* 2008; 15(1): 1-6.
79. Holt SC, Kesavalu L, Walker S et al. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 1999; 20: 168-238.
80. How KY, Song KP, Chan KG. *Porphyromonas gingivalis*: An overview of periodontopathic pathogen below the gum line. *Front Microbiol* 2016; 9: 7-53.
81. Tanner AC, Izard J. *Tannerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontol* 2000 2006; 42: 88–113.
82. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE et al. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol* 1995; 66(1): 23–29.
83. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994; 65(3): 260–267.
84. Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ et al. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998; 25(2): 85–98.
85. Lanza E, Magan- Fernandez A, Bermejo B et al. Complementary clinical effects of red complex bacteria on generalized periodontitis in a caucasian population. *Oral Dis* 2016; 22(5): 430-437.
86. Kasuga Y, Ishihara K, Okuda K. Significance of detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and *Treponema denticola* in periodontal pockets. *Bull Tokyo Dent Coll* 2000; 41(3): 109–117.
87. 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* 2006; 55(3-4): 154-162.
88. Bankur PK, Nayak A, Bhat K et al. Comparison of culture and polymerase chain reaction techniques in the identification of *Tannerella forsythia* in periodontal health and disease, an in vitro study. *J Indian Soc Periodontol* 2014; 18(2): 155-160.
89. Nagano K, Hasegawa Y, Yoshida Y et al. Comparative analysis of motility and other properties of *Treponema denticola* strains. *Microb Pathog* 2017; 102: 82–88.
90. Ding Y, Uitto VJ, Haapasalo M et al. Membrane components of *Treponema denticola* trigger proteinase release from human polymorphonuclear leukocytes. *J Dent Res* 1996; 75(12): 1986-1993.

91. Listgarten MA, Hellden L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J Clin Periodontol* 1978; 5(2): 115-132.
92. Riviere GR, Elliot KS, Adams DF et al. Relative proportions of pathogen-related oral spirochetes (PROS) and *Treponema denticola* in supragingival and subgingival plaque from patients with periodontitis. *J Periodontol* 1992; 63(2): 131-136.
93. Frederick JR, Sarkar J, McDowell JV et al. Molecular signaling mechanisms of the periopathogen, *treponema denticola*. *J Dent Res* 2014; 90(10): 1155-1163.
94. Kim J, Amar S. Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. *Odontology* 2006; 94(1): 10-21.
95. Arowojolu MO, Dosumu EB, Onyiaso CO et al. Effects of some risk factors and immunodeficiencies on the periodontium-a review. *Afr J Med Med Sci* 2002; 31(3): 195-199.
96. Kirkwood KL, Taba MJr, Rossa CJr et al. Molecular biology of the host microbe interaction in periodontal diseases: selected topics. In Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA eds. *Carranza's Clinical Periodontology* 10th ed. St, Louis:Saunders Elsevier, 2006; 259-274.
97. Sulijaya B, Takahashi N, Yamazaki K. Host modulation therapy using anti-inflammatory and antioxidant agents in periodontitis: A review to a clinical translation. *Arch of Oral Biol* 2019; 105: 72–80.
98. Africa CW. Oral colonization of Gram-negative anaerobes as a risk factor for preterm birth. *Virulence* 2011; 2(6): 498-508.
99. Ercan E, Eratalay K, Deren O et al. Evaluation of periodontal pathogens in amniotic fluid and the role of periodontal disease in pre-term birth and low birth weight. *Acta Odontol Scand* 2013; 71(3-4): 553-559.
100. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2008; 79(8 Suppl): 1585–1591.
101. Gücer F, Balkanli-Kaplan P, Yüksel M et al. Maternal serum tumor necrosis factor-alpha in patients with preterm labor. *J Reprod Med* 2001; 46(3): 232-236.
102. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR et al. *Carranza's clinical periodontology*. Philadelphia: Elsevier health sciences; 2011.
103. Dennison DK, Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000 1997; 14(1): 54-78.

104. Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S et al. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* 1997; 14(1): 173-201.
105. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000* 2014; 64(1): 57-80.
106. Carlsson G, Wahlin YB, Johansson A et al. Periodontal disease in patients from the original Kostmann family with severe congenital neutropenia. *J Periodontol* 2006; 77(4): 744–751.
107. Van Dyke TE. Cellular and molecular susceptibility determinants for periodontitis. *Periodontol 2000* 2007; 45: 10–13.
108. Claesson R, Johansson A, Belibasakis G et al. Release and activation of matrix metalloproteinase 8 from human neutrophils triggered by the leukotoxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* 2002; 37(5): 353– 359.
109. Arron JR, Choi Y. Osteoimmunology: bone versus immune system. *Nature* 2000; 408(6812): 535-536.
110. Graves D, Chen C, Douville C et al. Interleukin-1 receptor signaling rather than that of tumor necrosis factor is critical in protecting the host from the severe consequences of a polymicrobe anaerobic infection. *Infect Immun.* 2000; 68(8): 4746–4751.
111. Fukada SY, Silva TA, Garlet GP et al. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24(1): 25–31.
112. Dinarello CA . Interleukin-1. *Dig Dis Sci* 1988; 33(3 Suppl): 25-35.
113. Romero R, Durum S, Dinarello CA et al. Interleukin-1 stimulates prostaglandin biosynthesis by human amnion. *Prostaglandins* 1989; 37(1): 13–22.
114. Meikle MC, Atkinson SJ, Ward RV et al. Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin 1: evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *J Periodontal Res* 1989; 24(3): 207-213.
115. Tatakis DN. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J Periodontol* 1993; 64(5 Suppl): 416-431.
116. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000* 1997; 14: 112-143.

117. Nakashima K, Roehric N, Cimasoni G. Osteocalcin, prostaglandin E-2 and alkaline phosphatase in gingival cervicular fluid: their relations to periodontal status. *J Clin Periodontol* 1994; 21(5): 327-333.
118. Gapski R, Barr JL, Sarment DP et al. Effect of systemic matrix metalloproteinase inhibition on periodontal wound repair: a proof of concept trial. *J Periodontol* 2004; 75(3): 441-452.
119. Makela M, Salo T, Uitto VJ et al. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res* 1994; 73(8): 1397- 1406.
120. Söder B, Jin LJ, Wickholm S. Granulocyte elastase, matrixmetalloproteinase-8 and prostaglandin E2 in gingival crevicular fluid in matched clinical sites in smokers and nonsmokers with persistent periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002; 29(5): 384-391.
121. Mäntylä P, Stenman M, Kinane DF et al. Gingival crevicular fluid collagenase2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J Periodontal Res* 2003; 38(4): 436-439.
122. Ryan ME, Ramamurthy S, Golub LM. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. *Curr Opin Periodontol* 1996; 3: 85-96.
123. Deguchi JO, Aikawa E, Libby P et al. Matrix metalloproteinase-13/collagenase-3 deletion promotes collagen accumulation and organization in mouse atherosclerotic plaques. *Circulation*. 2005; 112(17): 2708–2715.
124. Dimitrievic B. U: *Klinička Parodontologija*. Zavod za udžbenike, Beograd, 2011.
125. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965; 36: 177–187.
126. Eke PI, Thornton-Evans GO, Wei L et al. Accuracy of NHANES periodontal examination protocols. *J Dent Res* 2010; 89(11): 1208-1213.
127. Aukhil I. Biology of wound healing. *Periodontol* 2000 2000; 22: 44-50.
128. 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(3): 55-71.
129. Darby I, Mooney J, Kinane D. Changes in subgingival microflora and humoral immune response following periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2001; 28(8): 796-805.
130. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S et al. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997; 24(5): 324-34.
131. Ganss C, Schlueter N, Preiss S et al. Tooth brushing habits in uninstructed adultsfrequency, technique, duration and force. *Clin Oral Investig* 2009; 13(2): 203-203.

132. Reid G, Hammond JA. Probiotics. Some evidence of their effectiveness. *Can Fam Physician* 2005; 51(11): 1487–1493.
133. Cribby S, Taylor M, Reid G. Vaginal microbiota and the use of probiotics. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008; 2008: 256490.
134. Teughels W, Van Essche M, Sliepen I et al. Probiotics and oral healthcare. *Periodontol* 2000 2008; 48: 111–147.
135. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965; 147(3659): 747-748.
136. Iwamoto T, Suzuki N, Tanabe K et al. Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* WB21 on halitosis and oral health: An open-label pilot trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 110(2): 201–208.
137. Cagetti MG, Mastroberardino S, Milia E et al. The use of probiotic strains in caries prevention: A systematic review. *Nutrients* 2013; 5(7): 2530–2550.
138. Mu Q, Tavella VJ, Luo XM. Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Front Microbiol* 2018; 9: 1-17.
139. Sales-Campos H, Soares SC, Freire CJ. An introduction of the role of probiotics in human infections and autoimmune diseases. *Crit Rev Microbiol* 2019; 45(4): 413-432.
140. Slawik S, Staufenbiel I, Schilke Ret al. Probiotics affect the clinical inflammatory parameters of experimental gingivitis in humans. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65(7): 857-863.
141. Floch M. Recommendations for probiotic use in humans - A 2014 update. *Pharmaceuticals* 2014; 7(10): 999–1007.
142. Rigo-Adrover M, Saldaña-Ruiz S, van Limpt K et al. A combination of scGOS/lcFOS with *Bifidobacterium breve* M-16V protects suckling rats from rotavirus gastroenteritis. *Eur J Nutr* 2017; 56(4): 1657–1670.
143. Behera SS, Ray RC, Zdolec N. *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *BioMed Res Int* 2018; 9361614.
144. Ng SC, Hart AL, Kamm MA et al. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15(2): 300-310.
145. Wohlgemuth S, Gunnar Loh G, Blaut M. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *Int J Med Microbiol* 2010; 300(1): 3–10.

146. Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S. Probiotics: A role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut* 2002; 50(Suppl 3): 54-59.
147. Didari T, Solki S, Mozaffari S et al. A systematic review of the safety of probiotics. *Expert Opin Drug Saf* 2014; 13(2): 227-239.
148. Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: Inhibition of oral pathogens. *J Appl Microbiol* 2001; 90(2): 172-179.
149. Marttinen A, Haukioja A, Karjalainen S et al. Short-term consumption of probiotic lactobacilli has no effect on acid production of supragingival plaque. *Clin Oral Investig* 2012; 16(3): 797-803.
150. Mashimo PA, Yamamoto Y, Nakamura M et al. Lactic acid production by oral *Streptococcus mitis* inhibits the growth of oral Capnocytophaga. *J Periodontol* 1985; 56(9): 548-552.
151. Makras L De, Vuyst L. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by Bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *Int Dairy J* 2006; 9: 1049-1057.
152. Falagas M, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(7): 657-664.
153. Schiller C, Fröhlich C-P, Giessmann T et al. Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22(10): 971-979.
154. Bik EM, Eckburg PB, Gill RS et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(3): 732-737.
155. La Fata G, Weber P, Mohajeri MH. Probiotics and the gut immune system: indirect regulation. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2018; 10(1): 11 - 21.
156. Zoetendal EG, Raes J, Bogert B et al. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbo hydrates. *ISME J* 2012; 6(7): 1415-1426.
157. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(Suppl 1): 4586-4591.
158. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P et al. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(2): 444 - 450.

159. Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M et al. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr Issues Mol Biol* 2008; 10(1-2): 37-54.
160. Elahi S, Pang G, Ashman R et al. Enhanced clearance of *Candida albicans* from the oral cavities of mice following oral administration of *Lactobacillus acidophilus*. *Clin Exp Immunol* 2005; 141(1): 29-36.
161. Gruner D, Paris S, Schwendicke F. Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. *J Dent* 2016; 48: 16-25.
162. Bustamante M, Oomah BD, Mosi-Roa Y et al. Probiotics as an Adjunct Therapy for the Treatment of Halitosis, Dental Caries and Periodontitis. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2020; 12(2): 325-334.
163. Corr SC, Hill C, Gahan CG. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Adv Food Nutr Res* 2009 ;56: 1-15.
164. Spinler JK, Auchtung J, Brown A et al. Next-Generation Probiotics Targeting *Clostridium difficile* through Precursor-Directed Antimicrobial Biosynthesis. *Infect Immun* 2017; 85(10): e00303-17.
165. Nackaerts O, Jacobs R, Quirynen M et al. Replacement therapy for periodontitis: pilot radiographic evaluation in a dog model. *J Clin Periodontol* 2008; 35(12): 1048-1052.
166. Messori MR, Oliveira LF, Foureaux RC et al. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol* 2013; 84(12): 1818-1826.
167. Devine DA, Marsh PD. Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. *J Oral Microbiol* 2009; 1; 1.
168. Ballini A, Cantore S, Saini R et al. Effect of activated charcoal probiotic toothpaste containing *Lactobacillus paracasei* and xylitol on dental caries: a randomized and controlled clinical trial. *J Biol Regul Homeost Agents* 2019; 33(3): 977-981.
169. Gatej SM, Marino V, Bright R et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents alveolar bone loss in a mouse model of experimental periodontitis. *J Clin Periodontol* 2018; 45(2): 204-212.
170. Gao L, Xu T, Huang G et al. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell* 2018; 9(5): 488-500.
171. Mizock BA. Probiotics. *Disease-a-Month* 2015; 61(7): 259-290.

