



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



**Марија Г. Јовановић**

**УТИЦАЈ ПОЗИЦИЈЕ ДЕМАРКАЦИЈЕ  
ПРЕПАРАЦИЈЕ ЗУБА  
НА ИНФЛАМАЦИЈУ ГИНГИВЕ И  
ПРОМЕНУ САСТАВА ОРАЛНЕ МИКРОБНЕ ФЛОРЕ**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

Ниш, 2023.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Marija G. Jovanović**

**THE INFLUENCE OF THE FINISH LINE POSITION  
OF THE TOOTH PREPARATION ON GINGIVAL  
INFLAMMATION AND THE COMPOSITION  
CHANGES IN THE ORAL MICROBIAL FLORA**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2023

## Подаци о докторској дисертацији

Ментор: Проф. др Милена Костић, ванредни професор,  
Универзитет у Нишу, Медицински факултет

Наслов: Утицај позиције демаркације препарације зуба на инфламацију  
гингиве и промену састава оралне микробне флоре

Резиме:

У истраживању се пошло од претпоставке да брушење зуба за металокерамичку круницу са демаркацијом препарације облика полужлеба може узроковати оштећење околног пародонталног ткива и промену састава оралне микробне флоре. Циљ истраживања био је испитивање клиничких параметара инфламације (гингивални индекс и индекс крварења гингиве), цитоморфометријских промена гингиве, биохемијских параметара инфламације (*interleukin 1 $\beta$*  (*L-1 $\beta$* ), *vascular endothelial growth factor* (*VEGF*), *matrix metalloproteinase 9* (*MMP-9*) и присуства периодонтопатогена (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*) у гингивалној течности, као и микробиолошког састава пљувачке пре и после брушења зуба и састава биоаеросола током брушења зуба са демаркацијом препарације облика полужлеба локализованог субгингивално и еквигингивално. Испитаници су подељени у две групе у зависности од позиције демаркације препарације зуба (субгингивална и еквигингивална). Резултати истраживања показали су да брушење зуба доводи до повећања вредности гингивалног индекса и индекса крварења гингиве у обе експерименталне групе, са присутним већим вредностима код субгингивалне демаркације. Испитиване вредности концентрације биохемијских маркера инфламације *IL-1 $\beta$*  и *VEGF* значајно су расле непосредно након брушења зуба, и постепено се смањивале током опсервационог периода, док је дошло до смањења концентрације *MMP-9*. Промене вредности концентрација биохемијских параметара зависиле су од позиције демаркације са већом статистичком значајношћу код субгингивалне позиције демаркације препарације зуба у поређењу са еквигингивалном. Брушење зуба довело је до промена свих цитоморфометријских параметара, који указују на инфламацију гингиве, са већим ефектом код субгингивалне позиције демаркације. Заступљеност периодонтопатогена статистички је значајно виша у интервалима након брушења зуба, што указује на инфламаторни потенцијал протетске процедуре, са већим присуством бактерија код субгингивалне демаркације у односу на еквигингивалну током целог периода испитивања. Порастом растојања од радног поља (усне дупље пацијента) сразмерно се смањио број бактеријских колонија у обе испитиване групе. Квалитативно најзаступљеније аеробне колоније су *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria spp*, *Streptococcus intermedius*, док су најзаступљеније факултативно

анаеробне бактеријске колоније *Haemophilus parainflanzae* и *Streptococcus sanguinis* у обе испитиване групе. Квалитативни микробиолошки састав усне дупље је у корелацији са заступљеношћу колонија пореклом из биоаеросола. Квантитативна заступљеност аеробних и факултативно анаеробних микроорганизама усне дупље непосредно након брушења зуба је нижа у обе испитиване групе са порастом аеробних и смањењем факултативно анаеробних колонија током опсервационог периода. Резултати истраживања указују на реверзибилну инфламацију ткива гингиве изазвану брушењем са већим интензитетом промена код субгингивалне позиције демаркације препарације зуба. Реверзибилност насталих промена указује на малу вероватноћу трајнијих оштећења пародонталног ткива изазваних свакодневним протетским третманом. Правилним избором клиничке процедуре превенира се развој пародонталних болести, смањује се могућност настанка јатрогених оштећења која могу угрозити терапијски ефекат и обезбеђује се дуготрајност фиксних протетских конструкција.

Научна област:

Стоматологија

Научна  
дисциплина:

Стоматолошка протетика

Кључне речи:

Брушење зуба, демаркација препарације, инфламација гингиве, биоаеросоли, орална флора

УДК:

616.314:[579:616.31(043.3)

CERIF  
класификација:

В 730

Тип лиценце  
Креативне  
заједнице:

CC BY-NC-ND

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral  
Supervisor:

Associate Prof. Milena Kostić, DDS, PhD,  
University of Niš, Faculty of Medicine

Title:

The influence of the finish line position of the tooth preparation on gingival inflammation and the composition changes in the oral microbial flora

Abstract:

The research started from the assumption that the tooth preparation for a Porcelain-Fused-to-Metal (PFM) crowns with the chamfer finish line position can cause damage to the surrounding periodontal tissue and a change of the oral microbial flora composition. The aim of the study was to examine the clinical parameters of inflammation (gingival index and gingival bleeding index), cytomorphometric changes of the gingiva, biochemical parameters of inflammation (*interleukin 1 $\beta$*  (*IL-1 $\beta$* ), *vascular endothelial growth factor* (*VEGF*), matrix metalloproteinase 9 (*MMP-9*) and the presence of periodontopathogens (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*) in the gingival crevicular fluid, as well as the saliva microbiological composition before and after tooth preparation and the composition of bioaerosols during the tooth preparation with the chamfer finish line localized subgingivally and equigingivally. The subjects were divided into two groups depending of the finish line position of the tooth preparation (subgingival and equigingival). The results of the study showed tooth preparation leads to an increase in the gingival index and gingival bleeding index in both experimental groups, with higher values presenting at subgingival finish line position. The examined values of the concentration of the biochemical inflammatory markers *IL-1 $\beta$*  and *VEGF* increased significantly immediately after tooth preparation, and gradually decreased during the observation period, while there was a decrease in the *MMP-9* concentration. The changes of concentration values of the biochemical parameters depended on the finish line position with greater statistical significance at the subgingival position of the tooth preparation compared to the equigingival. Tooth preparation led to changes in all cytomorphometric parameters, which indicate gingival inflammation, with a greater effect caused by the subgingival finish line position. The exposure of periodontopathogens is statistically significantly higher in the intervals after tooth preparation, which indicates the inflammatory potential of the prosthodontic procedure, with a higher bacteria presence at the subgingival compared to the equigingival position during the entire examination period. As the distance from the working field (patients' oral cavity) increased, the number of bacterial colonies decreased proportionally in both examined groups. Qualitatively, the most represented aerobic colonies were *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria spp*, *Streptococcus intermedius*, while the most represented facultatively anaerobic bacterial colonies were *Haemophilus parainfluanzae* and *Streptococcus sanguinis* in both examined groups. The qualitative microbiological composition of the oral cavity is correlated with the

presence of colonies originating from bioaerosols. The quantitative representation of aerobic and facultatively anaerobic microorganisms in the oral cavity immediately after tooth preparation was lower in both examined groups with an increase in aerobic and a decrease in facultatively anaerobic colonies during the observation period. The study results indicate a reversible gingival tissue inflammation caused by tooth preparation with a greater changes in the subgingival finish line position. The reversibility of the resulting changes indicates a low possibility of permanent periodontal tissue damage caused by daily prosthodontic procedure. Choosing the appropriate clinical procedure prevents the development of periodontal diseases, reduces the possibility of iatrogenic damage that can threaten the therapeutic effect, and ensures the longevity of fixed prosthodontic restorations.

Scientific Field:	Dentistry
Scientific Discipline:	Prosthodontics
Key Words:	Tooth preparation, finish line, gingival inflammation, bioaerosols, oral microbial flora
UDC:	616.314:[579:616.31(043.3)
CERIF Classification:	B 730
Creative Commons License Type:	<b>CC BY-NC-ND</b>

Докторску дисертацију посвећујем својој вољеној породици.

*Најмилији моји хвала вам што својим постојањем и делима  
чините мене бољом особом и дајете ми снагу да идем напред.*

*Без вас ова дисертација не би имала прави смисао,*

*јер она је успех свих нас.*

## Захвалност

Своју искрену захвалност дугујем:

- Менторки докторске дисертације проф. др Милени Костић на безрезервној подршци, пожртвовању, саветима, стрпљењу, изузетном залагању и личном заузимању у реализацији докторске дисертације. Искуство и знање које ми је свакодневно преносила током израде научног рада, биће ми драгоцену у каснијим фазама моје професионалне каријере. Несебична подршка од почетка наше сарадње помогла ми је да превазиђем све препреке и дилеме, и на крају спроведем ову докторску дисертацију у дело.

*Драга моја професорка, дан када сте ми Ви одређени за менторку докторске дисертације ми је велика прекретница у животу и каријери... Много година заједничке сарадње и пријатељства је тек пред нама, и томе се посебно радујем.*

- Проф. др Љиљани Кесић на мултидисциплинарном приступу у планирању и реализацији докторске дисертације, великодушној помоћи и личном залагању у области експерименталног дизајна научног истраживања, корисним саветима и уложеном труду.

*Драга професорка Ви сте спојили све коцкице и хвала Вам на свему што сте учинили за мене.*

- Проф. др Бранислави Коцић на пилот студији и првобитној хипотези из које су се развиле различите идеје овог истраживања, конструктивним саветима и сугестијама приликом израде докторске дисертације.

*Уважена професорка знам да сте уложили велики труд у организовању и спровођењу микробиолошких анализа узорака и читању резултата.*

- Проф. др Јелени Милашин на уложеном труду и великој помоћи у реализацији лабораторијских биохемијских и молекуларно генетичких анализа узорака у оквиру израде докторске дисертације, тумачењу резултата и корисним саветима.

*Драга професорка никада нећу заборавити свој боравак у Београду и Ваш пријатељски однос према мени.*

- Проф. др Надици Ђорђевић на корисним сугестијама и предлозима у току израде докторске дисертације.

*Поштована професорка хвала Вам на стручној помоћи при анализи добијених резултата.*



- Проф. др Николи Живковићу на стручној и личној помоћи у процесу цитоморфометријске анализе узорака, реализацији и интерпретацији добијених резултата.

*Драги Никола научили сте ме да после студија посебно заволим патохистологију и помогли да објавим први оригинални рад на SCI листи из овог научног истраживања.*

- Ментору за специјализацију из стоматолошке протетике проф. др Небојши Крунићу који ме је научио практичном раду и стручно усавршио.

*Поштовани професоре хвала Вам што сте ме подржали када ми је било најтеже.*

- Спец. др Маји Анђелковић, доц. др Марку Игићу и асист. др Николи Глигоријевићу на огромној подршци коју су ми несебично пружали у изради докторске дисертације.

*Драги пријатељи без вас и ваше подршке тешко бих успела да се изборим са свим изазовима који су ме пратили приликом овог истраживања.*

- Сестрама и техничарима из Службе за стоматолошку протетику Клинике за денталну медицину у Нишу на великом стрпљењу и помоћи у раду са пацијентима приликом овог истраживања.

*Хвала вам и не замерите ако сам вам понекад била мало напорна.*

- Дипл. инж. електронике Милету Ранђеловићу на статистичкој обради података и тумачењу научних резултата, као и на финалној техничкој обради докторске дисертације.

*Драги Миле вредело је чекати јер се без Вас једноставно не може.*

- Најдражима, Горану, Лидији и Родољубу, свом дечку Николи и пријатељима на љубави, вери, подршци, разумевању и мотивацији током остваривања својих циљева.

*Увек сте били уз мене! Хвала вам од срца...*

# САДРЖАЈ

<b>1. УВОДНЕ НАПОМЕНЕ</b> .....	<b>14</b>
<b>2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ</b> .....	<b>16</b>
2.1. Брушење зуба .....	16
2.1.1. Принципи препарације.....	16
2.1.2. Демаркација препарације зуба .....	17
2.2. Инфламација гингиве .....	19
2.2.1. Гингива .....	19
2.2.2. Пародонтална обољења.....	21
2.2.3. Оштећење гингиве изазвано брушењем .....	24
2.3. Маркери инфламације .....	26
2.3.1. Клинички маркери инфламације.....	26
2.3.2. Биохемијски маркери инфламације .....	26
2.3.2.1. <i>Interleukin 1 beta - IL-1<math>\beta</math></i> .....	27
2.3.2.2. <i>Vascular endothelial growth factor – VEGF</i> .....	29
2.3.2.3. <i>Matrix metalloproteinase 9 – MMP-9</i> .....	29
2.3.3. МИКРОБИОЛОШКИ ПАРАМЕТРИ ИНФЛАМАЦИЈЕ .....	31
2.3.3.1. Орална микрофлора.....	31
2.3.3.2. Орални биофилм .....	33
2.3.3.3. Супрагингивални орални биофилм.....	34
2.3.3.4. Микроорганизми у гингивалном сулкусу .....	36
2.3.3.5. Бактерије код болести оралних ткива.....	39
2.4. Биоаеросоли.....	41
2.4.1. Састав и извори биоаеросола .....	41
2.4.2. Распрострањеност биоаеросола у стоматологији.....	44
2.4.3. Изложеност биоаеросолима и опасност по здравље .....	45
<b>3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	<b>46</b>

<b>4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД</b> .....	<b>48</b>
4.1. Испитаници и клиничке процедуре.....	48
4.1.1. Клиничка процедура I.....	49
4.1.2. Клиничка процедура II.....	49
4.1.3. Клиничка процедура III.....	50
4.2. Методе истраживања.....	54
4.2.1. Клинички параметри стања здравља гингиве и пародонта.....	54
4.2.1.1. CPITN ( <i>Community Periodontal Index of Treatment Needs</i> ) – индекс стања пародонцијума у једној заједници и потребе лечења.....	54
4.2.1.2. Гингивални индекс – ГИ.....	55
4.2.1.3. Индекс крварења гингиве – ИКРВ.....	55
4.2.2. Микробиолошка анализа пљувачке и распрострањености биоаеросола....	56
4.2.2.1. Засејавање и инокулација.....	56
4.2.2.2. Идентификација.....	56
4.2.3. Биохемијска анализа гингивалне течности.....	57
4.2.3.1. <i>Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)</i> .....	57
4.2.3.2. <i>Interleukin 1 Beta (IL-1<math>\beta</math>)</i> .....	59
4.2.3.3. <i>Vascular endothelial growth factor (VEGF)</i> .....	60
4.2.4. Цитолошка и морфометријска анализа гингиве.....	60
4.2.4.1. HE бојење.....	61
4.2.4.2. Светлосна микроскопија и морфометријска анализа.....	61
4.2.5. Молекуларно генетичка квалитативна PCR анализа гингивалне течности .	62
4.2.6. Статистичка обрада података.....	66
4.3. Пилот студије за потврђивање валидности експерименталног дизајна.....	67
4.3.1. Испитивање клиничких и цитоморфометријских промена на ткиву гингиве пре и после брушења зуба.....	67
4.3.2. Испитивање концентрације MMP-9 и присуства периодонтопатогена у гингивалној течности пре и после брушења зуба.....	68

<b>5. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>70</b>
5.1. Резултати клиничких параметара након брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације.....	70
5.2. Резултати цитоморфометријских промена на ткиву гингиве након брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације .....	74
5.3. Резултати промене експресије маркера инфламације у гингивалној течности након брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације.....	90
5.4. Резултати присуства периодонтопатогених бактерија у гингивалној течности након брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације .....	95
5.5. Резултати корелације <i>PCR</i> налаза периодонтопатогена и експресије маркера инфламације у гингивалној течности.....	104
5.6. Резултати пилот студија .....	112
5.6.1. Резултати испитивања клиничких и цитоморфометријских промена на ткиву гингиве пре и после брушења зуба .....	112
5.6.2. Резултати испитивања концентрације <i>MMP-9</i> и присуства периодонтопатогена у гингивалној течности пре и после брушења зуба .....	116
5.7. Резултати квалитативне и квантитативне дистрибуције биоаеросола за време брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације ..	120
5.7.1. Резултати квантитативне дистрибуције биоаеросола за време брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације .....	120
5.7.2. Резултати квантитативне дистрибуције колонија у оралној средини пре и после брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације .....	126
5.7.3. Резултати квалитативне дистрибуције микроорганизама из биоаеросола за време брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације .....	129
5.7.4. Резултати квалитативне дистрибуције колонија у оралној средини пре и после брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације .....	137

<b>6. ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>145</b>
6.1. Дискусија промена клиничких параметара инфламације гингиве након брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације.....	145
6.2. Дискусија цитоморфометријских промена на ткиву гингиве након брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације .....	149
6.3. Дискусија промена експресије маркера инфламације у гингивалној течности након брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације.....	154
6.3.1. Дискусија промена концентрације <i>IL 1-β</i> у гингивалној течности након брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације .....	156
6.3.2. Дискусија промена концентрације <i>VEGF</i> у гингивалној течности након брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације .....	159
6.3.3. Дискусија промена концентрације <i>MMP-9</i> у гингивалној течности након брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације .....	162
6.4. Дискусија присуства периодонтопатогених бактерија у гингивалној течности након брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације.....	168
6.5. Дискусија корелације PCR налаза периодонтопатогена и експресије маркера инфламације у гингивалној течности.....	175
6.6. Дискусија квалитативне и квантитативне дистрибуције биоаеросола за време брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације ..	177
<b>7. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>185</b>
<b>8. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>188</b>
Биографија аутора .....	227

## 1. УВОДНЕ НАПОМЕНЕ

Фиксне протетске надокнаде (вештачке крунице или мостови) израђују се у циљу рехабилитације дела или целог зубног низа, те постају његов саставни део који се у потпуности укључује у екосистем усне дупље, преузимајући оптерећења намењена изгубљеним зубима (1). Осим њиховог морфолошко-функционалног бенефита по орално и опште здравље пацијената, фиксне надокнаде утичу на ткива са којима су у контакту. Литературни подаци показују да се интегритет пародонталног ткива може нарушити у току њихове израде, тачније препарације (брушења) зуба (2). Стога је потребно максимално елиминисати све факторе који би могли оштетити орална ткива у току припреме зубних ткива за прихватање фиксних надокнада и на тај начин обезбедити дужи век зубима носачима и протетској конструкцији (3).

Брушење зуба представља поступак уклањања тврдог зубног ткива у циљу обезбеђења простора за вештачку круницу. Облик избрушеног зуба мора да задовољи биолошке факторе (очување здравља оралног ткива), механичке (ретенција, резистенција и структурална трајност рада) и естетске (изглед рада и изглед пацијента) (4).

Демаркација препарације представља прелаз брушеног ка небрушеном делу зуба и може, у зависности од врсте вештачке крунице, бити линијска, у облику полужлеба или у облику степеника. У односу на руб гингиве демаркација препарације позиционирана је супра, екви или субгингивално (5, 6). Предност супра и еквигингивалне демаркације препарације је мање оштећење меких ткива и лакша контрола рубног затварања надокнаде. Са друге стране, литературни подаци показују да је субгингивална демаркација препарације неопходна у чак 50% клиничких случајева (каријес у пределу врата зуба, субгингивална фрактура, преосетљивост врата зуба, претходне надокнаде са субгингивалном демаркацијом, боља ретенција и резистенција надокнаде, естетски разлози), те се о измештању границе препарације зуба из зоне гингивалног сулкуса са становишта свакодневне клиничке праксе не може размишљати (7).

Брушење зуба је механички поступак који може изазвати промене на пародонту, а први знаци оштећења јављају се на ткиву гингиве. Квалитет насталих промена, у условима где се строго поштују принципи брушења зуба, зависи од позиције и врсте демаркације препарације, али и од присутних микроорганизама у устима пацијента који могу

фаворизовати даљи развој запаљења. Стога су детекција и праћење оралне флоре пацијената пре и након брушења зуба од посебног значаја, како би се објасниле инфламаторне промене и дале јасне смернице у спречавању настанка јатрогених инфекција (8).

С обзиром да је брушење зуба праћено механичким уклањањем ткива и иригацијом може се претпоставити да долази до промене унутар микрофлоре усне дупље пацијента, што потенцијално утиче на развој оралних инфекција и инфламаторних промена на гингиви са консекутивним ширењем у дубље структуре пародонта (9). Са друге стране, биоаеросол представља извор контаминације околине, те удисање микробног садржаја пореклом из усне дупље пацијента може бити извор заразе за терапеута и присутних у стоматолошкој ординацији (10, 11).

Јатрогени ефекат различитих метода брушења зуба може се потврдити праћењем клиничких параметара инфламације, пре и након саме процедуре препарације зуба (9). Инфламација гингиве може довести до пораста концентрације маркера инфламације у гингивалној течности (9), цитоморфометријских структуралних промена на гингивалном ткиву (12, 13) и промена у саставу оралне микробне флоре.

Комбинацијом клиничке студије и лабораторијских испитивања потенцијалног инфламаторног дејства различитог позиционирања демаркације препарације зуба на ткиво пародонта, пре свега гингиве, као и праћење промена у микробној флори изазваних брушењем зуба добијају се релевантни закључци применљиви у стоматолошкој пракси.

Познавање оралне микробне структуре и контрола инфекције у току брушења зуба могу утицати на избор стоматопротетског третмана у смислу оптимизације терапијских ефеката, одабира адекватне технике рада и врсте вештачких круница, превенције настанка инфективних и инфламаторних нежељених дејстава уобичајене клиничке процедуре брушења зуба као и превенције оштећења здравља терапеута.

## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1. БРУШЕЊЕ ЗУБА

#### 2.1.1. ПРИНЦИПИ ПРЕПАРАЦИЈЕ

Брушење зуба за фиксне протетске надокнаде базира се на следећим принципима:

- Максимално очување зубне супстанце,
- Заштита пародонцијума,
- Рубно затварање,
- Структурална трајност надокнаде,
- Ретенција и резистенција.

Брушење предњих зуба за метало-керамичку круницу обавља се уз поштовање свих принципа препарације зуба чиме се обезбеђује успех фиксне конструкције (14).

Брушење зуба одвија се у више фаза (Слика 1):

- Скраћивање клиничке круне зуба ради формирања међупростора између крунице и зуба антагониста,
- Постизање паралелитета и промена нагиба апроксималних површина зуба,
- Постизање паралелитета и уклањање конвекситета вестибуларних и оралних површина,
- Заобљавање прелаза између обрушених површина зуба,
- Формирање демаркације препарације зуба (15).



Слика 1. Брушење зуба (16).



### 2.1.2. ДЕМАРКАЦИЈА ПРЕПАРАЦИЈЕ ЗУБА

Демаркација препарације представља прелаз брушеног ка небрушеном делу зуба и може, у зависности од врсте вештачке крунице, бити линијска, у облику полужлеба или у облику степеника (5, 6).

Демаркација препарације у облику полужлеба употребљава се у случају израде ливених и метало-керамичких круница (17). У изради керамичких круница препоручује се демаркација у виду степеника или полужлеба, док линијски тип демаркације није препоручљив (18).

Позиција демаркације препарације у односу на маргинални руб гингиве може бити: супрагингивална, еквигингивална и субгингивална (5). Велики број истраживања указује на значај позиције демаркације препарације зуба на здравље пародонталног ткива (19, 20).

Супрагингивална позиција демаркације препарације зуба изводи се брушењем зуба изнад нивоа маргиналног руба гингиве. Оваква позиција демаркације најмање утиче на здравље ткива пародонта. Супрагингивална позиција омогућава контролу демаркације препарације, рубног затварања, естетике, и настанка каријесних лезија (21).

Раније се супрагингивална позиција демаркације препоручивала само при изради фиксне протетске надокнаде у премоларној и моларној регији (21). Међутим, развојем стоматолошких материјала и адхезивне стоматологије пружа се могућност формирања супрагингивалне позиције демаркације и у естетској зони (22).

Са аспекта пародонталног здравља, супрагингивална позиција демаркације представља најпогоднији тип препарације у поређењу са еквигингивалном и субгингивалном позицијом (23). Одржавање оралне хигијене је боље, ређе настаје секундарни каријес и оштећење ткива пародонта. Са друге стране, клиничка пракса је показала да се рецесијом гингиве и накупљањем пигмената у зони преласка фиксне надокнаде на небрушени део зуба нарушава изглед ових вештачких круница. Стога се супрагингивална степеничаста демаркација све више замењује оном у нивоу маргиналног руба десни (17). Предност супра и еквигингивалне демаркације препарације је мање оштећење меких ткива и лакша контрола рубног затварања надокнаде (24).

Субгингивална демаркација, са друге стране, отежава одржавање оралне хигијене, те је са пародонто-профилактичког становишта неповољније решење за маргиналну позицију руба вештачке крунице (7). Иако литературни подаци препоручују брушење ван зоне гингивалног сулкуса, субгингивална демаркација препарације неопходна је у чак 50% клиничких случајева:

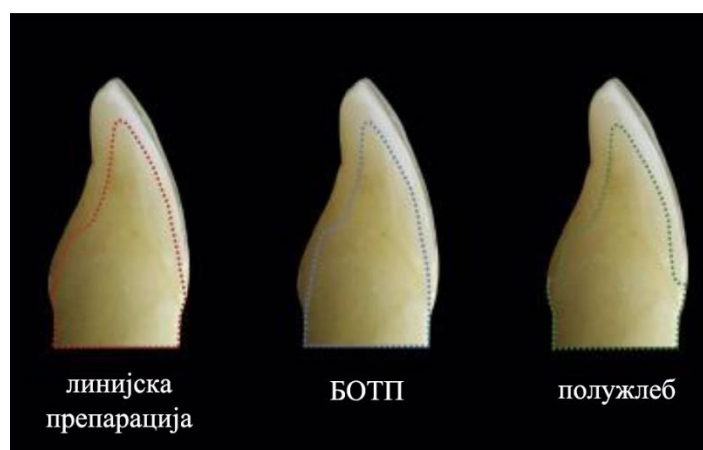
- Каријес или испун у пределу врата зуба,
- Субгингивална фрактура,
- Преосетљивост врата зуба,
- Претходне надокнаде са субгингивалном демаркацијом,
- Боља ретенција и резистенција кратке клиничке круне,
- Естетски разлози (14, 25, 26).

Из наведених разлога измештање границе препарације зуба из зоне гингивалног сулкуса са становишта свакодневне клиничке праксе није увек могуће спровести (27).

Са друге стране, гингивални индекс, индекс крварења гингиве и пародонтални индекси већих су вредности код субгингивалне позиције демаркације препарације зуба у односу на супрагингивалну позицију (6).

Последњих година уводи се термин „биолошки оријентисана техника препарације (БОТП)“ који обухвата позиционирање демаркације препарације унутар гингивалног сулкуса без клиничких оштећења пародонталних ткива (Слика 2).

Према новој класификацији брушење зуба за фиксне протетске надокнаде делимо на две врсте: препарација са дефинисаном маргином – хоризонтална препарација (степеничаста и полужлеб које су изван региона гингивалног сулкуса) и препарација без дефинисане маргине – вертикална препарација (БОТП) (линијска демаркација препарације унутар гингивалног сулкуса) (16).



Слика 2. Биолошки оријентисана техника препарације (28).

БОТП не ремети димензије биолошке ширине јер поштује границе гингивалног сулкуса без оштећења епителног припоја. Због вертикално оријентисане линије демаркације повећава се дебљина гингивалног ткива чиме се повећава и васкуларизација,

смањујући ризик од дислокације гингивалног руба уз постизање дуготрајности надокнаде (29, 30).

Вертикална препарација ефикасно се примењује у естетској и у постериорној зони зубног лука постижући клиничке и естетске резултате у погледу стабилности гингивалног ткива иако се маргине могу поставити унутар сулкуса (16).

## 2.2. ИНФЛАМАЦИЈА ГИНГИВЕ

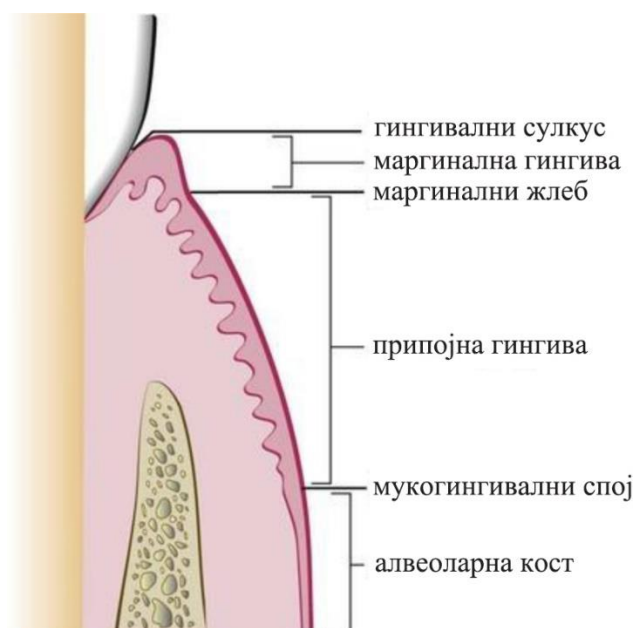
### 2.2.1. ГИНГИВА

Гингива је саставни део потпорног апарата зуба. Представља део оралне слузокоже усне дупље, обавија врат зуба и алвеоларни наставак костију вилица (31).

Клинички здрава гингива је корално розе боје, може варирати од светлије ка тамнијој у зависности од количине пигмената, ситнозрнасте структуре, глатка и сјајна (32).

Гингива се састоји из три дела (32):

- Маргинална (слободна) гингива – чини део гингиве који је слободан и окружује врат зуба, представља меки зид гингивалног сулкуса, ширине је око 1 mm.
- Припојна гингива – представља део гингиве који се наставља на маргиналну гингиву, чврста је и периостом је везана за алвеоларну кост.
- Интердентална гингива – представља део гингиве који испуњава простор између зуба. Њен облик зависи од контакта између суседних зуба, њиховог растојања и алвеоларног гребена и потенцијалне рецесије гингиве (Слика 3).



Слика 3. Структура гингиве (33).

Хистолошки састав гингиве чине епител гингиве, базална мембрана и крзно - везивно ткиво гингиве (31).

Епител гингиве је плочасто слојевите грађе са кератинизацијом. Део гингиве који испуњава гингивални сулкус чини епител без кератинизације, због чега је ово подручје изузетно осетљиво и има већу склоност ка инфламацији (31).

Орални епител се састоји из слојева: базални, спинозни, зрнасти и рожаста слој (31). Базални слој се налази између епитела гингиве и везивног ткива и садржи ћелије - кератиноците. Најдебљи слој је спинозни, који се састоји из великог броја ћелија полиедарног облика а идући према периферији се наставља у гранулозни слој. Рожаста слој је најповршнији, састоји се из спљоштених кератином богатих ћелија. Меланоцити, кератиноцити и Лангерхансове ћелије су саставни део гингивалног епитела (31, 34).

Меки зид гингивалног сулкуса чини знатно тањи сулкусни епител, који се састоји из само два слоја – базалног и спинозног. Сулкусни епител се наставља на припојни који се такође састоји из два слоја – базални и суббазални, простире се око врата зуба и испуњава под гингивалног сулкуса (31, 34). Гингивални епител има заштитну улогу јер спречава продор микроорганизама и штетних продуката у дубље слојеве, чиме се онемогућава оштећење везивног ткива гингиве (35). У развоју инфламације гингиве велики значај има настанак улцерација гингивалног сулкуса, којим се омогућава продор микроорганизама у дубља ткива гингиве (36). Брушењем зуба може доћи до појаве улцерација и оштећења гингивалног сулкуса, чиме се стварају улазна врата за развој инфекције.

Између епитела и везивног ткива гингиве налази се семипермеабилна базална мембрана, синтетисана од стране ћелија базалног слоја епитела (31). Везивно ткиво гингиве представља њен највећи део и састоји се из крвних и лимфних судова, нервних влакана, екстрацелуларног матрикса, ћелија и влакана (31, 37). Унутар везивног ткива гингиве налазе се различите ћелије од којих су најзначајније фибробласти. Фибробласти имају улогу у ремоделацији везивног ткива, активно учествују у фагоцитози и производњи екстрацелуларне супстанце. Поред фибробласта, саставни део крзна су бројне ћелије специфичног и неспецифичног имуног система, одакле је главна улога везивног ткива гингиве - заштитна (34).

Између унутрашње површине маргинална гингиве и зуба налази се гингивални сулкус, дубине 1–2mm, у коме субепително везивно ткиво гингиве лучи гингивалну течност (38).

Гингивална течност је физиолошки трансудат серума. Састав гингивалне течности потиче из гингивалног плексуса крвних судова, течност затим пролази кроз хистолошке слојеве ткива гингиве и излучује се у гингивални сулкус у малој количини (39).

У инфламацији ткива гингивална течност постаје инфламаторни ексудат. Секреција гингивалне течности је стога већа у инфламаторним стањима гингиве и директно пропорционално зависи од степена запаљења. Гингивална течност има двојаку улогу (31, 40):

1. Испирање сулкуса, фибринолитичка и антимикробна активност због присуства леукоцита и имуноглобулина,
2. Представља подлогу за колонизацију микроорганизама и утиче у стварању каменца због присуства електролита.

У саставу гингивалне течности налазе се инфламаторни медијатори локалног порекла, медијатори разградње ткива и антитела, настали као реакција организма на присутну инфламацију, чија се концентрација мења са развојем болести (39).

Медијатори инфламације, цитокини из ћелија имуног система, леукоцити, протеини, продукти разградње ткива могу се наћи у гингивалној течности и од посебног су значаја у дијагностици гингивалних и пародонталних обољења (31, 39, 41).

Истраживања показују да је изоловано преко 90 различитих биомаркера из узорака гингивалне течности код испитаника са деструкцијом ткива пародонта (42).

У испитивањима гингивалне и пародонталне инфламације често се користи концентрација различитих маркера инфламације као што су интерлеукини (интерлеукин 1 бета- *IL-1 $\beta$* ), ензими (матрикс металопротеиназа – *MMP-9*, алкална фосфатаза, аспартат аминотрансфераза, еластаза итд.), фактор тумор некрозе алфа (*TNF $\alpha$* ) из узорака гингивалне течности (43).

Код присутне инфламације гингиве јавља се повећана пермеабилност васкулатуре и пропуштањем плазме последично долази до стварања едема, што узрокује повећање количине гингивалне течности (44, 45). Неинвазивна техника прикупљања узорака и једноставно анализирање пружају могућност примене гингивалне течности у дијагностичке сврхе (46).

## 2.2.2. ПАРОДОНТАЛНА ОБОЉЕЊА

Гингивитис представља инфламаторно обољење ткива гингиве, изазвано локалним или системским факторима, са клиничким знацима запаљења – црвенило, оток, промена облика и конзистенције гингиве (37, 47, 48) (Слика 4).

Гингивитис је реверзибилна инфламација ткива, међутим, даљом прогресијом обољења може довести до захватања дубљих структура пародонта и трајних промена које воде ка настанку пародонтопатије (49).

Етиологија пародонталних обољења је мултифакторијална. У највећој мери настају под утицајем микроорганизама оралног биофилма, међутим у великој мери зависе и од имунолошког одговора организма и утицаја животне средине (50).



**Слика 4.** Гингивитис.

Присуство различитих врста микроорганизама у оралном биофилму изузетно утиче на иницијацију оштећења гингивалног ткива. Фактори који могу фаворизовати инфламацију су локални – стоматолошке рестаурације и надокнаде, зубни каменац и конкременти, ортодонтске аномалије, лоше навике; и системски – системска обољења, наследни фактори, имунодефицијенција и исхрана (31, 51).

Субгингивални орални биофилм представља колонију великог броја различитих микроорганизама и њихових продуката на површини зуба и локализован је у гингивалном сулкусу. Кад је ткиво гингиве здраво, присутан је у мањој количини (31). Међутим, већи број микроорганизама и дуже присуство оралног биофилма, као и промена његовог састава, могу довести до повећања његове патогености и почетне инфламације ткива пародонта (31, 52).

У етиопатогенези гингивитиса и пародонтопатије микроорганизми представљају основне декланширајуће факторе, међутим велику улогу има и имуни одговор домаћина (53). Реакција ткива на присуство микроорганизама из оралног биофилма је пролиферација бројних ћелија имуног одговора, неутрофила, макрофага, лимфоцита, и њихова последична инфилтрација у дубљим слојевима гингиве. Као одговор ћелија имуног система на присутну инфекцију ткива ослобађају се штетни ензими и настаје оштећење колагена, што у даљем току последично изазива вазодилатацију крвних судова и едем гингивалног ткива. Услед повећања хидростатичког притиска због васкуларне перме-

абилности крвних судова долази до појачаног излучивања гингивалне течности. Као последица реакција које се одигравају у инфламираном ткиву развија се клиничка слика гингивитиса (53).

Након иницијалне и ране фазе гингивитиса, прогресијом инфламације долази до узнатредовале фазе и даљег развијања ћелијског инфилтрату у везивном ткиву. Неутрофили ослобађају лизозомалне ензиме и иницирају даља оштећења колагених влакана. Последично долази до продубљивања гингивалног сулкуса и формирања џепа, а клинички знак јесте крварење при сондирању. У случају нелечења, инфламација прелази у своју иререверзибилну фазу, захвата дубља ткива пародонта што једносмерно води ка развоју пародонтопатије (44, 53). Деструкција и регенерација ткива пародонта настају узјамним деловањем антиинфламаторних и проинфламаторних фактора, у зависности од јачине патогеног агенса (54).

Главне ћелије инфилтрату иницијалне инфламације ткива гингиве су ћелије урођеног имуног система, неутрофилни гранулоцити, макрофаги, лимфоцити и плазма ћелије (44). Стимулација ових ћелија иницира развој инфламације ткива. Примарна реакција на присуство хемотактичких медијатора (цитокини, хемокини), или продуката бактерија јесте миграција неутрофила у гингивални сулкус, који вазодилатацијом крвних судова омогућавају даљу миграцију ћелија инфламаторног одговора (53, 55).

Неутрофили заједно са осталим ћелијама ћелијског инфилтрату учествују у процесу фагоцитозе бактерија и њихових штетних продуката (31). Даљом прогресијом долази до мењања ћелијског инфилтрату и укључују се ћелије специфичног имуног одговора, лимфоцити. Након контакта са антигеном, лимфоцити се диференцирају у Б лимфоците, који учествују у реакцијама раног сензибилитета, и Т лимфоците који учествују у позном сензибилитету (56). Лимфоцити продукују антитела која су специфична за одређене антигене те долази до њиховог уништења. Међутим, ова реакција праћена је и ослобађањем бројних медијатора инфламације који дубље оштећују ткиво гингиве (31).

Проинфламаторни медијатори који учествују у даљој прогресији инфламације су цитокини породице интерлеукина 1, хемокини, *TNF $\alpha$* , матрикс металопротеиназе и простагландини (53, 57, 58).

Значи, микроорганизми оралног биофилма иницирају настанак инфламације, а имунолошки процеси који се дешавају у ткиву гингиве укључују велики број проинфламаторних и антиинфламаторних медијатора који непосредно доводе до оштећења ткива (53, 59). Перзистирање микроорганизма оралног биофилма и каскада инфламаторних и имунолошких реакција организма доводе до прогресије инфламације гингиве најпре пре-

ласком акутног у хронични ток, а потом и захватањем дубљих структура пародонта са развојем реверзибилних оштећења и последичним губитком алвеоларне кости (53, 60). Прогресијом инфламације долази до даљег оштећења колагених влакана, губитка потпоре зуба и формирања зјапа између зуба и коронарног дела припојног епитела гингиве. Настаје апикално повлачење припојног епитела гингиве, што доводи до продубљивања гингивалног сулкуса, а истовремено се одвија и пролиферација ћелија сулкусног епитела и настанак едема маргиналног руба гингиве. На овај начин онемогућава се елиминација оралног биофилма и настаје пародонтални џеп. Даљом прогресијом инфламације долази до захватања периодонцијума и алвеоларне кости (31, 61).

### 2.2.3. ОШТЕЋЕЊЕ ГИНГИВЕ ИЗАЗВАНО БРУШЕЊЕМ

Постоји значајна повезаност између протетике и пародонтологије, јер је здравље пародонта предуслов за успех протетске надокнаде (62-64). Планирање протетске рехабилитације пацијента од изузетног је значаја за дуготрајност и стабилност протетске конструкције (7). Успех терапије условљен је адекватном маргиналном препаратацијом (65). Дуготрајност фиксних протетских надокнада у великој мери зависи од стања пародонцијума брушених зуба због осетљивости слузокоже у овој регији, подложности механичкој трауми и потенцијалној бактеријској контаминацији (66, 67). Стога је очување гингивалног ткива током брушења зуба императив (68, 69).