172. Szkaradkiewicz AK, Stopa J, Karpinski TM. Effect of oral administration involving a probiotic strain of *Lactobacillus reuteri* on pro-inflammatory cytokine response in patients with chronic periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp* 2014; 62(6): 495–500.
173. Gröschl M, Wendler O, Topf HG et al. Significance of salivary adrenomedullin in the maintenance of oral health: Stimulation of oral cell proliferation and antibacterial properties. *Regul Pept* 2009; 154(1-3): 16-22.
174. Andrei M, Dinischiotu A, Didilescu AC et al. Periodontal materials and cell biology for guided tissue and bone regeneration. *Ann Anat* 2018; 216: 164-169.
175. Le Sage F, Meilhac O, Gonthier MP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces pro-inflammatory adipokine secretion and oxidative stress by regulating Toll-like receptor-mediated signaling pathways and redox enzymes in adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 446: 102-110.
176. Barrot L, Asfar P, Mauny F et al. LOCO2 Investigators and REVA Research Network. Liberal or Conservative Oxygen Therapy for Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 2020; 382(11): 999–1008.
177. Grootveld M, Baysan A, Sidiiqui N et al. History of the clinical applications of ozone. In: Lynch E, editor. *Ozone: the revolution in dentistry*. London: Quintessence Publishing Co.; 2004. p. 23-30.
178. Das E, Gurakan GC, Bayindirli A. Effect of controlled atmosphere storage, modified atmosphere packaging and gaseous ozone treatment on the survival of *Salmonella enteritidis* on cherry tomatoes. *Food Microbiol* 2006; 23(5): 430-438.
179. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *Br J Biomed Sci* 1999; 56(4): 270–279.
180. Register SD, Aaron ME, Gelly HB. Hyperbaric oxygen therapy and optic neuritis: case report and literature review. *Undersea Hyperb Med* 2011; 38(6): 557-559.
181. Bennett MH, Lehm JP, Jepson N. Hyperbaric oxygen therapy for acute coronary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 10(8): CD004818.
182. Vilar DG, Fadrique GG, Martín IJ et al. Hyperbaric oxygen treatment in urology. *Arch Esp Urol* 2011; 64(6): 507-516.
183. Korhonen K. Hyperbaric oxygen therapy in acute necrotizing infections. With special reference to the effects on tissue gas tensions. *Ann Chir Gynaecol* 2000; 89(Suppl. 214): 7-36.

184. Whitesides L, Cotto-Cumba C, Myers RA. Cervical necrotizing fasciitis of odontogenic origin: a case report and review of 12 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58(2): 144-151.
185. Acquier AB, De Couto Pita AK, Busch L et al. Parameters of oxidative stress in saliva from patients with aggressive and chronic periodontitis. *Redox Rep* 2017; 22(3): 119-126.
186. Trivedi S, Lal N. Antioxidant enzymes in periodontitis. *J Oral Biol Craniofac Res* 2017; 7(1): 54-57.
187. Re K, Patel S, Gandhi J et al. Clinical utility of hyperbaric oxygen therapy in dentistry. *Med Gas Res* 2019; 9(2): 93–100.
188. Giacom TA, Giancola F, Paganini M et al. Hyperbaric Oxygen Therapy and A-PRF Pre-Treated Implants in Severe Periodontitis: A Case Report. *Int J Environ Res Public Health* 2021; 18(2): 413.
189. Wandawa G, Mustaqimah DN, Sidik S et al. Efficacy of hyperbaric oxygen therapy as an adjunctive therapy of chronic periodontitis. *J Int Dent Med Res* 2017; 10: 72–75.
190. Soranta NP, Hendiani I, Rusminah N et al. Effects of Hyperbaric Oxygen Therapy on MMP-8 Saliva Levels in Chronic Periodontitis: A Preliminary Research. *Int J Sci Basic Appl Res (IJSBAR)* 2021; 60: 45–55.
191. Chen T, Zhou Y, Liu J et al. Biological effects of hyperbaric oxygen on human severe periodontitis *Undersea Hyperb Med* 2002; 29(3): 159-166.
192. Gaggl AJ, Rainer H, Grund E et al. Local oxygen therapy for treating acute necrotizing periodontal disease in smokers. *J Periodontol* 2006 ;77(1): 31-38.
193. Robo I, Heta S, Karkanaq L et al. HBOT Application at Cases of Gingival Inflammation. *J Dent Oral Sci* 2019; 1: 1–16.
194. Baysan A, Lynch E. The use of ozone in dentistry and medicine. *Prim Dent Care*. 2005; 12(2): 47–52.
195. Gupta G, Mansi B. Ozone therapy in periodontics. *J Med Life* 2012; 5(1): 59–67.
196. Mombelli A, Samaranayake LP. Topical and systemic antibiotics in the management of periodontal diseases. *Int Dent J* 2004; 54(1): 3-14.
197. Thomas C, Stevenson M, Riley TV. Antibiotic and hospital-acquired *Clostridium difficile* – associated diarrhoea: a systematic review, *J. Antimicrob Chemotherap* 2003; 51(6): 1339-1350.