Припојни епител и везивно ткиво гингиве фиксирано за врх алвеоларне кости и површину корена зуба представљају биолошку ширину гингиве. Биолошка ширина се дефинише као растојање између најдубље тачке гингивалног сулкуса и гребена алвеоларне кости (22). Утврђено је да биолошка ширина у просеку износи 2,04 *mm*, од чега 1,07 *mm* чини везивно ткиво, а 0,97 *mm* је чини припојни гингивални епител (70). Међутим, новија истраживања показују да је просечна вредност биолошке ширине 2,15–2,30 *mm* (19). Главна улога биолошке ширине гингиве је заштита периодонталног лигамента и дубљих ткива пародонта (71). Оштећење биолошке ширине најчешће настаје као последица брушења зуба. Самим тим, ремећење њеног нормалног функционисања може довести до појаве хроничне упале гингиве, запаљења периодонталног лигамента и губитка алвеоларне кости (70). Уколико се гингивални руб протетске надокнаде смести највише 0,5 *mm* испод руба гингиве, неће узроковати ресорпцију алвеоларне кости (72).

Најчешћи јатрогени ефекти брушења зуба су механичка оштећења гингиве, рецесија маргиналне гингиве, акутна и хронична инфламација гингивалног и пародонталног



тквива (16, 73). Механичка траума тквива карактерише се одвајањем гингивалног епитела и поновним спајањем при оздрављењу тквива. Међутим, траума може довести до хистолошких промена везивног тквива које изазивају апикално померање гингиве (6). Јатрогени ефекат различитих метода брушења зуба може се клинички потврдити праћењем гингивалног индекса и индекса крварења, пре и након саме процедуре препарације (74).

Лоша протетска надокнада штетно делује на мека орална тквива и може довести до прогресије и погоршања постојеће пародонталне болести. Неравне и грубе површине надокнада представљају погодно тло за микробну инвазију, стварање наслага и консекутивно повећање броја микроорганизама на фиксној протетској контрукцији. Последице оваквих утицаја могу бити погоршање здравља оралних тквива, настанак гингивитиса и следствене пародонтопатије (75-77). Фиксне протетске надокнаде могу бити предиспонирајући фактор за настанак запаљења гингивалног тквива. Услед присуства бактеријског биофилма на рубовима протетске контрукције долази до одговора тквива у виду повећања примарних запаљенских ћелија организма, производње цитокина и неуропептида. Након активирања урођеног имуног одговора, даљом прогресијом инфламације, долази до активације стеченог имуног одговора. Временом услед пролонгирања инфламације, настају крварење гингиве, оток и промена структуре које воде ка тежим формама гингивитиса. Гингивитис даље доводи до преласка инфламације на пародонтална тквива, настанка пародонтитиса, а продором инфламације у алвеоларну кост и до развоја пародонталних џепова (56, 78).

Постављање демаркације препарације дубоко у гингивалном сулкусу са оштећењем биолошке ширине неповољно је за здравље пародонта, и резултира дуготрајним задржавањем оралног биофилма због немогућности чишћења. Акумулација оралног биофилма доводи до сталних иритација тквива гингиве и следственог развоја инфекције (22). Резултати других истраживања указују да такав вид демаркације доводи до квалитативних и квантитативних промена у микрофлори, промена у гингивалној течности, као и повећаних вредности гингивалних и пародонталних индекса (79). Schätzle и сар. у лонгитудиналној студији спроведеној током 26 година, испитивали су утицај позиције демаркације препарације на здравље пародонта. Показали су израженије оштећење тквива пародонта, у виду гингивалне рецесије и обилнијег крварења при сондирању, код субгингивалних препарација у односу на супрагингивалне (80).

## 2.3. МАРКЕРИ ИНФЛАМАЦИЈЕ

За испитивање гингивалне инфламације могу се користити различите методе, као што су клинички параметри, биохемијски, микробиолошки и генетски маркери (49).

### 2.3.1. КЛИНИЧКИ МАРКЕРИ ИНФЛАМАЦИЈЕ

Најчешће се испитују клинички параметри инфламације, који се заснивају на макроскопским променама и визуелној процени стања гингивалног ткива (51). Клинички параметри инфламације испитују се коришћењем индекса за процену стања гингиве – (*papillary marginal attached gingival index*) *PMA* индекс, гингивални индекс и индекс крварења гингиве (37).

Гингивални индекс користи визуелну процену стања гингиве уз стимулацију меког зида гингивалног сулкуса пародонталном сондом (81).

Индекс крварења гингиве јесте параметар који даје јасан увид у стање здравља гингивалног ткива. Клинички и хистолошки подаци указују да индекс крварења гингиве може доказати постојање инфламације гингиве пре развоја клиничке слике гингивитиса. Хистолошки подаци показују да се крварење при сондирању јавља као последица присуства ћелијског инфилтрата у везивном ткиву гингиве, који се јавља у раној фази инфламације (51, 82).

*CPITN* (*Community periodontal index of treatment needs*) индекс користи се за испитивање здравља пародонта почевши од здравог пародонта и каскадно обухватајући крварење гингиве, присуство каменца, стање и дубину пародонталних џепова. Такође, овим индексом описује се потреба за лечењем оштећених ткива пародонта. У испитивању и оцењивању стања пародонта користи се пародонтална сонда (83, 84).

### 2.3.2. БИОХЕМИЈСКИ МАРКЕРИ ИНФЛАМАЦИЈЕ

Адекватно и ефикасно лечење гингивитиса зависи у великој мери од раног откривања инфламаторних промена и ткиву гингиве (85). Рано откривање инфламације, поред клиничких параметара, може се доказати присуством различитих биохемијских маркера у гингивалној течности и пљувачки. Гингивална течност је посебно погодна за различита биохемијска и имунолошка испитивања инфламације јер пружа могућност примене неинвазивних техника без икакве нелагодности за пацијента (86).

С обзиром да је гингивитис реверзибилно запаљење које настаје као последица колонизације бактерија и стварања оралног биофилма (87), бактеријски производи доводе

до активације ћелија имуног система, моноцита/макрофага, који даље врше секрецију медијатора инфламације и цитокина *IL1*, *IL-6*, *TNF $\alpha$* , и ослобађање ензима матрикс металопроотеиназа (*MMPs*) (88).

Доказано је да постоји повезаност између гингивитиса и концентрација цитокина и ензима у гингивалној течности и пљувачки, који временом могу довести до прогресије инфламације и дијагнозе пародонтопатије (89). Квалитативни и квантитативни састав гингивалне течности разликује се код присутне инфламације гингиве и код здравог ткива пародонта. Концентрације одређених протеина показују веће вредности код присутне инфламације гингиве у односу на здрав пародонт - *IL-1 $\beta$* , *MMP-9*, фактори комплемента, фибронектин, лакотрансферин, док су неки протеини мањих концентрација код присутне гингивалне инфламације – цистатин-Б, цистатин-С (90, 91).

### 2.3.2.1. *Interleukin 1 beta - IL-1 $\beta$*

У инфламацији пародонталног ткива значајну улогу имају цитокини, у виду иницијације и прогресије запаљења ткива пародонта. Проинфламаторни, антиинфламаторни цитокини и цитокински рецептори укључени су у функцију имуног система (92).

Интерлеукини представљају протеине који везивањем за специфичне рецепторе омогућавају комуникацију између леукоцита. *IL-1* је проинфламаторни цитокин који учествује у бројним инфламаторним болестима, деловањем на ћелијску пролиферацију, диференцијацију, функцију имунокомпетентних ћелија и експресију других проинфламаторних гена. Синтетишу их бројне ћелије као што су неутрофили, леукоцити, моноцити, макрофаги, фибробласти, што указује на њихову велику улогу у функцији имуног система (93).

*IL-1* укључује цитокине са агонистичком активношћу (*IL-1 $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-18*, *IL-33*, *IL-36 $\alpha$* , *IL-36 $\beta$* , и *IL-36 $\gamma$* ), антагонистичке рецепторе (*IL-1Ra*, *IL-36Ra*, и *IL-38*) и антиинфламаторни цитокин (*IL-37*) (94, 95).

Цитокини *IL-1* учествују у патофизиологији централног нервног система и неуродегенерацији, прогресији рака, одржавању хомеостазе, гастроинтестиналне и кардиоваскуларне патологије (95).

Једни од најзначајнијих цитокина који посредују у урођеном имунолошком одговору организма су *IL-1 $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF $\alpha$* , од којих је *IL-1 $\beta$*  посебно карактеристичан јер се јавља у раној фази инфламације ткива (96). У регулацији имуног одговора у обољењима пародонта важну улогу имају *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$* , *IL6* (97).

Процеси који утичу на иницијацију и прогресију инфламаторног одговора, као што су активација Т и Б лимфоцита, омогућавање миграције леукоцита, стимулација продукције медијатора инфламације, стимулација остеобласта и апоптозе, настају активацијом интерлеукина *IL-1* (58). Као што се види из претходног, *IL-1* је цитокин са два облика, *IL-1 $\alpha$*  и *IL-1 $\beta$* , са антагонистичком активношћу, док је антагонист *IL-1* рецептора конкуритивни инхибитор (58). У инфламацији пародонталног ткива је актуелан облик *IL-1 $\beta$*  (98). *IL-1 $\alpha$*  и *IL-1 $\beta$*  се синтетишу као биоактивни молекули, налазе се у ћелији као прекурсори и *IL-1 $\alpha$*  је одмах биолошки активан (99). Међутим, експресија *IL-1 $\beta$*  је строго регулисана (100). Синтетише се као *31kDa precursor protein (pro-IL-1 $\beta$ )*. Инфламазоми утичу на сазревање *IL-1 $\beta$*  уз помоћ ензима каспаза-1 (95, 101). Доказано је да активација инфламазома настаје посредством периодонтопатогена *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* и *Porphyromonas gingivalis* (102).

Цитокин *IL-1 $\beta$*  је кључни медијатор инфламаторног одговора организма произведен од стране ћелија урођеног имуног система, посебно моноцита/макрофага. Значајан је за отпорност и одговор домаћина на патогене, међутим може довести до прогресије акутних повреда ткива и додатних оштећења током хроничне болести (103).

Због своје функције у деградацији колагена и ресорпцији алвеоларне кости *IL-1 $\beta$*  је један од најважнијих цитокина код инфламаторних пародонталних процеса (104). *IL-1 $\beta$*  је проинфламаторни медијатор запаљења у инфламаторном одговору домаћина код запаљења пародонталног ткива. Његова улога огледа се у активацији протеиназе, колагеназе, стимулацији експресије простагландина Е2, деградацији екстрацелуларног матрикса, и побољшању ресорпције костију код запаљења пародонта (92). Проинфламаторно дејство *IL-1 $\beta$*  огледа се и у повећању експресије адхезивних молекула на ендотелним и мезенхимским ћелијама, чиме се иницира покретање инфламаторних ћелија у екстраваскуларни простор и ткива из циркулације, што потенцира развој инфламације (105). Goldbach-Mansky и сар. и Greten и сар. указују да након микробне (липополисахаридне) стимулације моноцита долази до брзог раста *IL-1 $\beta$  mRNA* за 15 минута у крви, постижући максимум концентрације након 4 сата, после чега следи постепено опадање (106, 107).

### 2.3.2.2. *Vascular endothelial growth factor – VEGF*

*VEGF* је гликопротеин који синтетишу ендотелне ћелије, важан у пролиферацији ове врсте ћелија и ангиогенези (108-110).

Присуство анаеробних бактерија у гингивалном сулкусу, инфилтрација запаљенских ћелија, поремећај микроциркулације због присуства едема ткива, само су неки од фактора који изазивају хипоксију ендотелних ћелија пародонта (111-114). Синтетисање *VEGF* настаје као последица оштећења ендотелних ћелија, поремећаја микроциркулације, последичне активности цитокина и ендотоксина (115, 116). Његова синтеза је под утицајем *hypoxia-inducible factor 1 alpha - HIF-1α* који настаје као одговор организма на смањење концентрације кисеоника у ћелијама (117).

Последица повећане експресије *HIF-1α* и последично повећање концентрације *VEGF* јесу хипоксичне промене у ћелијама и ткивима (118).

У нормалним условима ензим пролил хидроксилаза омогућава везивање пролина за *HIF-1α* што последично изазива његову разградњу. Хипоксија ткива онемогућава дејство пролил хидроксилазе чиме се спречава разградња *HIF-1α*, што последично доводи до акумулације у ћелијама (119).

Пародонтална ткива у инфламацији показују значајно оштећење васкуларизације (120). Инфламирано ткиво пародонта може имати утицај на ангиогенезу (121, 122). *VEGF* утицајем на васкуларну пермеабилност и ангиогенезу може испољити проинфламаторно дејство (109).

*VEGF* се може користити као маркер оштећења ткива пародонта из узорака гингивалне течности, и може помоћи у градацији инфламације десни (123-125).

### 2.3.2.3. *Matrix metalloproteinase 9 – MMP-9*

Матрикс металопротеиназе (*MMPs*) су породица ензима које производе ткива домаћина, а која су одговорна за деградацију већине протеина екстрацелуларног матрикса током органогенезе, раста и развоја ткива, зарастања рана, морфогенезе и ерупције зуба (126, 127).

*MMPs* су цинк калцијум зависне ендопептидазе са важном улогом у физиолошким и патолошким процесима, које су способне да разлажу не само протеине екстрацелуларног матрикса, већ и нематриксне протеине, укључујући цитокине (128). Деградација протеина екстрацелуларног матрикса од стране протеиназа је кључна карика пародонталних обољења и може бити изазвана микроорганизмима у зубном плаку и из ћелијских извора

(129). Оба ова типа протеаза доприносе каскадној активацији *MMPs*, што доводи до деградације пародонта (130). Штавише, микробне протеазе стимулишу протеолитичке активаторе латентних хуманих про-*MMPs*, повећавајући њихову секрецију у резидентним ћелијама гингиве и изазивајући деградацију екстрацелуларних колагена. *MMPs* осим што су ензими укључени у ремоделацију екстрацелуларног матрикса могу деловати и интрацелуларно, те су способне да активирају факторе раста, рецепторе на површини ћелија и адхезивне молекуле (131).

*MMPs* су класификоване на основу специфичности супстрата, односно деградираних матриксних протеина. Постоји 28 чланова ове фамилије, од којих су 25 присутне код људи и подељене су у пет субфамилија (132, 133). Колагеназе су *MMP-1*, *MMP-8*, *MMP-13* и *MMP-18*, које могу разградити интерстицијски колаген *I*, *II* и *III*. *MMP-1*, коју синтетишу макрофаги, фибробласти и дендритичне ћелије помаже ћелијском преживљавању. *MMP-8* луче неутрофили и она има антитуморско дејство и улогу у регулисању хормонских рецептора (134). Желатиназа А (*MMP-2*) и желатиназа Б (*MMP-9*) су два ензима одговорна, између осталог, за деградацију колагена типа *IV* у базалној мембрани (135). *MMP-9* има молекулску тежину од 92 *kDa* и налази се у врло малим количинама у нормалним ткивима, а луче је дендрити, хематопоетске ћелије, макрофаги, неутрофили, фибробласти и лимфоцити (136). *MMP-3*, *MMP-10* и *MMP-11*, такође названи стромелизини, укључени су у дигестију одређених молекула у екстрацелуларном матриксу и базалној мембрани (137). *MMP-14* је одговорна за ћелијски раст и стимулацију адипогенезе и ангиогенезе (137).

*MMPs* регулишу више патолошких процеса у организму, укључујући онколошку патологију (агресивност тумора, метастазирање, прогноза тумора) (132). *MMP-2* се налази у тврдим зубним ткивима, олакшава разградњу глеђи киселинама, деградацијом протеина глеђи као што је амелогенин (133). Повећане активности *MMP-2* и *MMP-9* су примећене у апикалним лезијама након некрозе пулпе, што показује њихову улогу у развоју апикалног пародонтитиса. Код ортодонтских пацијената високи нивои *MMPs*, посебно *MMP-2* и *MMP-9*, пронађени су на местима напетости и компресије зуба подвргнутих ортодонтском третману (138).

Активност *MMPs* је контролисана променама у деликатној равнотежи експесије и синтезе са једне стране, и дејства њихових главних ендогених инхибитора, названих ткивни инхибитори матриксних металопротеиназа (*TIMPs*), са друге стране (126).

У гингивалној течности и пљувачки су као маркери инфламаторних процеса доказане различите *MMPs*. Sorsa и сар. и Uitto и сар. наводе *MMP-8* као главну интерсти-

цијалну колагеназу у запаљенским процесима гингиве (139, 140). Gangbar и сар. и Golub и сар. су први демонстрирали да гингивална течност инфламиране гингиве садржи *MMP-13* (141, 142). У оралним течностима (гингивални флуид, пљувачка и периимплантатна течност) доказано је присуство *MMP-1,2,3,7,8,9,12,13,14,25,26*, као и ткивних инхибитора *MMPs* у мањим концентрацијама (143-145). У највећем броју студија о дијагностичкој употреби *MMPs* и њиховој регулацији, циљни ензими били су *MMP-8,9,13*, као и ткивни инхибитор *MMP-1* (143, 146-149). Andonovska и сар. су детектовали ензиме (*MMP-1,8,13*) у запаљеном процесу, чији интензитет директно зависи од концентрације *MMPs* у патолошки измењеном ткиву (126).

*MMP-9* је протеолитички ензим који разграђује денатурирани колаген, посебно колаген типа *IV*, главну компоненту базалне мембране ћелија, као и протеогликане и еластин (150). Његово ослобађање из активираних моноцита, лимфоцита и полиморфонуклеарних леукоцита је строго регулисано цитокинима, тако да се она лучи као проензим који је неактиван док се протеолитичким ензимима (стромелизин-1, *MMP-2* и други *MMP*) не уклони пропептидни део (151). *MMP-9* се лучи у комбинацији са специфичним инхибитором *TIMP-1*. Неравнотежа између *MMP-9* и *TIMP-1* доводи до прекомерне деградације ткива, уобичајено код хроничних инфламаторних болести укључујући хронични пародонтитис (152-155).

### 2.3.3. МИКРОБИОЛОШКИ ПАРАМЕТРИ ИНФЛАМАЦИЈЕ

#### 2.3.3.1. Орална микрофлора

Микробну флору усне дупље настањује преко 700 различитих врста бактерија (156).

Усна дупља, иако мала средина, према садржају микробне флоре представља део организма са највећом количином различитих микроорганизама. Уобичајену микробну флору чине симбиотске микробне заједнице, а најчешће су присутне Грам позитивне и Грам негативне бактерије рода коке и штапићи, као и гљивице и протозое (31, 157).

Оралну микрофлору или орални микробиом чине заједнице колонизованих микроорганизама у усној дупљи. Микробиом чине заједнице основног микробиома, који је присутан код свих људи, и променљивог микробиома на чији састав утичу физиолошке разлике појединца и генотипске карактеристике. Значајна улога оралног микробиома јесте одржавање хемостазе у усној дупљи, заштита и очување здравља оралних ткива (156).

Резидентну флору усне дупље чине микроорганизми који су њени стални становници, док транзиторну флору чине микроорганизми који се јављају повремено. Транзи-

торну флору чине условно патогени микроорганизми, и у случају промене резидентне флоре могу изазвати обољење (158).

Присуство резидентне микробне флоре у усној дупљи је значајно за одржавање здравља на више начина: спречава се колонизација патогених микроорганизама блокирањем рецептора на ћелијама, секрецијом муцина и метаболичких продуката, и улогом неких бактерија у стимулацији имуног система организма. Међутим, под одређеним условима микроорганизми резидентне флоре могу да изазову опортунистичке инфекције, често као последица трауме, продором микроорганизама у ткиво или крвоток (158).

У усној дупљи налазе се коменсалне бактерије које су у симбиози са људским организмом. Коменсалне бактерије нису патогене, и спречавају колонизацију патогених врста (159). Међутим, различите промене које се дешавају у усној дупљи, као што је промена *pH* вредности, промена температуре, интеракција бактерија, утицај исхране, дејство механичких сила на орална ткива, могу утицати на промену односа између коменсалних и патогених бактерија и њихове последичне инвазије (160).

У здравој усној дупљи налазе се:

1. Грам позитивне бактерије:

- Коке: *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Stomatococcus*, *Abiotrophia*
- Бацили: *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Pseudoramibacter*.

2. Грам негативне бактерије:

- Коке: *Neisseria*, *Moraxella*, *Veillonella*
- Бацили: *Haemophilus*, *Eikenella*, *Campylobacter*, *Leptotrichia*, *Capnocytophaga*, *Desulfobacter*, *Fusobacterium*, *Desulfovibrio*, *Prevotella*, *Selemonas*, *Wolinella*, *Treponema*, *Simonsiella* (161).

Најзаступљенији микроорганизми усне дупље који у великој већини живе у симбиози и заједници са домаћином као основни микробиом су: *Streptococcus*, *Haemophilis*, *Eikenella*, *Actinomyces*, *Lactobacterium*, *Nisseria*, *Veillonella*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Porphromonas*, *Treponema*, *Staphylococcus*, *Eubacteria*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Propionibacterium* и *Peptostreptococcus* (162, 163).