198. Rodrigues FF, Morais MI, Melo IS et al. Clindamycin inhibits nociceptive response by reducing tumor necrosis factor- α and CXCL-1 production and activating opioidergic mechanisms. *Inflammopharmacology* 2020; 28(2): 551–561.
199. Bystrzycka W, Moskalik A, Sieczkowska S et al. The effect of clindamycin and amoxicillin on neutrophil extracellular trap (NET) release. *Cent Eur J.Immunol* 2016; 41(1): 1–5.
200. Weldrick PJ, San S, Paunov VN. Advanced Alcalase-Coated Clindamycin-Loaded Carbopol Nanogels for Removal of Persistent Bacterial Biofilms. *ACS Appl Nano Mater* 2021; 4: 1187–1201.
201. Rosales C, Uribe-Querol E. Neutrophil role in periodontal disease. In *Role of Neutrophils in Disease Pathogenesis*; InTech: Rijeka Croatia, 2017; Volume 7, p. 67.
202. Magán-Fernández A, Rasheed Al-Bakri SM, O’Valle F et al. Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis. *Cells* 2020; 9(6): 1494.
203. Adhikari RP, Shrestha S, Barakoti, A et al. Inducible clindamycin and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital, Kathmandu, Nepal. *BMC Infect Dis* 2017; 17(1): 483.
204. Slots J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *J Periodont Res* 2002; 37(5): 389-398.
205. Sandhya YP, Prabhuji ML, Chandra RV. Comparative evaluation of the efficacy of 1 doxycycline hyclate in the periodontal treatment of smokers: a clinical and microbiological study. *Oral Health Prev Dent* 2011; 9(1): 59-65.
206. Lindeboom JA, Baas EM, Kroon FH. Prophylactic single-dose administration of 600 mg clindamycin versus 4-time administration of 600 mg clindamycin in orthognathic surgery: A prospective randomized study in bilateral mandibular sagittal ramus osteotomies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95(2): 145-149.
207. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal disease. *Periodontology* 2000 2004; 34: 9-21.
208. Loe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol* 1976; 38(6): 610-616.
209. Taichi I, Gentaro M, Yukari O et al. Clinical evaluation of periodontal pathogen levels by real-time polymerase chain reaction in peri-implantitis patients. *Int J Implant Dent* 2021; 7(1): 105.
210. Oste C. Polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1988; 6(2): 162–166.

211. Didari T, Solki S, Mozaffari S et al. A systematic review of the safety of probiotics. *Expert Opin Drug Saf* 2014; 13(2): 227–239.
212. Koduganti RR, Sandeep N, Guduguntla S et al. Probiotics and prebiotics in periodontal therapy. *Indian J Dent Res.* 2011; 22(2): 324–330.
213. Grootveld M, Baysan A, Sidiiqui N et al. History of the clinical applications of ozone. In: Lynch E, editor. *Ozone: the revolution in dentistry*. London: Quintessence Publishing Co.; 2004. p. 23-30.
214. Herrera D, Sanz M, Jepsen S et al. 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 (3) :136–159.
215. Buduneli N, Buduneli E, Cetin EO et al. Clinical findings and gingival crevicular fluid prostaglandin E2 and interleukin 1 beta levels following initial periodontal treatment and short term meloxicam administration. *Expert Opin Pharmacother.* 2010; 11(11): 1805-1812.
216. Quirynen M, De Soete M, Boschmans G et al. Benefit of "one-stage full-mouth disinfection" is explained by disinfection and root planing within 24 hours: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol* 2006; 33(9): 639-647.
217. Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* [Prodentis] in the management of periodontal disease: A preliminary randomized clinical trial. *J Oral Microbiol* 2010; 2: 1-9.
218. Teughels W, Durukan A, Ozcelik O et al. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: A randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2013; 40(11): 1025-1035.
219. Tekce M, Ince G, Gursoy H et al. Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: A 1-year follow-up study. *J Clin Periodontol* 2015; 42(4): 363-372.
220. Ramzy MI, Gomaa HE, Mostafa MI. Management of aggressive periodontitis using ozonized water. *Egypt Med J NRC* 2005; 6: 229–245.
221. Kshitish D, Laxman VK. The use of ozonated water and 0.2% chlorhexidine in the treatment of periodontitis patients: A clinical and microbiologic study. *Indian J Dent Res* 2010; 21(3): 341–348.