Микробни састав усне дупље у великој мери зависи од здравља ткива пародонта. У највећем проценту у здравом ткиву пародонта заступљене су коке (70%), бацили и други облици бактерија. Код пародонталне болести проценат кока се знатно смањује (20%) у корист филаментозних облика бактерија (31).



### 2.3.3.2. Орални биофилм

Орални микробни биофилм може да се формира на различитим деловима усне дупље. У зависности од параметара који погодују њиховим условима развоја, могу бити локализовани на површини зуба, као супрагингивални орални биофилм (плак), у гингивалном сулкусу, као субгингивални орални биофилм (плак), на површини језика, букалној гингиви, поду усне дупље (164).

Колонизација микроорганизама у великој мери зависи од присуства кисеоника и угљен диоксида, па њихова локализација зависи од услова средине. Микробна флора обухвата групу аероба, анаероба, факултативних анаероба, микроаерофила и капнофила (165).

Орални биофилм се састоји из великог броја различитих микроорганизама који формирају микробне заједнице, продуката микроорганизама и полимера пореклом из пљувачке (166).

Формирање оралног биофилма одвија се у више фаза. У свакој од њих доминирају различите врсте бактерија у зависности од сазревања биофилма и стварања услова за њихову колонизацију.

Прва фаза представља формирање стечене денталне пеликуле, која настаје непосредно након чишћења зуба, након чега следи иницијална колонизација површине зуба микроорганизмима (167).

Колонизација бактерија и њихова адхезија у почетној фази формирања оралног биофилма зависи од слабих електростатских веза (168). У следећој етапи долази до формирања екстрацелуларног матрикса који представља матрицу, састављену од макромолекула, чиме се омогућава везивање микроба за површину (169).

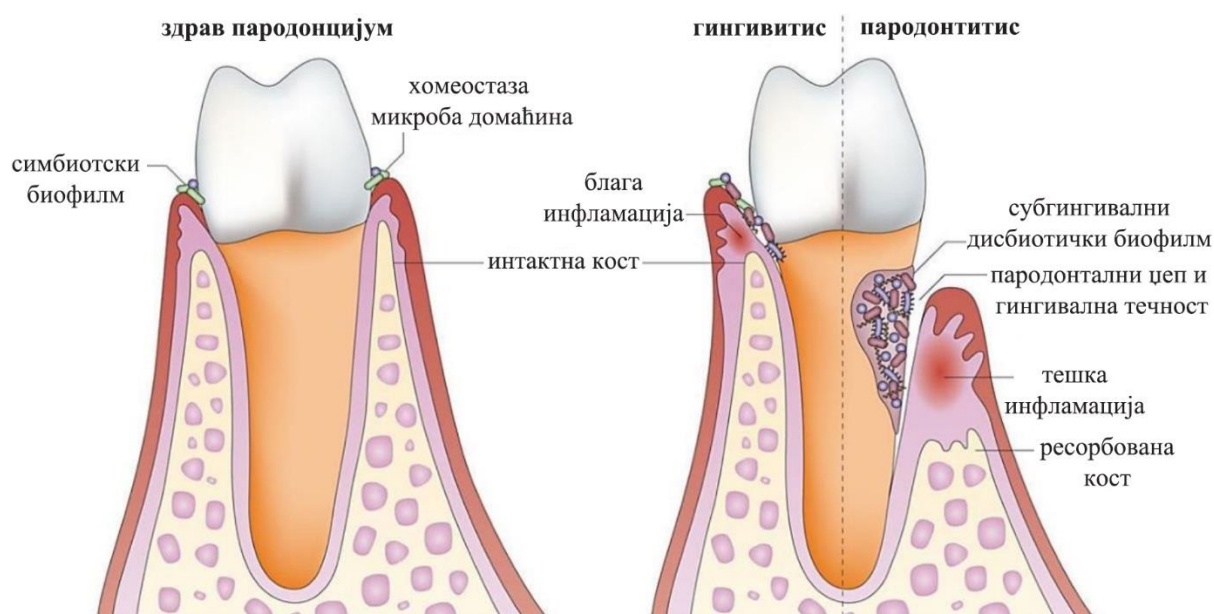
У највећој мери иницијална колонизација одвија се захваљујући специфичним бактеријским фимбријама (продужецима), које садрже адхезине и омогућавају припајање бактерија за површину зуба (167, 170).

У овој фази, иницијалне бактерије које насељавају орални биофилм су Грам позитивне коке и бацили (90-100%), у највећој мери *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis* и *Streptococcus oralis* (166).

У следећој фази одвија се коадхезија других бактеријских колонија за већ формиран орални биофилм и сазревање плака порастом Грам негативних анаеробних бактерија – *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Capnocytophaga*, чиме долази до мењања аеробне флоре у анаеробну (37, 167).

Последња фаза представља мултификовање присутних колонија микроорганизама и стварање мешовитог биофилма са колонизацијом фузобактерија, спирохета, актиномиција (31, 167).

Зрели орални биофилм се састоји из микроорганизама и њихових продуката у екстрацелуларном матриксу. Унутар биофилма одигравају се метаболички процеси, присутне су ниже концентрације кисеоника и ниже *pH* вредности, што погодује даљем развоју анаеробних врста (171, 172) (Слика 5).



Слика 5. Инфламација изазвана оралним биофилмом (173).

### 2.3.3.3. Супрагингивални орални биофилм

Супрагингивални плак својим изгледом подсећа на структуру налик жежу са радијалном организацијом. Површину зуба најпре колонизују иницијални колонизатори, *Actinomyces spp.* и *Streptococcus spp.*, након чега следи секундарна колонизација *Corynebacterium spp.*, бактерије са највећим уделом у биофилму, које својом организацијом формирају прстенасту структуру (174).

Процентуално велики удео у супрагингивалном оралном биофилму чине стрептококе – група *S. mitis/oralis/infantis*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*, и *S. cristatus* (175), док се у усној дупљи налази чак 36 оралних врста стрептокока (176).

*Haemophilus*, *Aggregatibacter*, и *Neisseriaceae* колонизују периферију супрагингивалног биофилма која је богата кисеоником и хранљивим агенсима, и на тај начин се омогућава стварање анаеробног окружења у самом центру супрагингивалног оралног

биофилма, чиме се стварају погодни услови за колонизацију анаеробних бактерија *Carnocytophaga*, *Leptotrichia*, и *Fusobacterium* (177).

Састав супрагингивалног и субгингивалног оралног биофилма је доста сличан у стањима здравља без инфламације, са разликама које условљавају фактори средине (178). Доказано је присуство 13 бактеријских родова у 85% удела супрагингивалног плака и 80% удела субгингивалног оралног биофилма здравих испитаника (177).

Формирање микробног биофилма зависи и од комуникације бактерија унутар микробне заједнице помоћу „*quorum sensing*“ механизма, односно механизма сигналних молекула, чиме се стимулише колонизација микоорганизама, продукцијом различитих молекула. Супротно томе, поред бактеријског синергизма, у зависности од преосталих врста, појављује се и антагонистички ефекат између различитих бактерија (165, 179).

Једна врста синергизма јавља се између периодонтопатогених бактерија *Fusobacterium nucleatum* и *Porphyromonas gingivalis*, у виду повећања преживљавања *Porphyromonas gingivalis* у аеробним условима у оралном микробном биофилму (180).

Велики је број доказа синергизма између периодонтопатогених бактерија *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola*, у виду повећане вируленције у заједничкој култури у односу на моноинфекцију датих бактерија (181).

Антагонистички ефекат је примећен код великог броја бактерија, као што је антагонизам између *Streptococcus mutans* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Porphyromonas gingivalis* и Грам позитивних бактерија *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Corynebacterium spp* (182).

Промене које се дешавају у непосредној околини оралних микробиота, као што су блага померања зуба код ортодонтских терапија, могу утицати на промену самог састава бактерија у ћелијама у виду пораста периодонтопатогених бактерија, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Tannerella forsythia* (183).

Ницање и губитак зуба, ношење мобилних протетских надокнада, присуство реставрација и примена других стоматолошких третмана, могу утицати на колонизацију различитих врста микроорганизама (161).

Орална слузокожа представља природну баријеру, па је њен интегритет битан фактор супротстављању продора микроорганизама и консекутивном развоју инфекције (161).

#### 2.3.3.4. Микроорганизми у гингивалном сулкусу

Орални микробиом здравог гингивалног сулкуса чине углавном Грам позитивне коке (*Streptococcus spp.*) али услови дозвољавају и колонизацију бактерија којима је потребна већа количина угљен диоксида као што су *Actinomyces* и *Campytophaga*. Продукти ових бактерија и следствено повећање протока гингивалне течности иницирају инфламацију ткива гингиве стварајући услове за колонизацију патогених анаеробних бактерија (158).

Простор гингивалног сулкуса омогућава идеалне услове за колонизацију перидонтопатогених микроорганизама, обезбеђујући им анаеробну средину, механичку заштиту због локализације сулкуса, протеине, пептиде као извор хранљивих материја и одређене компоненте серума пореклом из гингивалне течности (172, 184). Ови микроорганизми иницијатори су инфламаторних промена на потпорном апарату зуба.

У субгингивалном подручју мења се састав присутних хранљивих материја пореклом из гингивалне течности. Гингивална течност сада постаје инфламаторни ексудат који даље може да повећа запаљенски потенцијал новоколонизованих бактерија (185).

Током инфламације ткива гингиве ствара се велики број инфламаторних нуспроизвода који утичу на прогресију запаљења и у могућности су да реконструишу микробиоту из еубиотичке у дисбиотичку (172).

Несумњиво је да дисбиоза и промена микробиолошког састава, ка потенцирању перидонтопатогених врста и присуство инфламаторног окружења погодује развоју болести, међутим, велики утицај има и генетска предиспозиција што је приказано у студији Наппа и сар (186).

Поред квалитативног изузетно се мења и квантитативни састав микроорганизама присутних у гингивалном сулкусу. Бактеријски садржај квантитативно се креће од  $10^3$  у здравом гингивалном сулкусу до  $>10^8$  у инфламираном пародонталном сулкусу – цепу (187).

Субгингивални орални микробиом углавном се састоји од Грам позитивних факултативно анаеробних бактерија, међутим, услед повећања колонизације бактерија субгингивалног оралног биофилма у гингивалном сулкусу, мења се састав оралног микробиома у корист Грам негативних бактерија чиме се стварају услови за инфламацију ткива гингиве и пародонта (188).

Присуство и класификацију различитих врста бактерија у субгингивалном оралном биофилму приказали су Socransky и сар (189).

Бактерије одговорне за настанак пародонталних обољења приказане су у табели 1.

Табела 1. Бактерије узрочници пародонталних обољења (189).

Комплекс	Патогени
Аа-комплекс	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Црвени комплекс	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>Tannerella forsythia</i>
Наранџасти комплекс	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Peptostreptococcus</i> ( <i>Micromonas</i> ) <i>micros</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i>
Комплекс повезан са наранџастим	<i>Eubacterium nodatum</i>
Зелени комплекс	<i>Campytophaga gingivalis</i>

- изузетно патогени – Аа- комплекс;
- високо патогени – црвени комплекс;
- високо до умерено патогени – наранџасти и комплекс који се везује за наранџасти;
- умерено патогени – зелени комплекс.

Жути, зелени и љубичасти комплекс чине бактерије које се претежно налазе у здравом ткиву пародонта и оне су примарни колонизатори субгингивалног оралног биофилма (190).

Пародонтални патогени из Аа комплекса, као и црвеног и наранџастиог комплекса одговорни су за настанак пародонталних обољења. Примећено је смањење њиховог броја у току лечења. Праћење њиховог присуства и броја може бити ефикасан параметар у контроли напретка терапије и дуготрајној стабилизацији обољења пародонцијума (191-193).

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus*) (Аа) је Грам негативни мали штапићасти факултативни анаероб, кокобацил који поседује фимбрије. Проградује многе факторе вируленције (агресине) као што су ендотоксин, леукотоксин, колагеназа, протеазе, и јако је инвазиван за пародонтална ткива, чију деструкцију изазива, сматрајући се једним од главних етиолошких узрочника пародонтопатије (194). Део је нормалне флоре многих здравих особа. Са друге стране, овај микроорганизам је присутан код различитих хуманих инфекција укључујући инфективни ендокардитис, апсцес мозга и тешке и агресивне форме пародонтопатије.

Адхезини које проградује ова бактерија, као и њене фимбрије, битни су фактори који подстичу колонизацију у усној дупљи људи. Сем тога, спада у биохемијски активне бактерије (проградује каталазу и ферментује угљене хидрате) (195). Доказано је да је *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* способан да напада људске гингивалне ћелије у *in vitro* условима (196). Такође напада и васкуларне ендотелне ћелије, букалне епителне

ћелије (197), и подстиче апоптотску смрт ћелије (198). Најпоузданији подаци о повезаности *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и пародонталних обољења добијени су из истраживања активних лезија где је, за разлику од инактивних подручја, уочен већи проценат ове бактерије (199, 200).

*Tannerella forsythia* је непигментисани сахаролитички Грам негативни штапићасти микроорганизам који је обавезни анаероб. У усној дупљи се изолује из пародонталних цепова, са крајника и задњег дела језика. Такође се налази и у пљувачки пацијената са оштећеним пародонтом, па с тим у вези можемо да га очекујемо и у гингивалној течности. Може се наћи у супра и субгингивалном оралном биофилму. *Tannerella forsythia* је јако патогена бактерија која протеолитичким ензимима и липосахаридима уништава имуноглобулине и системе комплемената, који је интегрални део имуног система. Њени фактори вируленције делују директно, провоцирају имуни одговор домаћина и доводе до настанка пародонтопатије. Осим тога, ова бактерија у заједничким културама макрофага и инфламаторних ћелија може стимулирати експресију проинфламаторних цитокина, хемокина, простагландина *E2* (*PGE2*) и *MMP-9* (201). *Tannerella forsythia* може да изазове апоптозу, програмирању ћелијску смрт (194).

*Porphyromonas gingivalis* је непокретни, црнопигментисани, несахаролитички кокобацил. Припада групи Грам негативних бацила и обавезни је анаероб (*Bacteroides spp.*) показује морфологију кока или кратких штапића (202). Поседује факторе вируленције као што су липополисахариди, полисахаридне капсуле, хемаглутинини, екстрацелуларни протеолитички ензими и адхезини. *Porphyromonas gingivalis* је категорисан као агресивни пародонтални патоген који разлаже имуноглобулине, комплемент, колагена влакна, хијалуронску киселину, адхезине, ендотоксине и цитотоксине. Представља главни етиолошки агенс код хроничне пародонтопатије, што говори и чињеница да је откривен код 85,75% субгингивалних узорака плака пацијената са поменутом дијагнозом. Са друге стране, ретко се налази на местима без деструкције пародонта (194).

*Treponema denticola* је Грам негативни покретни микроорганизам спиралног облика. Поседује протеолитичке ензиме који могу уништавати имуноглобулине (*IgA*, *IgM*, *IgG*) и факторе комплемената (194). Осим тога, продукује и липополисахарид и неспецифичне метаболичке крајње продукте, као што је индол, водоник-сулфид и амонијак који су токсични за ћелије домаћина (203).

*Treponema denticola* је најчешће изолована из најактивнијих пародонталних цепова (204). Ова бактерија има способност да се прилепи за хумане гингивалне фибробласте, протеине базалне мембране, као и за друге супстанце специјалним припојним меха-

низмима, што узрокује ћелијску смрт због ослобађања активних супстанци у њихову цитоплазму (205).

*Prevotella intermedia* (*Prevotella nigrescens*) је црно пигментисани, Грам негативни, кратак, округлао микроорганизам. Иако је стриктни анаероб, отпоран је на краткотрајно излагање кисеонику. Ова бактерија је присутна и у здравим устима и фимбријама се везује за ћелије оралне мукозе (206). Идентификована је у склопу оралних инфекција: ендодонтске лезије (207, 208), *gingivitis gravidarum* (209) и *gingivitis ulceronecroticans* (210). Фактори вируленције *Prevotella intermedia* су: адхезини, протеолитички ензими и липополисахариди (211-214).

Структура субгингивалног биофилма је специфична са груписањем бактерија које користе исте метаболичке продукте, са присуством аеробних и факултативно анаеробних бактерија идући са периферије, до стриктно анаеробних бактерија у центру (215, 216).

Бактерије које чине саставни део субгингивалног оралног биофилма организовано делују повећањем протеолитичке активности и продукцијом цитокина у циљу одбране од имунолошког одговора ткива и иницирању инфламације (217).

Настанак промена унутар оралног микробиома може довести до повећања патогености биосистема и иницијације оштећења ткива гингиве и пародонта (218).

Гингивална течност је неутралне до алкалне *pH* вредности. Прогресијом гингивалне инфламације долази до продубљивања џепова и стварања повољних услова за раст анаеробних бактерија, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Campylobacter*, *Prevotella* и *Porphyromonas*, које лучењем ензима изазивају оштећења ткива. *Prevotella intermedia* и *Fusobacterium nucleatum* имају способност опстанка у неутралној и киселој средини, и у стању су да мењају *pH* вредност инутар гингивалног сулкуса, стварајући погодно тло за раст других бактеријских врста као што је *Porphyromonas gingivalis* (218).

### 2.3.3.5. Бактерије код болести оралних ткива

Здраво ткиво пародонта карактерише се присуством колонија Грам позитивних бактерија, кока и бацила, у великој процентуалној заступљености – 75%, које живе у симбиотској заједници. Најчешће колонизоване бактерије су група *Streptococcus* (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*) и *Actinomyces* (*Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*), док су мање заступљене врсте *Veillonella species*, *Campylobacter species*, *Capnocytophaga*, *Neisseria*, *Fusobacterium nucleatum*, и ретко присутне спирохете и бацили (37, 219).

Субгингивални орални микробиом се изузетно разликује у здравом ткиву пародонта и пародонтитису где је већа њихова процентуална заступљеност (220).

Промену квалитативног и квантитативног састава субгингивалног биофилма доказује и податак да су у здравом ткиву биле заступљене 53 врсте бактерија у поређењу са 123 врсте које су биле присутне у пародонтално оштећеном ткиву (221).

Нова хипотеза '*Inflammation-mediated polymicrobial-emergence and disease exacerbation*' (IMPEDE) представљена је 2020. године и њом се објашњава инфламација ткива пародонта у дисбиози микроорганизама (222).

Ова хипотеза приказује 5 стања пародонта на основу оралног микробиома, идући од здравог ка напредованом пародонтитису, од којих је нулти стадијум здрав пародонт.

1. Гингивитис – инфламација гингиве са присутним растом коменсалних бактерија у субгингивалном биофилму,
2. Иницијални пародонтитис – поремећај микробне хомеостазе и појава других бактеријских култура,
3. Прогресија дисбиозе – колонизација Грам негативних врста и периодонтопатогена,
4. Касни стадијум пародонтитиса – колонизација Грам негативних и анаеробних бактерија, доводи до погоршања инфламације ткива (222).

Субгингивални орални микробиом се разликује у зависности од дубине пародонталних џепова, са присутном већом хетерогеношћу код дубљих пародонталних џепова  $>7-8\text{ mm}$  у поређењу са џеповима дубине до  $6\text{ mm}$ . Заједнице микроорганизама које доводе до прогресије болести су хомогеније, присутне су ограничене врста бактерија, што указује чињеница да је преко 50% врста у дубљим џеповима било патогено (223).

Сличне резултати добили су и други аутори у истраживању коришћењем 454 секвенце гена *16S rRNA* за идентификацију микроорганизама. Показали су разлику у микробном саставу субгингивалног простора здравих и оболелих пародонталних џепова, са присутвом 16 бактеријских врста у здравом, у поређењу са 9 патогених врста у оболелим пародонталним џеповима (224).

Van Dyke и сар. закључују присутну разноликост бактеријских врста у здравој микробиоти где се иницијално појављују и патогене врсте, и заменом коменсалне флоре у претежно патогену код прогресије инфламације (222).



## 2.4. БИОАЕРОСОЛИ

### 2.4.1. САСТАВ И ИЗВОРИ БИОАЕРОСОЛА

Биоаеросоли представљају честице пречника мањег од  $50 \mu\text{m}$  које у свом саставу садрже микроорганизме. Имају способност дужег опстанка у ваздуху пре него што дођу у контакт са површинама (225, 226). Честице пречника  $5 \mu\text{m}$  представљају капљице, док су честице пречника  $< 5 \mu\text{m}$  језгра капљице (227). Испаравањем честица у ваздуху долази до смањења њиховог пречника што представља опасност и ризик за стоматолога. Највећу опасност представљају честице биоаеросола пречника  $< 1 \mu\text{m}$  јер њиховим удисањем присутни микроорганизми могу доспети и проћи кроз алвеоле плућа, чији пречник износи  $< 5 \mu\text{m}$  (228, 229).

Примена ручних насадних инструмената (хируршки колењаци, високотуражне турбине, насадници, ултразвучни скалери) и пустера представља свакодневну стоматолошку праксу. За време рада ови инструменти користе воду или физиолошки раствор под притиском, што узрокује распрскавање водених честица (аеросола) у околину. Садржај усне дупље чини велики број органских материја које мешањем са аеросолом стварају биоаеросол (230).

Међутим, за стварање биоаеросола није неопходна вода. Доказано је у *in vitro* условима да минимална количина течности која је симулирала пљувачку може да створи биоаеросоле (231).

Осим стварања биоаеросола насадним инструментима, постоје и други извори у стоматолошким ординацијама. Биоаеросоли се могу створити кијањем, кашљањем, разговором и дисањем, чиме долази до ширења пљувачке и назолабијалног секрета са присутним микробима у околину (232). Кијањем се распршује велика количина честица у средину и њихов опстанак у дужем временском интервалу. Самим тим здравствени радници и пацијенти могу утицати на циркулисање биоаеросола у стоматолошкој ординацији (230).

Један од извора биоаеросола јесу водоводне цеви, преко потенцијално присутних колонизованих микроорганизама на њиховим унутрашњим површинама (233-235). Затим клима уређаји, у чијим филтерима могу да се колонизују и дуже време перзистирају микроорганизми, који могу аеросолизовати околину активирањем апарата (225). На тај начин у стоматолошким ординацијама може доћи до дистрибуције и ширења биоаеросола у великом ваздушном простору.

У великој мери састав створеног биоаеросола зависи од здравственог стања пацијента. Биоаеросоли настали за време брушења зуба могу садржати различите микроорганизме пореклом из усне дупље пацијента, плувачке, назофарингеалног секрета, крви, и меког ткива гингиве која се може оштетити субгингивалном позицијом демаркације. То могу бити сапрофитне бактерије и гљивице који променом средине и доспевањем до слузокоже респираторног тракта, чији нису нормални становници, потенцијално могу испољити своја патогена својства. Још већи ризик за здравствено стање стоматолога и особља представљају пацијенти који могу бити носиоци патогених бактерија (*Staphylococcus aureus*) и вируса (*CoV-2*, *HIV*, *VHB* и *VHC*). Дијаметар микроорганизама је различит, али знајући да је пречник бактерија од  $0,5 \mu\text{m}$  до  $2,0 \mu\text{m}$  (дужина од  $0,3 \mu\text{m}$  до  $20 \mu\text{m}$ ), и пречник вируса око  $0,1 \mu\text{m}$ , можемо закључити да удисањем лако могу доспети до алвеола плућа (230).

Биоаеросоли садрже и друге компоненте које могу представљати потенцијални здравствени ризик за стоматолога; делови амалгамских и композитних испуна, опилци брушених зуба, честице уља за подмазивање насадних инструмената (225). Доказано је да приликом брушења зуба долази до ослобађања великих количина честица опасног опсега, нуспродуката горућих супстанци и силицијума из композитних испуна димензија  $2 \mu\text{m}$  до  $30 \mu\text{m}$  (236).

Идентификација микроорганизама пореклом из биоаеросола могуће је извести активном методом – Андерсенов узорак (пумпа за узорковање), и пасивном методом – Петријеве шоље са хранљивим подлогама (крвни, чоколадни агар) (227).

Постављањем Петријевих плоча са подлогама на различитој удаљености од извора омогућава се директно излагање и идентификација створеног биоаеросола (237).

Zemougi и сар. су доказали присуство аеробних и анаеробних бактерија пореклом из биоаеросола у највећој количини у близини извора стварања, и већим присуством аеробних бактерија удаљавањем од места извора (238).

Највећи проценат биоаеросола 74%–100% чине Грам позитивне коке *Staphylococcus epidermidis* и *Micrococcus*, у мањем проценту заступљене су бактерије које стварају ендоспоре, Грам позитивни бацили и гљивице рода *Penicillium* и *Cladosporium* (239). Због ограничења метода за молекуларно типизирање вируса подаци о унакрсној инфекцији вирусима недостају (240).

Резултати других аутора у испитивању квалитативног и квантитивног састава биоаеросола у стоматолошким ординацијама показују присуство Грам позитивних бактерија

чак 94%, са процентуално најзаступљенијим врстама *Micrococcus luteus* (31%) и *Bacillus cereus* (22%) (241).

Испитивањем отисака зуба узетих након брушења доказано је присуство патогених бактерија као што су *Actinobacillus species*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*, *Carpocytophaga species*, *Actinobacter baumannii* и *Morganella morganii* које потенцијално могу бити у саставу биоаеросола (242).

Доказан је тежак облик респираторне инфекције код пацијента који је инфициран у стоматолошкој ординацији применом високотуражне турбине изазване бактеријом *Legionella pneumophila* (243).

Atlas и сар. у свом истраживању приказују случај стоматолога са тешком упалом плућа и смртним исходом изазваном бактеријом *Legionella dumoffi* пореклом из биоаеросола (244).

Велики број опортунистичких патогених бактерија рода *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* и гљивица *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* које могу бити потенцијални узрочници инфекција изолован је из узорака ваздуха и воде у стоматолошким ординацијама (245).

Zemoui и сар. указују на изразито хетерогени микробни састав биоаеросола насталих применом ручних насадних инструмената у стоматолошким ординацијама. Опсежном мета-анализом указали су на значај створеног биоаеросола по здравље пацијената и стоматолошког особља, посебно оних са имунокомпромитованим стањем и респираторним обољењима код којих микроорганизми пореклом из биоаеросола представљају велику здравствену опасност (227).

Овом студијом доказано је присуство микроорганизама пореклом из усне дупље, воде, коже који могу бити саставни део биоаеросола, и то 16 бактеријских врста рода *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Acinetobacter*, *Diphtheroids* и 23 гљивица рода *Aspergillus*, *Pencillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Stemphylium*, *Botrytis*, *Arthrimum*, *Geotrichum* (227).

## 2.4.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ БИОАЕРОСОЛА У СТОМАТОЛОГИЈИ

Врста стоматолошког третмана и дужина трајања у великој мери утичу на дистрибуцију, концентрацију и садржај створених биоаеросола. С обзиром да се за израду фиксних протетских конструкција користе високотуражне турбине са максималним режимом воденог хлађења дистрибуција и количина биоаеросола је на високом нивоу за време и након рада.

Polednik и сар. показују највећи пораст масе и броја честица биоаеросола током третмана брушења зуба у поређењу са другим стоматолошким интервенцијама (246).

У тренутку активирања високотуражне турбине у усној дупљи пацијента, долази до контаминације ваздуха створеним биоаеросолима који обухватају простор стоматолошке ординације (247). Током брушења зуба, региструје се највећа концентрација биоаеросола у ординацији, са постепеним смањењем након завршетка интервенције (248, 249), да би се до краја радног дана концентрација биоаеросола смањила за 50%–70% (250).

Miller и сар. приказују могуће преношење биоаеросола на 200 *cm* удаљености у стоматолошкој ординацији током рада са високотуражним турбинама и ултразвучним скалерима (251).

Истраживања показују присуство стрептокока и стафилокока на различитим удаљеностима од места извора, као и значајну контаминацију радних просторија биоаеросолима при коришћењу насадних инструмената са великом брзином обртаја и воденим хлађењем (241).

Nejatidanesh и сар. приказују да су најконтаминиранија подручја лица стоматолога током рада подручја предела носа и унутрашњих углова очију, док је најмање изложено подручје зигоматичних лукова, без значајне разлике на десној и левој страни лица (252).

Концентрација биоаеросола је највећа на месту извора, у подручју рада (236, 250), са постепеним смањењем квантитативног састава микроорганизама по квадратном центиметру удаљавањем од извора (253, 254). Међутим, доказано је присуство микроорганизама и на удаљености 1–1,5 *m* од места рада (238, 255).

Унутар стоматолошке ординације честице биоаеросола могу дуго да опстану у ваздуху, некада и сатима, чиме се повећава могућност њиховом излагању.

Утицај на кретање честица биоаеросола на различитим удаљеностима унутар стоматолошке ординације и њихово задржавање у ваздуху, може имати струјање ваздуха услед употребе клима уређаја и вентилатора за време рада (230).

Међутим, слегање биоаеросола на радне површине ординације пружа могућност потенцијалне контаминације и ризик од преношења трансмисионих болести (хепатитис Б и Ц, *AIDS*) (241, 256).

Мерењем концентрације биоаеросола у стоматолошким ординацијама током стоматолошких интервенција максималне вредности су добијене у третманима у којима су коришћени ултразвучни скалери, док је мања заступљеност створених биоаеросола била код конзервативних третмана (257).

Узорковањем ваздуха у зони дисања стоматолога и пацијената током третмана чишћења зуба доказано је присуство неколико хиљада аеросолизованих бактерија по  $m^3$  (258).

### 2.4.3. ИЗЛОЖЕНОСТ БИОАЕРОСОЛИМА И ОПАСНОСТ ПО ЗДРАВЉЕ

Могућност контаминације стоматолошког особља и потенцијално ширење инфекције могу бити последица директног контакта са пљувачком и крвљу инфицираног пацијента, неадекватно стерилисаних инструмената и површина, и у највећој мери контакта са биоаеросолима из ваздуха (230).

Могућности настанка инфекција стоматолошког особља су бројне због присуства улазних места као што су епидерм руку, орални, назални, конјунктивални епител, као и епители респираторног тракта, тј. горњих и доњих дисајних путева, све до епитела плућних алвеола (259). Такође, бројни су и узочници инфекција – патогене бактерије и вируси, вируси грипа, херпеса, *SARS* вируси 1, а у данашње време планетарни значај добија опасност од инфекције корона вирусом *SARS-CoV-19* контаминацијом преко биоаеросола (260).

Бројна истраживања указују на нежељена дејства биоаеросола и реалну опасност за здравље стоматолошког особља (227, 261).

Инфективна обољења, кожне болести – атопија, атопијски и контактни дерматитис, обољења ока – конјунктивитис, обољења горњег и доњег респираторног тракта – инфекције, биосинозе, алергије, бронхијална астма, хронични бронхитис, па чак и неке врсте рака потенцијалне су реакције изложености биоаеросолима (252, 262-264).

Из свега наведеног можемо закључити да су биоаеросоли реална претња и извор инфекција. Осим микроорганизама у биоаеросолима се могу наћи наночестице метала као што су цирконијум, баријум, сребро, стронцијум или метални оксиди (265, 266) који такође могу представљати здравствени ризик проласком кроз алвеоле плућа. Честице метала могу изазвати упалу плућа, хроничну опструктивну болест и повећавају ризик за настанак карцинома плућа (246).

### 3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

У истраживању се полази од претпоставке да брушење зуба са демаркацијом препарације облика полужлеба може узроковати оштећење околног пародонталног ткива и промену састава оралне микробне флоре.

У складу са тим, постављени су подциљеви:

- Утврдити клиничко стање здравља гингиве и дубљих ткива пародонта испитаника одређивањем индекса: *CPITN (Community Periodontal Index of Treatment Needs)* пре, као и гингивалног индекса и индекса крварења пре и после брушења зуба са демаркацијом препарације облика полужлеба локализованог субгингивално и еквингингивално.
- Утврдити концентрацију маркера инфламације *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, *matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)*, као и *interleukin 1beta (IL-1 $\beta$ )* у гингивалној течности испитаника пре и после брушења зуба са демаркацијом препарације облика полужлеба локализованог субгингивално и еквингингивално.
- Извршити морфометријска и цитолошка испитивања степена оштећења гингиве анализом једара епителних ћелија: површина (*Area*), обим (*perimeter, Perim*), циркуларност (*circularity, Circ*), заобљеност (*roundness, Round*), *Feret* дијаметар (*Feret diameter, Feret*), *Feret* угао (*FeretAngle*), минимални *Feret (MinFeret)*, интегрисана оптичка густина (*Integrated Optical Density, IOD*) и чврстоћа једра (*Solidity*) пре и после брушења зуба са демаркацијом препарације облика полужлеба локализованог субгингивално и еквингингивално.
- Утврдити присуство периодонтопатогених микроорганизама *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* у гингивалној течности пре и после брушења зуба са демаркацијом препарације облика полужлеба локализованог субгингивално и еквингингивално.
- Утврдити повезаност микробиолошког састава пљувачке са саставом биоаеросола пре и после брушења зуба са демаркацијом препарације облика полужлеба локализованог субгингивално и еквингингивално.

- Утврдити квантитативне и квалитативне промене бактериолошког састава био-аеросола у односу на распрострањеност од места његовог стварања.
- Утврдити утицај позиције демаркације препарације на испитиване параметре.
- Извршити анализу и поређење добијених резултата, као и повезаност утврђених параметара.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

### 4.1. ИСПИТАНИЦИ И КЛИНИЧКЕ ПРОЦЕДУРЕ

Клинички део истраживања обављен је на Клиници за денталну медицину Медицинског факултета у Нишу, уз одобрење Етичког комитета Клинике (68/5-2019-3 ЕО) и Етичког комитета факултета (12-3307).

Истраживањем је обухваћено 60 испитаника са индикацијом за брушење једног зуба ради израде металокерамичке крунице.

*Укључујући критеријуми били су:* здрави испитаници оба пола, непушачи, узраста 30-65 година, без патолошких промена меких ткива усне дупље и са здравим пародонтом, без кариозних лезија и протетских надокнада.

*Искључујући критеријуми били су:* испитаници са аутоимуним или системским болестима, стеченом или урођеном коагулопатијом, крвним дискразијама, акутним или хроничним инфекцијама, труднице, пушачи, испитаници који су били изложени хемио/зрачној терапији, као и они који су примали антибиотике у последња 2 месеца.

Испитаници су подељени у две групе:

**Група 1 (Г1):** 30 испитаника код којих је индикована израда металокерамичке крунице са демаркацијом препарације облика полужлеба позиционираног 0,3 до 0,5 *mm* испод нивоа руба гингиве (субгингивално),

**Група 2 (Г2):** 30 испитаника код којих је индикована израда металокерамичке крунице са демаркацијом препарације облика полужлеба позиционираног у нивоу руба гингиве (еквигингивално).

**Контролне узорке** представљао је садржај усне дупље узиман 5 минута пре брушења зуба (пљувачка, гингивална течност, размаз гингиве), а **експерименталне узорке** садржај усне дупље узет у опсервационим интервалима 15 минута, 24 и 72 сата након брушења једног зуба.



#### 4.1.1. КЛИНИЧКА ПРОЦЕДУРА I

**Припрема пацијената.** Недељу дана пре почетка интервенције свим испитаницима одрађен је клинички преглед и процена стања здравља пародонцијума. Непосредно пре тога испитаницима су саниране све кариозне лезије и урађена је базична терапија пародонтопатије, тако да су пре брушења зуба пацијенти имали уредан стоматолошки статус.

Свим испитаницима је саветовано да два сата пре заказане интервенције оперу зубе четкицом и пастом у трајању од 5 минута.

#### 4.1.2. КЛИНИЧКА ПРОЦЕДУРА II

- 1. Припрема инструментаријума.** Насадни инструменти (високо туражна машина са дијамантским сврдлима), ручни инструменти (огледалце, сонда, пинцета, тацна), аспирациона сисаљка за пљувачку, мантил за једнократну употребу, капа, маска, компресе и увлаке били су претходно стерилисани у аутоклаву. За сваког испитаника коришћена је увек иста високо туражна машина подешена на најјачи мод воденог хлађења, као и потпуно нова дијамантска сврдла.
- 2. Припрема радног места.** Један дан пре брушења зуба одрађено је детаљно чишћење и дезинфекција пода стоматолошке ординације натријум-хипохлоритом (10% *NaOCl*) у трајању од 20 минута, као и брисање и дезинфекција стоматолошке јединице површинским дезинфекционим средством (*mikrozid<sup>R</sup>*). Поступак дезинфекције се понављао 60 минута пре брушења зуба. Непосредно пре почетка интервенције на леви рукохват стоматолошке столице постављан је и фиксиран носач Петријеве шоље који је претходно стерилисан у аутоклаву, док је ручица носача дезинфикована поменути површинским дезинфицијенсом.
- 3. Припрема лекара** подразумевала је стављање стерилне капе и маске, као и дезинфикованог заштитног визира, од стране другог лица (стоматолошка сестра) - стерилним рукавицама, а затим прање руку лекара текућом водом и лосионом за прање (*esemtan<sup>R</sup>*), дезинфекција руку алкохолним антисептиком (*desderman<sup>R</sup>*) и облачење стерилног мантила. На крају су се навлачиле стерилне рукавице како микроорганизми из предела руку не би утицали на резултате истраживања.
- 4. Припрема радног поља.** Кожа око усана и браде брисана је медицинским бензином, 70% алкохолом и воденим раствором за дезинфекцију коже (*octenisept<sup>R</sup>*). Затим је пацијент прекриван стерилном компресом тако да му уста остану слободна. На високо туражну машину и аспирациону сисаљку постављане су стерилне

увлаке. Инструмент табла и покретни сточић такође су прекривани стерилним компресима.

5. **Брушење зуба.** Обављало се према свим стандардима препарације уз максимално могуће очување маргиналног руба гингиве у трајању од 15 минута од стране једног терапута.

- У Г1 брушење је изведено са демаркацијом препарације позициониране 0,3 до 0,5 *mm* испод нивоа руба гингиве (субгингивално).
- У Г2 брушење је изведено са демаркацијом препарације позициониране у нивоу руба гингиве (еквингингивално).

Брушењем зуба формиран је полужлеб демаркација препарације. Овај тип граничне препарације за металокерамичку круницу омогућава мање одстрањивање зубног ткива, очување интегритета маргиналне гингиве, заштиту пародонта, дуготрајност протетских надокнада и одличну естетику (267). Са клиничком процедуром брушења осталих зуба, израдом привремених круница, узимањем отиска и даљом израдом надокнаде наставило се након трећег опсервационог интервала (72 h), с обзиром да свака од поменутих процедура потенцијално може да утиче на појаву инфламације гингиве (268, 269).

#### 4.1.3. КЛИНИЧКА ПРОЦЕДУРА III

Клиничка проспективна студија обухватила је 4 опсервациона интервала: 5 минута пре брушења зуба (контролни узорци), 15 минута, 24 h и 72 h након брушења зуба (студијски узорци).

**Клинички параметри стања гингиве и пародонта.** Индекс стања пародонцијума (*CPITN*) одређиван је непосредно пре брушења зуба, а процена стања здравља гингиве (гингивални индекс и индекс крварења) вршена је у сва 4 опсервациона интервала.

**Узимање узорака.** За микробиолошку анализу пљувачке, цитоморфометријску анализу гингиве, биохемијску и молекуларно-генетичку анализу гингивалне течности узорци су узимани такође у сва 4 опсервациона интервала.

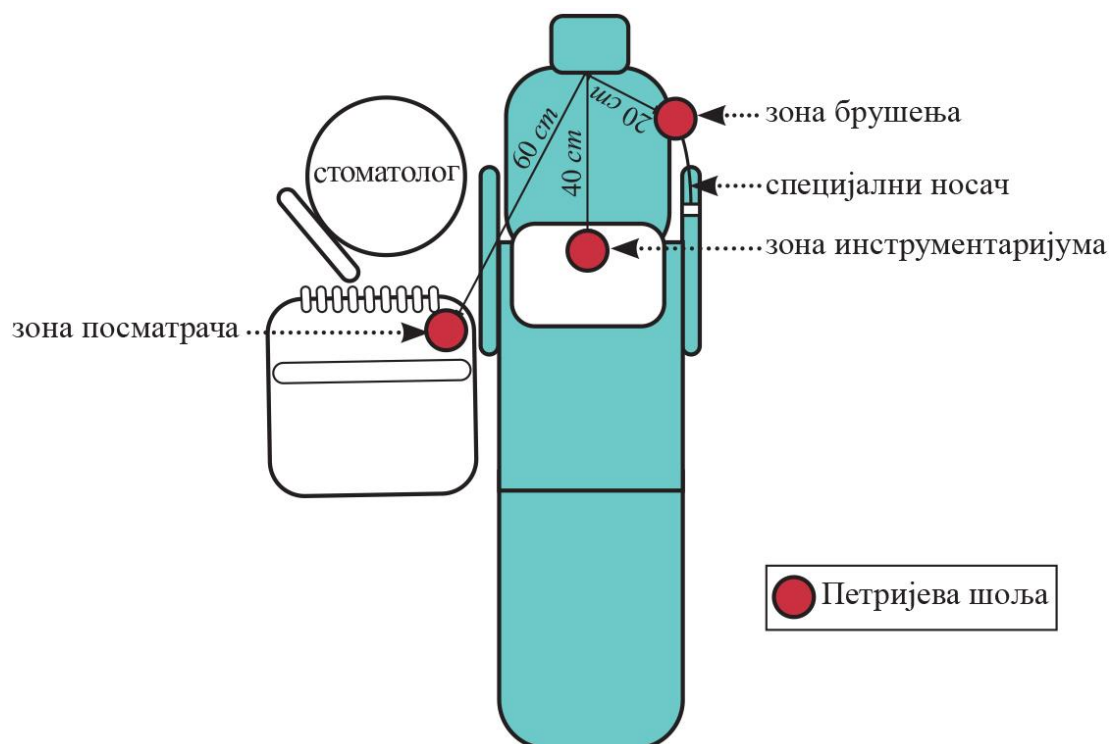
Узорци за микробиолошку анализу распрострањености биоаеросола узимани су 5 минута пре (контролни узорци) и 15 минута после брушења (студијски узорци) зуба (време потребно за просечну протетску препарацију једног зуба) (Табела 2).