222. Pejčić A, Kojović D, Minić I et al. Therapeutic efficacy of Clindamicine-gel as on Adjunct to scaling and root planning therapy in chronic periodontal disease. *Acta Clin Croat* 2015; 54(1): 46-51.
223. Johnston T, Mondal P, Pal D et al. Canine periodontal disease control using a clindamycin hydrochloride gel. *J Vet Dent* 2011; 28(4): 224-229.
224. Matsubara VH, Bandara HM, Ishikawa KH et al. The role of probiotic bacteria in managing periodontal disease: A systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2016; 14(7): 643-655.
225. Martin-Cabezas R, Davideau JL, Tenenbaum H et al. Clinical efficacy of probiotics as an adjunctive therapy to non-surgical periodontal treatment of chronic periodontitis: A systematic review and meta analysis. *J Clin Periodontol* 2016; 43(6): 520- 530.
226. Cutler CW, Jotwani R. Dendritic cells at the oral mucosal interface. *J Dent Res* 2006; 85(8): 678–689.
227. Chatterjee A, Bhattacharya H, Kandwal A. Probiotics in periodontal health and disease. *J Indian Soc Periodontol* 2011; 15(1): 23-28.
228. Iyer C, Kusters A, Sethi G et al. Probiotic lactobacillus reuteri promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kappaB and MAPK signalling. *Cell Microbiol* 2008; 10(7): 1442–1452.
229. Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277(52): 50959–50965.
230. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E et al. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296(5): 1140–1149.
231. Twetman S, Derawi B, Keller M et al. Short term effect of chewing gum containing probiotics lactobacillus reutri on levels of inflammatory mediators in GCF. *Acta Odontol Scand* 2009; 67(1): 19–24.
232. Kang MS, Kim BG, Chung J et al. Inhibitory effect of Weissella cibaria isolates on the production of volatile sulphur compounds. *J Clin Periodontol* 2006; 33(3): 226–232.
233. Matsuoka T, Sugano N, Takigawa S et al. Effect of oral Lactobacillus salivarius TI 2711 administration on periodontopathic bacteria in subgingival plaque. *Jpn Soc Periodontol* 2006; 48: 315–324.

234. Sabatini S, Ricci M, Candotto V et al. Effects of the application of high-pressure oxygen on the treatment of periodontal disease in diabetic patients. *Oral Implantol* 2017; 10(4): 412-423.
235. Kinane DF, Attstrom R. Advances in the pathogenesis of periodontitis. Group b consensus report of the fifth european workshop in periodontology. *J Clin Periodontol* 2005; 32 Suppl 6: 130–131.
236. Dentino A, Lee S, Mailhot J et al. Principles of periodontology. *Periodontol* 2000 2013; 61(1): 16–53.
237. Giovanella LB, Barletta FB, Felipe WT et al. Assessment of oxygen saturation in dental pulp of permanent teeth with periodontal disease. *J Endod* 2014; 40(12): 1927–1931.
238. Wu W, Yang N, Feng X et al. Effect of vitamin C administration on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in periodontal ligament cells. *Mol Med Rep* 2015; 11(1): 242–248.
239. Thomas B, Madani SM, Prasad BR et al. Comparative evaluation of serum antioxidant levels in periodontally diseased patients: An interventional study. *Contemp Clin Dent* 2014; 5(3): 340–344.
240. Shoukheba MYM, Ali Sh A. The effects of subgingival application of ozonated olive oil gel in patient with localized aggressive periodontitis. A clinical and bacteriological study. *Tanta dental journal* 2014; 11: 63-73.
241. Demple B, Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 915-948.
242. Canakci CF, Cicek Y, Canakci V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry* 2005; 70(6): 619-628.
243. Tamaki N, Tomofuji T, Ekuni D et al. Short-term effects of non-surgical periodontal treatment on plasma level of reactive oxygen metabolites in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2009; 80(6): 901-906.
244. Cosola S, Giammarinaro E, Genovesi AM et al. A short-term study of the effects of ozone irrigation in an orthodontic population with fixed appliances. *Eur J Paediatr Dent* 2019; 20(1): 15-18.
245. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol* 2000 2007; 43: 160-232.

246. Brook I, Lewis MAO, Sándor GKB et al. Clindamycin in dentistry: more than just effective prophylaxis for endocarditis? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 100(5): 550-558.
247. Addy LD, Martin MV. Clindamycin and dentistry. *Br Dent J* 2005; 199(1): 23-26.
248. Goldstein EJ, Citron DM, Cherubin CE et al. Comparative susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group species and other anaerobic bacteria to meropenem, imipenem, piperacillin, cefoxitin, ampicillin/sulbactam, clindamycin and metronidazole. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31(3): 363-372.
249. Brook I, Gober AE, Leyva F. In vitro and in vivo effects of penicillin and clindamycin on expression of group A beta-hemolytic streptococcal capsule. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(7): 1565-1568.
250. Pant VA, Mathur RM. Aggressive periodontitis: need to assess the prevalence and to plan the management strategies in Indian scenario. India: Indmedica; 2006. Available from: <http://cyberlectures.indmedica.com/show/42/1/>
251. Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol* 2008; 79(8): 1560–1568.
252. Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M et al. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2001; 72(10): 1354–1363.
253. Kornman KS, Robertson PB. Clinical and microbiological evaluation of therapy for juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1985; 56(8): 443-446.
254. Mombelli A, Gmür R, Gobbi C et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. II. Characterization of isolated strains and effect of mechanical periodontal treatment. *J Periodontol* 1994; 65(9): 827-834.
255. Eick S, Tigan M, Sculean A. Effect of ozone on periodontopathogenic species in an in vitro study. *Clin Oral Investig* 2012; 16(2): 537-544.
256. Kulik E, Thurnheer T, Karygianni L et al. Antibiotic susceptibility patterns of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* strains from different decades. *Antibiotics* 2019; 8(4): 253.
257. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 78-111.