1. **Узорци за микробиолошку анализу пљувачке.** Узорке су представљали брисеви пљувачке. Брис пљувачке узиман је са пода усне дупље помоћу стерилног брис штапића, пре него што пацијент пљуне или испере уста водом. Брис штапић је након тога

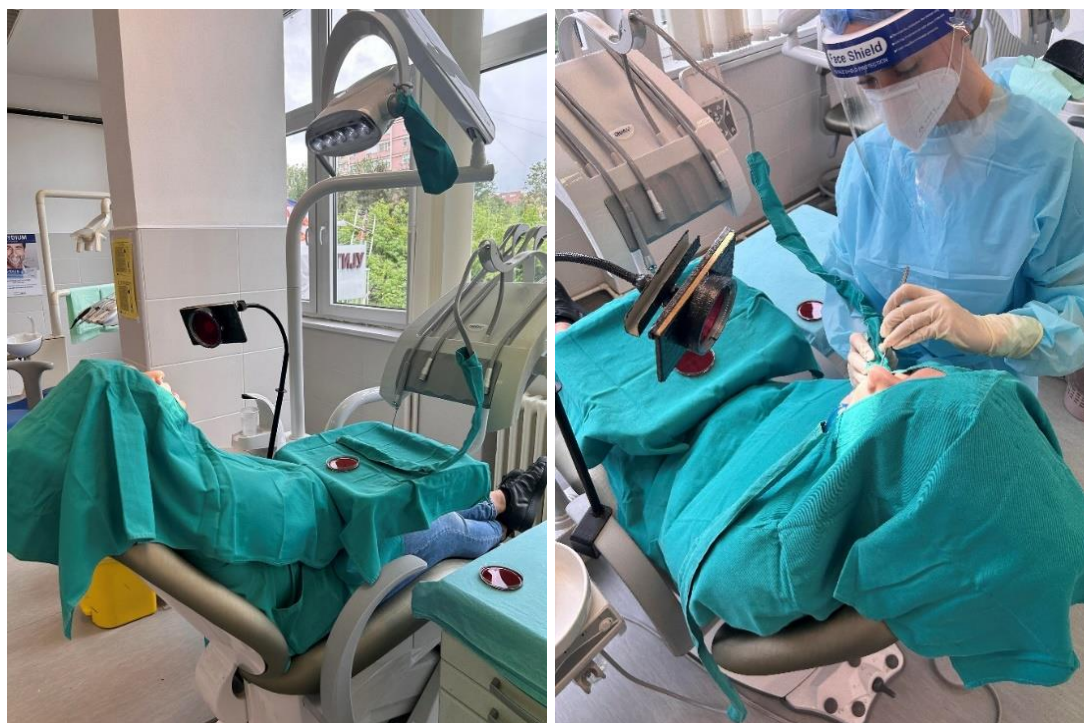
враћан у стерилну епрувету. Сви прикупљени узорци су непосредно после узорковања, хладним путем, транспортовани у микробиолошку лабораторију.

2. **Узорци гингивалне течности за биохемијску и молекуларно генетичку *PCR* (*Polymerase chain reaction*) анализу.** Узорци садржаја течности гингивалног сулкуса узимани су помоћу шест стерилних папирнатих поена (#30, *Spident CO., Gojan-Dong, Korea*) који су апликовани у гингивални сулкус третираног зуба, по три са лабијалне и палатиналне стране, у трајању од 20 секунди. Поени су одлагани у пластичне епрувете (*Eppendorf*) запремине 1,5 ml<sup>3</sup> и чувани на температури од -70<sup>0</sup>C до момента анализирања.
3. **Брисеви гингиве за цитоморфометријска истраживања.** Брисеви су узимани стерилним брис штапићем са гингиве у непосредној околини третираног зуба. Након тога је направљен размаз на предметном стаклу који се сушио и фиксирао на ваздуху и након бојења микроскопски анализирао.
4. **Узорци за микробиолошку анализу распрострањености биоаеросола.** Узорке су представљале Петријеве шоље са хранљивом подлогом (*Columbia agar – sheep blood 5%, ready to use, Termofisher, USA*). Контролна Петријева шоља била је отворена и изложена радној средини, у којој нема биоаеросола, 20 минута пре интервенције. Пет минута пре почетка интервенције завршено је са узимањем узорка радне средине и контролна Петријева шоља (дужина излагања 15 минута) је затварана и склањана. Студијске Петријеве шоље биле су директно изложене радној средини и створеном биоаеросолу у току брушења зуба. Шоље су биле постављене на одређеном растојању од лица пацијента, тј. извора биоаеросола:
  - прва, на 20 cm (зона брушења), фиксирана преко специјалног носача,
  - друга, на 40 cm (зона инструментаријума), постављана на инструмент таблу и
  - трећа, на 60 cm (зона посматрача), постављана на покретни сточић (Шема 1, Слика 6).

Студијске Петријеве шоље отварање су на сам почетак брушења зуба и регистровале су распрострањеност и количину створеног биоаеросола у току брушења зуба. Све шоље су непосредно после излагања затваране, враћане у заштитну кесу, и хладним путем, транспортоване у микробиолошку лабораторију.



**Шема 1.** Шематски приказ распореда елемената  
за спровођење клиничке процедуре III



**Слика 6.** Спровођење клиничке процедуре III

**Табела 2.** Врсте и време узимања узорака.

	Контролна група		Студијска група	
	Пре брушења	15'	После брушења	72 h
Узорковање	5'	15'	24 h	72 h
Микробиолошка анализа пљувачке	√	√	√	√
Биохемијска анализа гингивалне течности	√	√	√	√
Молекуларно генетичка анализа гингивалне течности	√	√	√	√
Цитолошка и морфометријска анализа гингиве	√	√	√	√
Микробиолошка анализа биоаеросола	√	√		

## 4.2. МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА

### 4.2.1. КЛИНИЧКИ ПАРАМЕТРИ СТАЊА ЗДРАВЉА ГИНГИВЕ И ПАРОДОНТА

Користили су се следећи индекси: *CPITN*, гингивални индекс и индекс крварења.

#### 4.2.1.1. *CPITN* (*Community Periodontal Index of Treatment Needs*) –

##### индекс стања пародонцијума у једној заједници и потребе лечења

*CPITN* се користи за утврђивање присуства, распрострањености и тежине обољења пародонцијума. Овај индекс се одређује након поделе горњег и доњег зубног низа у шест сегмената, по три у свакој вилици: 17 - 14, 13 - 23, 24 - 27, 47 - 44, 43 - 33, 34 - 37. У сваком од секстаната прегледани су сви зуби, тако што је око сваког од њих вршено сондирање у четири тачке и детектовано најтеже оштећење пародонцијума.

Нумеричке вредности *CPITN* индекса приказане су у табели 3 (270). Описане нумеричке вредности додате су сваком секстанту, сабране су и добијена вредност подељена са шест у циљу одређивања коначне вредности *CPITN* за сваког пацијента понаособ.

Табела 3. Критеријуми за одређивање *CPITN*.

Вредности <i>CPITN</i>	Критеријуми
0	Здрав пародонцијум.
1	Крварење гингиве после сондирања (гингивитис).
2	Присутне чврсте насlage на зубима (каменац, конкременти) или проминентне ивице пломби или протетских радова. Растојање од глеђно-цементне границе до дна пародонталног џепа не прелази 3,5 mm.
3	Растојање од глеђно-цементне границе до дна пародонталног џепа је 3,5–5,5 mm.
4	Растојање од глеђно-цементне границе до дна пародонталног џепа је веће од 5,5 mm.

#### 4.2.1.2. Гингивални индекс – ГИ

Степен инфламације гингиве је одређиван гингивалним индексом (ГИ). Овим индексом оцењује се стање гингиве са вестибуларне, мезијалне, оралне и дисталне стране зуба. Укупан ГИ се добија сабирањем вредности стања гингиве са свих страна зуба, након чега се добијени збир подели са четири.

Испитаници, у којих се ГИ креће од 0,1 до 1,0 имају благу инфламацију гингиве, а они са индексом од 1,1 до 2,0 умерену инфламацију. Ако је средња вредност ГИ од 2,1 до 3,0 инфламација гингиве се процењује као тешка, односно јако изражена (Табела 4) (271).

**Табела 4.** Критеријуми за одређивање ГИ.

Вредности ГИ	Критеријуми
0 – нормална гингива	Гингива је бледоружичасте боје, чврста, ситно-зрнасте површине. Кад се добро осуши она је без сјаја. Папила је у интерденталном простору. Облик папиле зависи од положаја зуба.
1 – блага инфламација	Ивица гингиве је нешто црвеније боје. Постоји благ едем. Повећано је излучивање гингивалног ексудата из сулкуса.
2 – умерена инфламација	Гингива је црвене боје. Изражен је едем и увећање слободне гингиве. Постоји крварење из гингиве на благ притисак сондом.
3 – јака инфламација	Гингива је јасно црвене или црвеноплавичасте боје. Веома је увећана. Постоји тенденција ка спонтаном крварењу. Постоје улцерације на гингиви.

#### 4.2.1.3. Индекс крварења гингиве – ИКРВ

Степен крварења гингиве је одређиван индексом крварења гингиве (ИКРВ). Овим индексом оцењује се степен инфламације гингиве сондирањем гингивалног сулкуса тупом пародонталном сондом. Према приказаној табели вреднује се степен крварења гингиве (Табела 5) (272).

Табела 5. Критеријуми за одређивање ИКРВ.

Вредности ИКРВ	Критеријуми
0	Гингива не крвари на провокацију
1	Крварење на благ притисак сондом 10-30 секунди после провокације
2	Крварење на благ притисак сондом, у току провокације
3	Спонтано крварење гингиве

#### 4.2.2. МИКРОБИОЛОШКА АНАЛИЗА ПЉУВАЧКЕ И РАСПРОСТРАЊЕНОСТИ БИОАЕРОСОЛА

Истраживање је спроведено у Центру за микробиологију Института за јавно здравље у Нишу.

##### 4.2.2.1. Засејавање и инокулација

У циљу култивације и идентификације порасле бактеријске културе вршено је засејавање узорака. Засејавање је извођено једним потезом директно узетим брисевима пљувачке на хранљивим подлогама.

Инкубација инокулираног материјала трајала је 24 до 48 сати на температури од 37<sup>0</sup>С у аеробним условима.

##### 4.2.2.2. Идентификација

Идентификација бактеријских култура рађена је класичном бактеријском идентификацијом (бројањем и морфолошком анализом раста и изгледа), као и на основу појаве и типа хемоллизе, биохемијских особина и антигене грађе чистих култура.

Бактерије су идентификоване на основу њихових метаболичких карактеристика коришћењем два система биохемијских тестова: *BBL CRYSTAL Identification Systems Gram-Positive ID Kit (Becton, Dickinson and Company, USA)* и *BBL CRYSTAL Identification Systems Neisseria/Haemophilus ID Kit (Becton, Dickinson and Company, USA)*, који садрже 29 ензимских и биохемијских супстрата. Хидролизом супстрата откривени су бактеријски ензими, што је резултирало променом боје и визуелизацијом ултраљубичастим (UV) светлом, након чега се приступило одређивању рода и група бактерија и њиховој квантификацији.



### 4.2.3. БИОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ГИНГИВАЛНЕ ТЕЧНОСТИ

Истраживање је спроведено на Институту за молекуларну биологију и хуману генетику Стоматолошког факултета Универзитета у Београду и на Катедри за општу и оралну биохемију, Стоматолошког факултета Универзитета у Београду.

Из узорака гингивалне течности одређивана је концентрација *matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)*, *interleukin 1 (IL-1 $\beta$ )*, као и *vascular endothelial growth factor (VEGF)*. За добијање резултата коришћени су *ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)* тестови.

Поступку анализирања претходи припрема узорака. Сви узорци одмрзавани су до температуре од 4 C<sup>0</sup> а затим су центрифугирани на 1000 rpm у трајању од 20 минута у центрифуги (*Eppendorf MiniSpin®; Hamburg, Germany*).

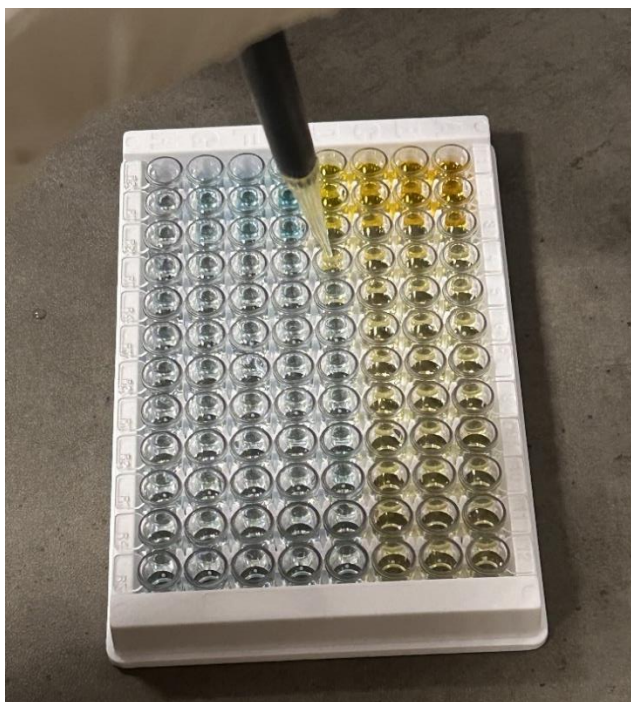
#### 4.2.3.1. *Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)*

Концентрација *MMP-9* одређена је применом *ELISA* кита (*MMP9 Human ELISA Kit - Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*), опсега детекције 0 pg/mL – 1,500 pg/mL *Hu MMP-9*, сензитивности <10 pg/mL.

Поступак примене теста обухватао је “сендвич” *ELISA* технику са двоструким антителима. Комерцијални кит се састоји од микротитар плоче (*Hu MMP-9 antibody coated wells*) са базенчићима који су обложени високо пречишћеним антителима специфичним за *MMP-9* и низа реагенаса (*Hu MMP-9 Standard, Hu MMP-9 Biotin Conjugate, Streptavidin-HRP, Stabilized Chromogen, Tetramethylbenzidine (TMB), Stop solution* и супстанце за разблажење концентрација и испирање).

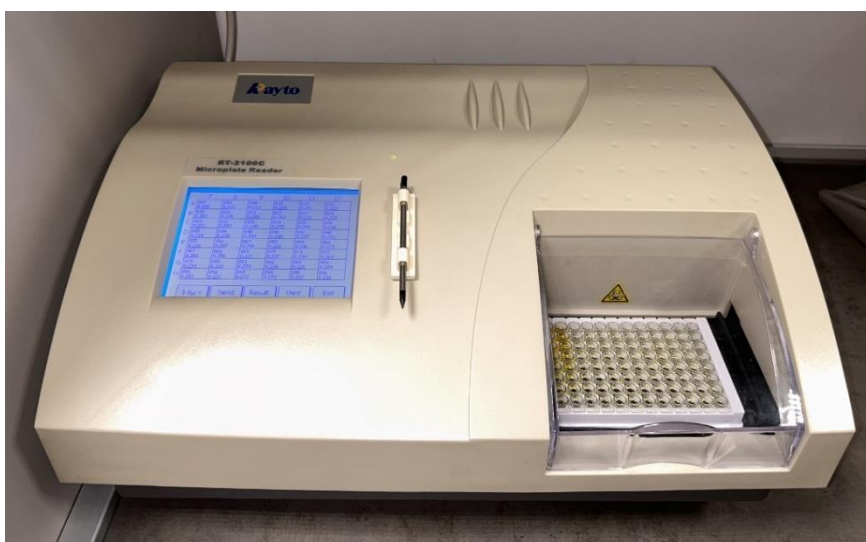
Стандарди познатог садржаја *Hu MMP-9*, контроле и узорци припремљени према упутству произвођача су пипетирани у обложене базенчиће након чега је следила прва инкубација (2 сата на собној температури) и испирање плоче (4 пута). Након испирања, додато је биотиниловано друго антитело *HU MMP9 Biotin Conjugate solution*.

После инкубације (1 сат) и испирања (4 пута) додат је ензим стрептавидин-пероксидаза. Ензим се везује за биотиниловано антитело да би комплетирао четворочлани сендвич. Затим следи трећи период инкубације (30 минута) и испирања (4 пута) да би се уклонио сав невезани ензим. Додат је супстрат *Stabilized Chromogen, TMB (Tetramethylbenzidine)*, који делује на везани ензим и раствор је пребојаван. Интензитет овог обојеног производа је директно пропорционалан концентрацији *Hu MMP-9* присутног у испитиваном узорку. Реакција ензим-супстрат је завршена додавањем раствора „*Stop solution*“ чиме је дошло до визуелног мењања боје раствора из жуте у плаво (Слика 7).



Слика 7. Додавање раствора „*Stop solution*“.

Промена боје мерена је спектрофотометријским путем на *ELISA* читачу *Rayto RT 2100C Microplate Reader (China)*, на таласној дужини од  $450\text{ nm}$  (Слика 8). Стандардна крива је конструисана коришћењем стандарда из *ELISA* кита, а концентрација *MMP-9* у узорцима је одређена упоређивањем *O.D. (Optical Density)* узорака на стандардној криви.



Слика 8. *ELISA* читач *Rayto RT 2100C Microplate Reader (China)*.

#### 4.2.3.2. *Interleukin 1 Beta (IL-1 $\beta$ )*

Концентрација *IL-1 $\beta$*  одређена је применом *ELISA* кита (*Interleukin 1 Beta (IL1 $\beta$ ) Elisa Kit - Cloud-Clone Corp., CCC, USA*), опсега детекције 15.6 pg/mL–1,000 pg/mL, сензитивности 5.8 pg/mL.

Поступак теста обухвата “сендвич” *ELISA* процедуру, сличан је претходном, са одступањима према упутству произвођача.

Поступку претходи припрема узорака и реагенаса. Реагенси су припремљени и реконструисани су стандарди 15 минута пре анализе према упутству произвођача.

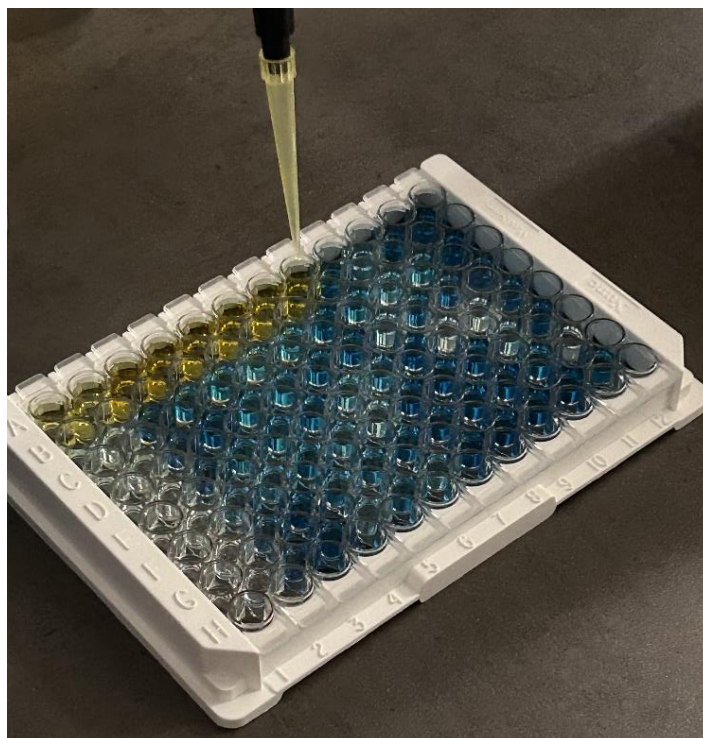
Микроплоча обезбеђена у овом комплекту је претходно обложена антителима специфичним за *IL-1 $\beta$* . Стандарди и узорци су додати у одговарајуће базенчиће микроплоче са биотин-коњугованим антителима специфичним за *IL-1 $\beta$*  и инкубирани 1 сат на температури од 37<sup>0</sup>С у инкубатору (*Eppendorf® Galaxy® 170S CO2 Incubator, North America*) (Слика 9) и након тога испирани (3 пута). Затим је авидин коњугован са пероксидазом корена рена (*Horseradish peroxidase*) додат у сваку микроплочу, инкубиран (30 минута на температури од 37<sup>0</sup>С) и испиран (5 пута).