258. Van Winkelhoff A, Loos B, Van Der Reijden W et al. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. J Clin Periodontol 2002; 29(11): 1023-1028.
259. Griffen AL, Becker R, Lyons SR et al. Prevalence of Porphyromonas gingivalis and periodontal health status. J Clin Microbiol 1998; 36(11): 3239-3242.
260. Neeraj G, Shamanna PU, Varughese ST et al. Effects of amine fluoride and probiotic mouthwash on levels of Porphyromonas gingivalis in orthodontic patients: A randomized controlled trial. J Indian Soc Periodontol 2019; 23(4): 339–344.
261. Köll-Klais P, Mändar R, Leibur E et al. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: Species composition and antimicrobial activity. Oral Microbiol Immunol 2005; 20(6): 354–361.
262. Qgaard B, Alm AA, Larsson E et al. A prospective, randomized clinical study on the effects of an amine fluoride/stannous fluoride toothpaste/mouthrinse on plaque, gingivitis and initial caries lesion development in orthodontic patients. Eur J Orthod 2006; 28(1): 8–12.
263. Hillman JD, Zahradnik RT, Magnusson I et al. Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora, a probiotic mouthwash. J Appl Microbiol 2009; 107(2): 682–690.
264. Carlos MA, Lopez MA, Guzman CI. High resistance against clindamycin, metronidazole and amoxicillin in Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans isolates of periodontal disease. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2010 ;15 (6): e947-951.
265. Svintradze DV, Peterson DL, Collazo-Santiago EA et al. Structures of the Porphyromonas gingivalis OxyR regulatory domain explain differences in expression of the OxyR regulon in Escherichia coli and P. gingivalis. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2013; 69(10): 2091–2103.
266. Mättö J, Saarela M, von Troil-Linden B et al. Similarity of salivary and subgingival Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 1996; 11(6): 395–401.
267. van Steenberg T, Bosch-Tijhof CJ, Petit MD et al. Intra-familial transmission and distribution of Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens. J Periodontal Res 1997; 32(4): 345–350.
268. Teughels W, Newman MG, Coucke W et al. Guiding periodontal pocket recolonization: A proof of concept. J Dent Res 2007; 86(11): 1078–1082.

269. Koll P, Mandar R, Marcotte H et al. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23(2): 139–147.
270. Gianluca S, Campus G. The treatment of periodontal disease using local oxygen-ozone. *Ozone Therapy* 2016; volume 1:6498.
271. Darby I, Mooney J, Kinane D. Changes in subgingival microflora and humoral immune response following periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2001; 28(8): 796-805.
272. Renvert S, Wikstrom M, Dahlen G et al. Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 1990; 17(6): 345-350.
273. Predin T, Đurić M, Mirnić J et al. Klinički i mikrobiološki efekti kauzalne terapije parodontopatije. *Srp Arh Celok Lek* 2014; 142(1-2): 10-16.
274. Bezrukova IV, Petrukhina NB, Voinov PA. Experience in medical ozone use for root canal treatment. *Stomatologia* 2005; 84(6): 20-22.
275. Huth KC, Quirling M, Lenzke S et al. Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *Eur J Oral Sci* 2011; 119(3): 204-210.
276. Sarkar J, McHardy IH, Simanian EJ et al. Transcriptional responses of *Treponema denticola* to other oral bacterial species. *PLoS One* 2014; 9(2): e88361.
277. Sela NM. Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12(5): 399-413.
278. Penala S, Kalakonda B, Pathakota RK et al. Efficacy of local use of probiotics as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis and halitosis: A randomized controlled trial. *J Res Pharm Pract* 2016; 5(2): 86-93.
279. Swierkot K, Nonnenmacher CL, Mutters R et al. One-stage full mouth disinfection versus quadrant and full-mouth root planing. *J Clin Periodontol* 2009; 36(3): 240-249.
280. Predin T, Djuric M, Nikolic N et al. Clinical and microbiological effects of quadrant versus full-mouth root planning-a randomized study. *J Dent Sci* 2014; 9(4): 400-406.