Слика 9. Инкубатор (*Eppendorf® Galaxy® 170S CO2 Incubator, North America*).

Након додавања раствора *TMB* супстрата, само они базенчићи који садрже *IL-1 $\beta$* , антителима коњуговано са биотином и авидин коњуговани ензимом показали су промену боје. Реакција ензим-супстрат се завршила додавањем раствора сулфатне киселине и промена боје је мерена спектрофотометријски на таласној дужини од 450 nm на *ELISA*

читачу *Rayto RT 2100C Microplate Reader (China)* (Слика 10). Концентрација *IL-1 $\beta$*  у узорцима је затим одређивана поређењем *O.D.* узорака на стандардној криви.



Слика 10. Додавање раствора сулфатне киселине у микроплочу.

#### 4.2.3.3. *Vascular endothelial growth factor (VEGF)*

Концентрација *VEGF* одређена је применом *ELISA* кита (*VEGF ELISA Kit - Biopony Beijing Co., Ltd*), опсега детекције 1000 pg/mL – 15, 6 pg/mL, сензитивности 5 pg/mL.

Поступак *ELISA* теста је сличан, са одступањима у концентрацијама стандарда, и разликама у инкубационим периодима при анализирању. Читање резултата обављено је на исти начин као код претходно наведених анализа.

#### 4.2.4. ЦИТОЛОШКА И МОРФОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА ГИНГИВЕ

Истраживање је спроведено у Центру за патологију и патолошку анатомију Универзитетског клиничког центра у Нишу.

Осушени и фиксирани препарати брисева гингиве бојени су стандардном хематоксилин-еозин (*HE*) методом. По завршеном бојењу препарати су покривани покровним стакалцима и лепљени *DPX* лепком. Овако припремљени препарати су спремни за микроскопску анализу на великом увећању.

#### 4.2.4.1. HE бојење

Депарафинација:

1. Ксилол 1–5 минута
2. Ксилол 2–5 минута

Рехидратација:

1. 100% етанол – 5 минута
2. 96% етанол – 5 минута
3. Дестилована вода
4. *Muer* хематоксилин – 5 минута
5. Испирање обичном водом
6. Испирање дестилованом водом
7. Испирање у 96% етанолу – 10 потапања
8. Контра бојење еозином – 1,5 минута

Дехидратација:

1. 96% етанол – 5 минута
2. 100% етанол – 5 минута
3. Ксилол 3-5 минута
4. Ксилол 4-5 минута

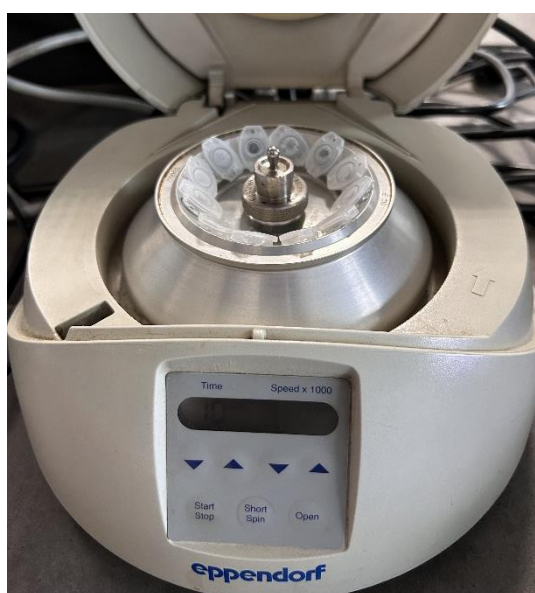
#### 4.2.4.2. Светлосна микроскопија и морфометријска анализа

За морфометријску анализу коришћен је софтверски пакет *ImageJ* верзија 1.52a (*Public Domain Software, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*). Микроскопска анализа обављена је на микроскопу *Nikon Eclipse 50i (Tokyo, Japan)* на објективу  $\times 40$ . Микрофотографије, у боји, добијене су дигиталном камером високе резолуције (*Nikon, DS-Fi1, Tokyo, Japan*), која је повезана са микроскопом. Након тога слика је пребачена на компатибилни рачунар и конвертована у слику резолуције 8 бита. Тако добијена слика мануелно је обрађивана, након калибрације, коришћењем компјутерског миша. Анализирани су следећи једарни параметри: површина (*Area*), обим (*perimeter, Perim*), циркуларност (*circularity, Circ*), заобљеност (*roundness, Round*), *Feret* дијаметар (*Feret diameter, Feret*), *Feret* угао (*FeretAngle*), минимални *Feret* (*MinFeret*), интегрисана оптичка густина (*Integrated Optical Density, IOD*) и чврстоћа једра (*Solidity*).

#### 4.2.5. МОЛЕКУЛАРНО ГЕНЕТИЧКА КВАЛИТАТИВНА *PCR* АНАЛИЗА ГИНГИВАЛНЕ ТЕЧНОСТИ

Истраживање је спроведено на Институту за молекуларну биологију и хуману генетику Стоматолошког факултета Универзитета у Београду по описаној процедури (273, 274).

Пре изолације *DNK* узорци су припремљени додавањем  $300 \mu\text{l}$   $50 \text{ mmol NaOH}$  и вортковани 10 секунди. Затим су узорци загревани у термомиксеру 5 минута на  $95^{\circ}\text{C}$ , додато је  $30 \mu\text{l}$   $1 \text{ M trisHCL}$  ( $\text{pH} = 8$ ), након чега су центрифугирани на 13000 обртаја у трајању од 2 минута (*Eppendorf MiniSpin®; Hamburg, Germany*) (Слика 11).



Слика 11. Центрифугирање узорака (*Eppendorf MiniSpin®; Hamburg, Germany*).

Изолација евентуално присутне бактеријске *DNK* вршена је третирањем узорака протеиназом *K* (*MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania*) на температури од  $56^{\circ}\text{C}$  у трајању од 30 минута. Затим су узорци загревани на температури од  $95^{\circ}\text{C}$  у трајању од 15 минута да би се извршила инактивација ензима. Тако третиран материјал чувао се на  $-20^{\circ}\text{C}$  до *PCR* процедуре.

Узорци гингивалне течности испитивани су на присуство четири бактерије: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*.

Позитивне контроле биле су *DNK* добијене из референтних сојева микроорганизама. За негативне контроле коришћена је дестилована вода, узорак *DNK* је изостављен.

*PCR* анализа је вршена у смеси запремине од 25  $\mu$ l следећег садржаја: 1X *PCR* пуфер (*MBI Fermentas*), 1,5 mM *MgCl*<sub>2</sub>, 0,2 mM *dNTPs*, 0,375  $\mu$ M сваког прајмера специфичних за врсту, 1 јединица *Taq DNA polymerase* (*MBI Fermentas*), и 5  $\mu$ l изолата бактеријске *DNK*.

За примену *PCR* технике коришћене су познате секвенце прајмера. Секвенце свих прајмера и дужине очекиваних ампликона приказане су у табели 6.

**Табела 6.** Прајмери коришћени за *PCR* анализу присуства бактерија, температуре хибридизације и дужина очекиваних ампликона.

Бактерија	Секвенце прајмера (5'-3')	Температура хибридизације	Дужина ампликона
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	CAC TTA AAG GTC CGC CTA CGT GC	55°C	500 bp
<i>Prevotella intermedia</i>	GTT GCG TGC ACT CAA GTC CGC C	55°C	259bp
<i>Tannerella forsythia</i>	GTA GAG CTT ACA CTA TAT CGC AAA CTC CTA	55°C	600 bp
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	CAA TAC TCG TAT CGC CCG TTA TTC	55°C	400 bp

*PCR* анализа је изведена у термалном циклусу (*Peqlab, PeqSTAR 2X; Erlangen, Germany*) (Слика 12) који почиње почетном денатурацијом (95°C током 3 минута). Почетном денатурацијом обезбеђује се раздвајање свих дволанчаних *DNK* (*dsDNK*) молекула у појединачне ланце након чега следи циклус од 35 понављања (Слика 13).

*PCR* циклус:

- Денатурација** (94°C за 45 секунди) – *DNK* полимеразе спроводе синтезу комплементарног ланца *DNK* помоћу једноланчане шаблоне, тако да се дволанчана *DNK* (*dsDNK*) денатурише да би се одвојили ланци молекула.
- Хибридизација** (55°C у трајању од 60 секунди) – да би се копирала *DNK*, полимеразе захтевају кратку секвенцу која се зове прајмер. *PCR* користи два прајмера, од којих је сваки комплементаран супротним ланцима региона *DNK*, који су денатурисани загревањем. Они се не могу везати за ланац *DNK* на температури од 95°C, па се епрувета хлади на 45–60°C.

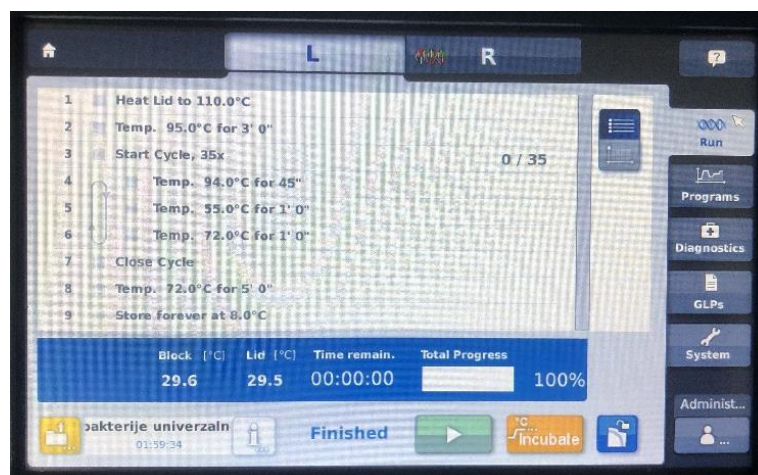


3. **Елонгација** ( $72^{\circ}\text{C}$  за 60 секунди) - елонгација прајмера завршава један *PCR* циклус. Молекули прајмера се издужеју дејством *DNK* полимеразе. Због више-струког излагања високим температурама, за *PCR* се користи термостабилна *DNK* полимеразе – обично *Taq polymerase*. Време потребно за ову фазу зависи од дужине циљне секвенце (брзина елонгације прајмера помоћу *Taq polymerase* је око 50–100 нуклеотида/сек)

Након завршетка циклуса следи финална елонгација ( $72^{\circ}\text{C}$  за 5 минута).



Слика 12. Апарат за *PCR* анализу (Peqlab, PeqSTAR 2X; Erlangen, Germany).



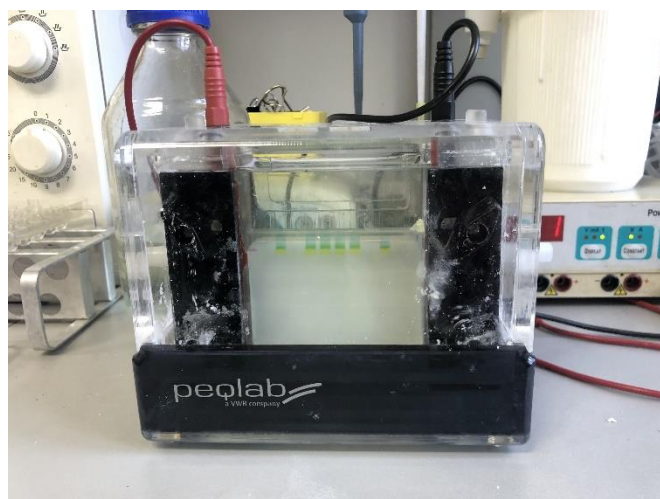
Слика 13. Термални приказ *PCR* циклуса.



Производи *PCR* анализирани су електрофорезом на 8% полиакриламидном гелу у *TBE* (*tris-borate-EDTA* (10x) *Thermo Fisher Scientific*<sup>TM</sup>; *Waltham, MA, USA*) пуферу, при константном напону струје од 200 V током 60 минута.

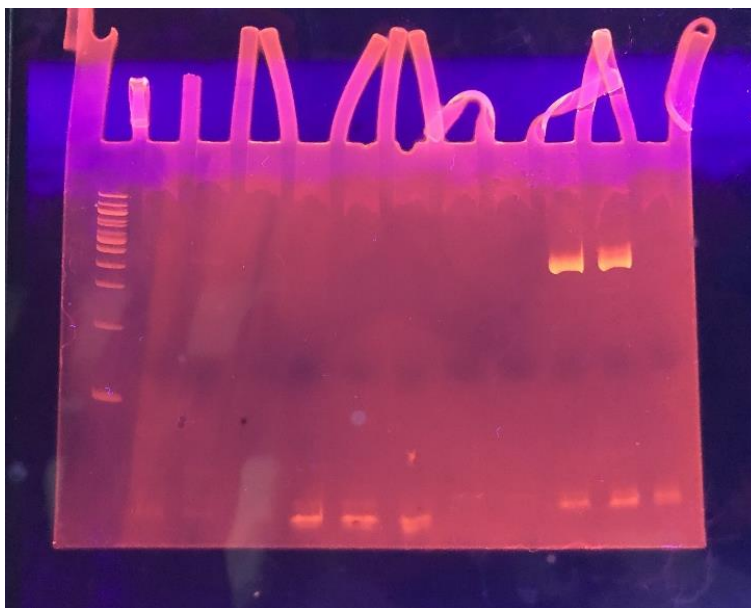
Полиакриламидни гел је прављен према следећем упутству: 3,90 ml *H<sub>2</sub>O*, 1,30 ml *5xTBE* (*tris-borate EDT*) пуфер, 1,30 ml 40% *Aa* (акриламид/бисакриламид), 46 μl 10% *APS* (амонијум персулфат), 8,4 μl *Temed*.

Дужина апмликона *DNK* молекула утврђена је методом електрофорезе на гелу (Слика 14). Смеша *DNK* фрагмената стављена је на удубљења направљена на почетку полимеризованог гела. Гел се налази у контакту са течним *TBE* пуфером који омогућава добро провођење електричне енергије. *DNK* фрагменти имају негативно наелектрисање. Пропуштањем струје кроз електроде сваки фрагмент *DNK* мигрира од негативно наелектрисане катоде ка позитивно наелектрисаној аноди.



**Слика 14.** Апарат за електрофорезу (*PerfectBlue*<sup>TM</sup>, *Peqlab, Erlangen, Germany*).

За визуелизацију амплификованих фрагмената *DNK*, гел је бојен етидијум-бромидом (*Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA*) и осветљен *UV* трансилуминатором (*Benchtop UV Transilluminators; UVP, LLC, Upland, CA*). Појава електрофоретских трака у гелу означавала је присуство одговарајућих бактерија (Слика 15).



Слика 15. Визуелизација амплификованих фрагмената *DNK* на полиакриламидном гелу.

#### 4.2.6. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Добијени подаци статистички су обрађени у програму *SPSS 20.0*. Континуалне варијабле представљене су аритметичким срединама ( $X$ ), стандардним девијацијама ( $SD$ ) и медијанама ( $Md$ ). Квалитативне варијабле представљене су као апсолутни бројеви ( $n$ ) и процентуално (%). У истраживању је коришћен *Shapiro-Wilk*, *Student's' t test for independent samples*, *Mann-Whitney*, *Paired-Samples Student t-test* и *Wilcoxon Signed Ranks test*. За утврђивање статистички значајне разлике континуалних варијабли при вишеструким поновљеним мерењима коришћена је анализа варијансе за поновљена мерења (*Analyses of Variance for Repeated Measures, RM ANOVA*) или *Friedman* тест, а величина ефекта независних параметара на зависне дефинисани су *Partial Eta Square*, односно *Kendall* тестом. *Pearson's chi-squared test* и његове модификације, у зависности од фреквенција појединих модалитета, коришћен је за поређење расподеле модалитета квалитативних варијабли између група. За поређење промена заступљености модалитета током поновљених мерења употребљаван је *McNemar* и *Cochran Q test*. Као статистички значајна оцењивана је вредност од  $p < 0,05$ .

### 4.3. ПИЛОТ СТУДИЈЕ ЗА ПОТВРЂИВАЊЕ ВАЛИДНОСТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ ДИЗАЈНА

Пре реализације описаног експерименталног дизајна дисертације изведене су две пилот студије, а у циљу оптимизације методологије и добијања прелиминарних резултата, који би показали научну и стручну оправданост истраживања. Испитаници обе пилот студије били су увршћени у коначни експериментални дизајн докторске дисертације.

#### 4.3.1. ИСПИТИВАЊЕ КЛИНИЧКИХ И ЦИТОМОРФОМЕТРИЈСКИХ ПРОМЕНА НА ТКИВУ ГИНГИВЕ ПРЕ И ПОСЛЕ БРУШЕЊА ЗУБА

Истраживање је обухватло 19 испитаника од 35 до 65 година старости, оба пола, без оралних и системских обољења и без протетских надокнада. Пре истраживања пацијенти су пародонтолошки санирани.

Сваком од испитаника брушен је очњак у горњој вилици од стране истог терапеута за металокерамичку круницу. Демаркација препарације била је локализована 0,3 до 0,5 *mm* у простору гингивалног сулкуса (субгингивална демаркација). Обављена је по свим литературно утврђеним постулатима, уз минимална оштећења гингивалног ткива.

Опсервациони интервали били су 15 минута, односно 24 и 72 h након протетског третмана. Узорци који су узети 5 минута пре брушења зуба чинили су контролну групу.

У циљу одређивања клиничких промена након брушења зуба са субгингивалном демаркацијом препарације, одређивани су ГИ и ИКРВ, у сва четири опсервациона интервала, претходно описаном методологијом. Такође одрађена је и цитоморфометријска анализа узорака након истих опсервационих интервала. Анализирани су следећи једарни параметри: површина (*Area*), обим (*Perimeter*, *Perim*), циркуларност (*Circularity*, *Circ*), заобљеност (*Roundness*, *Round*), *Feret* дијаметар (*Feret diameter*, *Feret*), *Feret* угао (*FeretAngle*), минимални *Feret* (*MinFeret*), интегрисана оптичка густина (*Integrated Optical Density*, *IntDen*) и чврстоћа једра (*Solidity*).

#### *Статистичка обрада података*

Добијени подаци статистички су обрађени у програму *SPSS 20.0*. Континуалне варијабле представљене су аритметичким срединама (*X*), стандардним девијацијама (*SD*) и медијанама (*Md*). За утврђивање нормалности расподеле континуалних варијабли коришћен је *Shapiro-Wilk* тест. Како је расподела испитиваних параметара одступала од нормалне, поређење вредности континуалних варијабли два поновљена мерења у оквиру

испитиваних узорака вршено је *Wilcoxon Signed Ranks test*-ом. За утврђивање статистички значајне разлике континуалних варијабли при вишеструким поновљеним мерењима коришћен је *Friedman* тест, а величина ефекта времена дефинисана је *Kendall* коефицијентом конкорданције. Као статистички значајна разлика оцењивана је вредност  $p < 0,05$ . *Student t-test* је коришћен за поређење вредности континуалних варијабли за независне узорке у случају нормалне дистрибуције, *Mann Whitney* тест је коришћен када дистрибуција узорка одступала од нормалне.

#### **4.3.2. ИСПИТИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ MMP-9 И ПРИСУСТВА ПЕРИОДОНТОПАТОГЕНА У ГИНГИВАЛНОЈ ТЕЧНОСТИ ПРЕ И ПОСЛЕ БРУШЕЊА ЗУБА**

Студија је изведена на 20 испитаника, са индикацијом за брушење горњег очњака ради израде једне металокерамичке крунице. У истраживање су укључени испитаници оба пола, без системских и инфективних обољења, непушачи, узраста 30-40 година, без патолошких промена на меким ткивима усне дупље, са здравим пародонтом, без кариозних лезија и протетских надокнада. Испитаници нису узимали антибиотике два месеца пре студије.

Испитаници су подељени у две групе у односу на позицију демаркације препарације: у Г1 брушење је изведено са демаркацијом препарације позиционираном 0,3 до 0,5 mm испод нивоа руба гингиве (субгингивално) (n=10), док је у Г2 демаркација препарације локализована у нивоу руба гингиве (еквигингивално) (n=10). Позиција демаркације препарације одређивана је према клиничким критеријумима.