BIOGRAFIJA AUTORA

Doktor Ivan Minić rođen je 10.08.1985. godine u Nišu. Osnovnu i srednju školu završio je sa odličnim uspehom. Medicinski fakultet u Nišu, odsek stomatologija, upisao je 2004. godine a diplomirao je oktobra 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,11. Diplomski rad pod nazivom “Biopsija- značaj u dijagnostici oralnih oboljenja” na Katedri za oralnu medicinu i parodontologiju odbranio je sa ocenom 10. U toku osnovnih studija učestvovao je na velikom broju domaćih i međunarodnih kongresa. Kao student osnovnih studija bio je demonstrator na predmetima: bolesti zuba-pretklinika u trajanju od 2 godine i bolesti zuba-endodoncija u trajanju od jedne godine.

Akadske doktorske studije, smer “Stomatološke nauke“ na Medicinskom fakultetu u Nišu upisao je 2017. godine gde je u toku studiranja ostvario prosečnu ocenu 9.51.

U toku desetogodišnjeg naučnog rada objavio je 32 naučne publikacije objavljena u istaknutim, medicinskim časopisima međunarodnog značaja (M21, M22 i M23) kao i radove u domaćim časopisima. Dr Ivan je učesnik preko 10 međunarodnih kongresa kao autor i predavač. Na internacionalnom kongresu u Berlinu bio je zapaženi predavač na temu “Oralni karcinomi- incidence i prevalence”. Bio je član organizacionog komiteta više kongresa među kojima su kongresi u Dubaiu (UAE), Hjustonu (USA), Beču (Austrija) i Cirihi (Švajcarska). Recenzent je u 5 međunarodna medicinska časopisa (“American Journal of Biomedical and Life Sciences”; “An International journal of Biology”; International Journal of Clinical and Medical Case Reports”; “Case Reports in Dental Science and Oral Biology” i “Universal Journal of Dentistry”. Član je ureničkog odbora u preko 15 međunarodna časopisa. U period od 2012. do 2013. godine bio je istraživač Internacionalnog projekta pod nazivom “Development of Periodontal Health Related Quality of the Scale” MBA (Hons.), MEARMA (Brussels), MARMA (UK), APS, Lucknow, India, Ethical Issues Group, European Association of Research, Managers & Administrators (Brussels). 2012-2013.

Dobitnik je nagrade za najboljeg mladog naučnika u organizaciji “*International Scientist Award 2021 on Engineering, Science and Medicine*”- Hyderabad, India.

Autor je 3 objavljene knjige: “The influence of bad oral health on the whole body” (2019); “A Guide to Dental Practice” (2020) i “Medical high-risk patients in the dental practice” (2021).

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

КОМПАРАТИВНО ИСПИТИВАЊЕ ЛОКАЛНОГ ТЕРАПИЈСКОГ ДЕЈСТВА ПРОБИОТИКА, АКТИВНОГ КИСЕОНИКА И КЛИНДАМИЦИН ГЕЛА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ХРОНИЧНОМ ПАРОДОНТОПАТИЈОМ

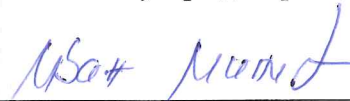
која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Др Иван З. Минић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

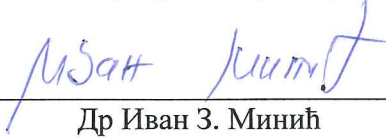
Наслов дисертације:

**КОМПАРАТИВНО ИСПИТИВАЊЕ ЛОКАЛНОГ ТЕРАПИЈСКОГ ДЕЈСТВА
ПРОБИОТИКА, АКТИВНОГ КИСЕОНИКА И КЛИНДАМИЦИН ГЕЛА КОД
ПАЦИЈЕНАТА СА ХРОНИЧНОМ ПАРОДОНТОПАТИЈОМ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Др Иван З. Минић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

КОМПАРАТИВНО ИСПИТИВАЊЕ ЛОКАЛНОГ ТЕРАПИЈСКОГ ДЕЈСТВА ПРОБИОТИКА, АКТИВНОГ КИСЕОНИКА И КЛИНДАМИЦИН ГЕЛА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ХРОНИЧНОМ ПАРОДОНТОПАТИЈОМ

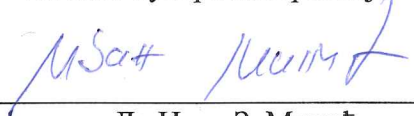
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити 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 прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:


Др Иван З. Минић