Брушење зуба је обављено према стандардима препарације уз максимално могуће очување маргиналног руба гингиве у трајању од 15 минута од стране једног терапута.

Контролни узорци узимани су 5 минута пре брушења зуба, а експериментални узорци 15 минута, 24 и 72 сата након брушења зуба.

Одређивање концентрације MMP-9 вршено је *ELISA* тестом, методологијом која је већ објашњена.

Узорковање за PCR анализу подразумевало је узимање узорака у обе групе испитаника, за сва четири опсервациона интервала. Узорци гингивалне течности испитивани су на присуство четири бактерије: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* и *Porphyromonas gingivalis*.

*Статистичка обрада података*

За статистичку обраду резултата коришћен је софтверски програм *SPSS 20.0*. Дескриптивним статистичким методама континуиране варијабле су приказане аритметичким срединама ( $X$ ), стандардним девијацијама ( $SD$ ), а категоријалне варијабле као апсолутни број ( $n$ ) или проценат (%). За континуиране варијабле процењена је нормалност расподеле *Shapiro-Wilk* тестом. Разлика вредности *MMP-9* између група и у посматраном времену је процењена анализом варијансе за поновљена мерења (*Analyses of Variance for Repeated Measures, RM ANOVA*). *Fisher*-ов тест тачне вероватноће је коришћен за анализу разлике учесталости узрочника између група, а *Cohran* тест и *Mc Nemar* за разлику учесталости узрочника у посматраном периоду. Статистичке хипотезе су тестиране на нивоу статистичке значајности  $p < 0,05$ .

## 5. РЕЗУЛТАТИ

### 5.1. РЕЗУЛТАТИ КЛИНИЧКИХ ПАРАМЕТАРА НАКОН БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ

#### Вредности *CPITN*

Пре брушења зуба сваком пацијенту је одређиван *CPITN* индекс. Добијене вредности дате су у табели 7.

Табела 7. Вредности *CPITN* пре брушења зуба.

Група	X ± SD	Ме
Г1	1,61 ± 0.62	(2,00)
Г21	1,68 ± 0,71	(2,50)

Вредности континуираних варијабли дате као X ± SD (Ме)

Утврђено је да није било статистички значајних разлика у вредностима *CPITN* између Г1 и Г2.

#### Вредности ГИ и ИКРВ

У истраживању су опсервиране вредности ГИ и ИКРВ 15 минута, 24 h и 72 h након брушења зуба у односу на контролне вредности (непосредно пре брушења зуба), код пацијената са субгингивалном (Г1) и еквигингивалном (Г2) демаркацијом препарације.

У табели 8 и графикону 1 приказане су вредности ГИ у различитим опсервационим интервалима у Г1 и Г2.

**Табела 8.** Вредности ГИ у контролној (ГИ1) и студијским групама током испитиваног периода (ГИ2, ГИ3, ГИ4) у односу на позицију демаркације препарације.

	Г1		Г2			
	X ± SD	(Me)	X ± SD	(Me)		
ГИ1 (К)	0,00 ± 0,00	(0,00)	0,00 ± 0,00	(0,00)		
ГИ2 (а)	1,90 ± 0,31 <sup>***KEbc</sup>	(2,00)	1,50 ± 0,51 <sup>***Kc*b</sup>	(1,50)		
ГИ3 (b)	1,50 ± 0,51 <sup>*E***Kc</sup>	(1,50)	1,20 ± 0,41 <sup>***Kc</sup>	(1,00)		
ГИ4 (c)	0,60 ± 0,50 <sup>***K</sup>	(1,00)	0,40 ± 0,50 <sup>***K</sup>	(0,00)		
	P	$\chi^2$	Kendall's W	p	$\chi^2$	Kendall's W
Friedman test	0,0000	52,91	0,88	0,0000	37,82	0,63

Подаци су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)

\* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001

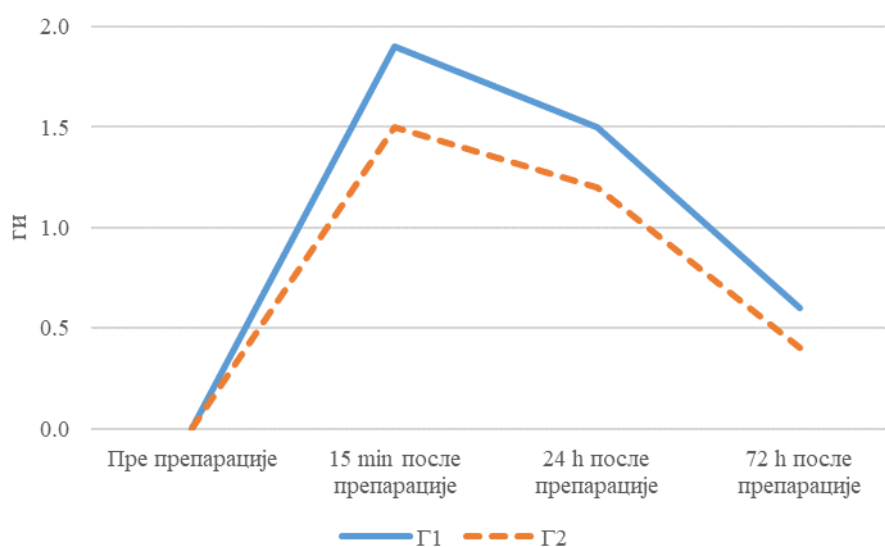
К – vs контрола (*Wilcoxon Signed Ranks Test*), Е – vs Г2 препарација (*Man-Whitney U test*),

b – vs ГИ3, c – vs ГИ4 (*Wilcoxon Signed Ranks Test*)

Легенда – опсервациони интервали:

ГИ1 (К) – пре брушења; ГИ2 (а) – 15 минута након брушења;

ГИ3 (b) – 24 h након брушења; ГИ4 (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 1.** Средње вредности ГИ у испитиваним групама током опсервационих интервала.

На иницијалном одређивању ГИ, непосредно пре интервенције, односно пре брушења вредности ГИ су 0 код оба типа препарације. Уочава се да је највиша вредност ГИ одмах након брушења, док су вредности ГИ у наредним периодима ниже, што указује на смиривање инфламације гингиве.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом у обе групе су у односу на контролу утврђене статистички значајно више вредности у сва три опсервациона интервала на нивоу значајности  $p < 0,001$ .

Поређењем вредности ГИ у узорцима након брушења зуба (ГИ2, ГИ3 и ГИ4) уочава се да су вредности ГИ више у Г1 у односу на Г2, са статистички значајним разликама за ГИ2 ( $p < 0,001$ ) и ГИ3 ( $p < 0,05$ ), док у последњем опсервационом интервалу (ГИ4) нема статистички значајне разлике.

Поређећи вредности ГИ у студијским узорцима *Friedmanовим* тестом код оба типа препарације су утврђене статистички значајне разлике ГИ током испитиваног периода ( $p < 0,001$ ), а вредности *Kendallovog W* указују на висок ефекат ( $p > 0,05$ ) препарације на промене ГИ током времена. Више вредности код субгингивалне (0,88) у односу на еквигингивалну (0,63) указују на већи инфламаторни ефекат субгингивалне препарације.

Међусобним поређењем вредности ГИ узорака након брушења понаособ (одређиване у опсервационим интервалима) *Wilcoxon Signed Ranks* тестом утврђене су код оба типа препарације статистички значајне разлике између свих вредности на нивоу ( $p < 0,001$ ) изузев код Г2 препарације између ГИ2 и ГИ3 када је статистичка значајност нижа ( $p < 0,05$ ).



У табели 9 и графикону 2 приказане су вредности ИКРВ у различитим опсервационим интервалима у Г1 и Г2.

**Табела 9.** Вредности ИКРВ у контролној (ИКРВ1) и студијским групама током испитиваног периода (ИКРВ2, ИКРВ3, ИКРВ4) у односу на позицију демаркације препарације.

	Г1		Г2			
	X ± SD	(Me)	X ± SD	(Me)		
ИКРВ1 (К)	0,00 ± 0,00	(0,00)	0,00 ± 0,00	(0,00)		
ИКРВ2 (а)	2,20 ± 0,41 ***КЕbc	(2,00)	1,80 ± 0,41 ***Кbc	(2,00)		
ИКРВ3 (b)	1,20 ± 0,61 *E***Кc	(1,00)	0,90 ± 0,31 ***Кc	(1,00)		
ИКРВ4 (c)	0,50 ± 0,51 *E***К	(0,50)	0,20 ± 0,41 *К	(0,00)		
Friedman test	P	$\chi^2$	Kendall's W	p	$\chi^2$	Kendall's W
	0,0000	54,50	0,91	0,0000	54,50	0,91

Подаци су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)

\* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001

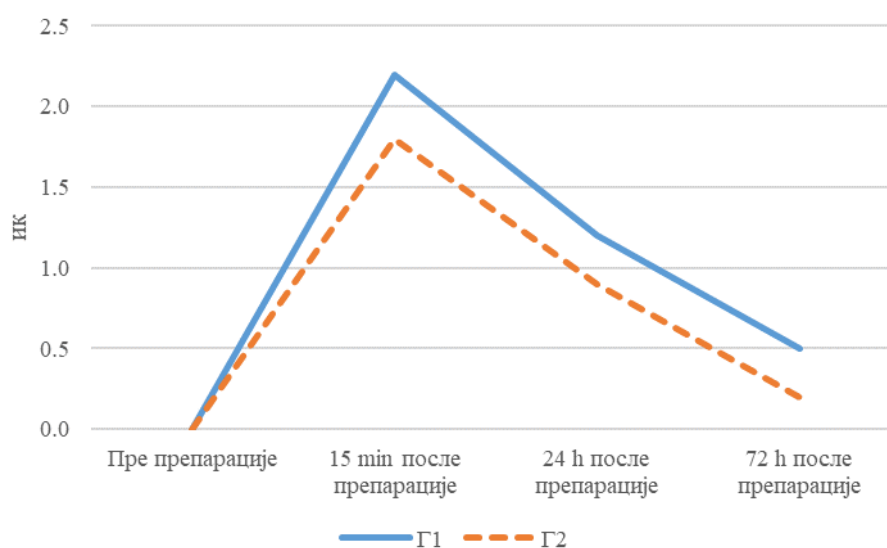
К – vs контрола (*Wilcoxon Signed Ranks Test*), Е – vs Г2 (*Man-Whitney U test*),

b – vs ИКРВ3, c – vs ИКРВ4 (*Wilcoxon Signed Ranks Test*)

Легенда – опсервациони интервали:

ИКРВ1 (К) – пре брушења; ИКРВ2 (а) – 15 минута након брушења;

ИКРВ3 (b) – 24 h након брушења; ИКРВ4 (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 2.** Средње вредности ИКРВ у испитиваним групама током опсервационих интервала.

На иницијалном одређивању ИКРВ, непосредно пре интервенције вредности су биле 0 код оба типа препарације. Највише вредности ИКРВ су одмах након брушења, а вредности у наредним периодима су ниже, што говори о смиривање инфламације гингиве са временом.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом у обе испитиване групе су у односу на контролу утврђене статистички значајно више вредности у сва три интервала одређивања на нивоу  $p < 0,001$ , изузев у Г2 за ИКРВ4 где је ниво значајности нижи ( $p < 0,05$ ).

Поређењем вредности ИКРВ у студијским узорцима (ИКРВ2, ИКРВ3, и ИКРВ4) уочава се да су вредности ИКРВ статистички значајно више у Г1 у односу на Г2, и то код ИКРВ2 на максималном нивоу ( $p < 0,001$ ), док је ниво код ИКРВ2 и ИКРВ3  $p < 0,05$ .

Поређењем вредности ИКРВ у студијским узорцима *Friedmanовим* тестом код оба типа препарације су утврђене статистички значајне разлике током испитиваног периода ( $p < 0,001$ ), а вредности *Kendallovog W* указују на висок ефекат препарације на промене ИКРВ током времена који је у овом случају исти код оба типа препарације.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом утврђене су статистички значајне разлике код оба типа препарације између свих вредности ИКРВ студијских узорака током времена понаособ, на нивоу  $p < 0,001$ , што указује на велике промене ИКРВ током испитиваног периода.

## **5.2. РЕЗУЛТАТИ ЦИТОМОРФОМЕТРИЈСКИХ ПРОМЕНА НА ТКИВУ ГИНГИВЕ НАКОН БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ**

У истраживању су опсервиране вредности цитоморфометријских параметара гингиве пре брушења зуба (контролни узорци бриса гингиве) и 15 минута, 24 h и 72 h након брушења зуба (студијски узорци бриса гингиве), код пацијената са субгингивалном (Г1) и еквигингивалном (Г2) демаркацијом препарације.

Анализирани су следећи једарни параметри: површина (*Area*), обим (*Perimeter*, *Perim*), циркуларност (*Circularity*, *Circ*), заобљеност (*Roundness*, *Round*), *Feret* дијаметар (*Feret diameter*, *Feret*), *Feret* угао (*FeretAngle*), минимални *Feret* (*MinFeret*), интегрисана оптичка густина (*Integrated Optical Density*, *IntDen*) и чврстоћа једра (*Solidity*).

У табели 10 и на графикону 3 приказане су вредности *Area* пре и након препарације зуба код обе групе испитаника.

**Табела 10.** Вредности *Area* пре (*Area1*) и након препарације зуба (*Area2*, *Area3*, *Area4*) у односу на позицију демаркације препарације.

	Г1			Г2		
	X ± SD	(Me)		X ± SD	(Me)	
Area1 (K)	76,411 ± 16,365	(72,691)		73,894 ± 15,472	(70,965)	
Area2 (a)	67,541 ± 14,733 <sup>*K</sup>	(67,306)		70,506 ± 16,283	(65,763)	
Area3 (b)	69,347 ± 18,949	(66,641)		74,813 ± 16,162	(72,116)	
Area4 (c)	74,198 ± 19,818	(69,414)		72,363 ± 20,158	(67,457)	
Friedman test	p	$\chi^2$	Kendall's W	p	$\chi^2$	Kendall's W
	0,2035	4,60	0,05	0,0602	7,40	0,08

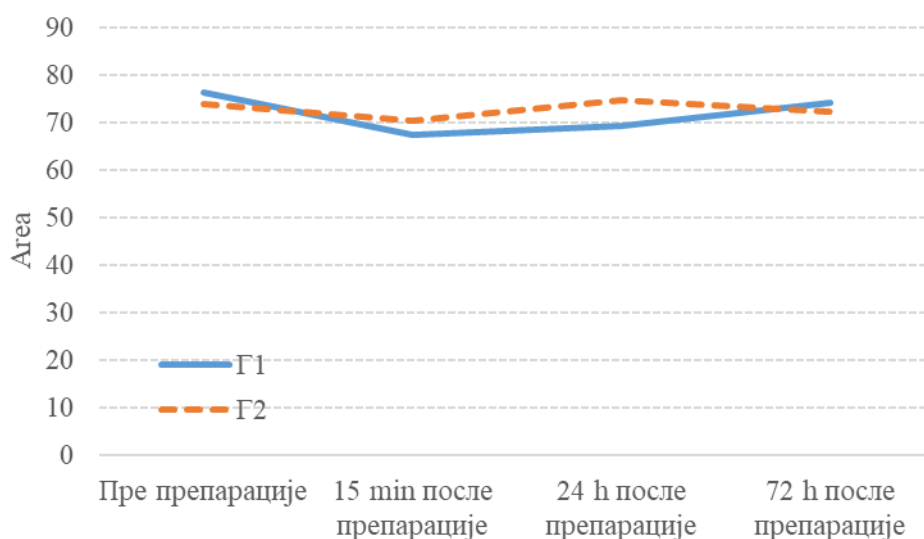
Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)

\* –  $p < 0,05$ , K – vs контрола (*Wilcoxon Signed Ranks Test*),

Легенда – опсервациони интервали:

Area1 (K) – пре брушења; Area2 (a) – 15 минута након брушења;

Area3 (b) – 24 h након брушења; Area4 (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 3.** Средње вредности *Area* у испитиваним групама током опсервационих интервала.

У обе испитиване групе, 15 минута након препарације долази до пада вредности *Area*, које у наредним периодима расту.

Поређењем вредности *Area*, *Man-Whitney* тестом, између испитиваних група нису утврђене статистички значајне разлике ни у једном од опсервационих интервала.

*Friedman*-овим тестом код оба типа демаркације препарације нису утврђене статистички значајне промене вредности *Area* током целог испитиваног периода. Изузетно ниске вредности *Kendallovog W* теста указују на безначајан ефекат брушења зуба на промене вредности *Area*.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом у односу на почетну вредност у групи Г1 утврђена је статистички значајно нижа вредност *Area*, 15 минута након брушења у односу на вредност пре брушења ( $p < 0,05$ ). Упоредјујући вредности овог параметра са вредностима пре брушења, у остала два опсервациона интервала након брушења, није било статистички значајне разлике у групи Г1. У групи Г2 поређењем вредности *Area* пре и након брушења нису установљене статистички значајне разлике.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом, поређењем вредности параметра у испитиваним периодима опсервације након брушења зуба понаособ, такође нису утврђене статистички значајне разлике вредности *Area*, па промене овог параметра током времена након брушења зуба такође нису значајне.

У табели 11 и на графикону 4 приказане су вредности *Perim* пре и након брушења зуба код обе групе испитаника (Г1 и Г2).

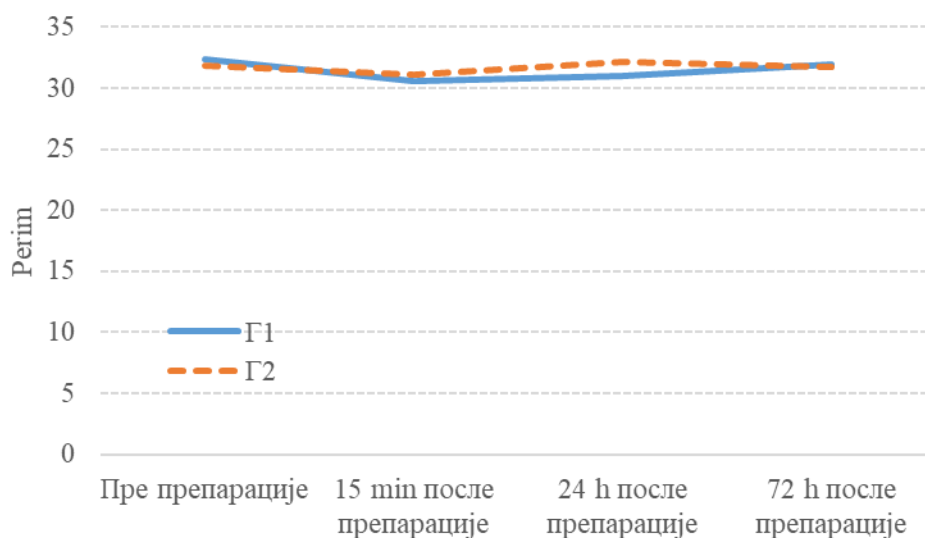
**Табела 11.** Вредности *Perim* пре (*Perim1*) и након брушења зуба (*Perim2*, *Perim3*, *Perim4*) у односу на позицију демаркације препарације.

	Г1		Г2			
	X ± SD	(Me)	X ± SD	(Me)		
Perim1 (K)	32,357 ± 3,562	(31,322)	31,846 ± 3,256	(31,163)		
Perim2 (a)	30,614 ± 3,148	(30,563)	31,111 ± 3,340	(30,259)		
Perim3 (b)	30,997 ± 3,812	(30,558)	32,151 ± 3,420	(31,680)		
Perim4 (c)	31,951 ± 3,695	(30,801)	31,748 ± 3,912	(30,667)		
Friedman test	p	$\chi^2$	Kendall's W	p	$\chi^2$	Kendall's W
	0,1498	5,32	0,06	0,0560	7,56	0,08

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)

Легенда – опсервациони интервали:

Perim1 (K) – пре брушења; Perim2 (a) – 15 минута након брушења;  
Perim3 (b) – 24 h након брушења; Perim4 (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 4.** Средње вредности *Perim* у испитиваним групама током опсервационих интервала.

У обе испитиване групе, 15 минута након препарације долази до пада вредности *Perim*, које у наредним периодима расту.

Поређењем вредности *Perim*, одговарајућим тестом за поређење независних узорака, између испитиваних група нису утврђене статистички значајне разлике ни у једном од опсервационих интервала.

*Friedman*-овим тестом код оба типа препарације нису утврђене статистички значајне промене вредности *Perim* током целог испитиваног периода. Веома ниске вредности *Kendallovog W* теста указују на безначајан ефекат препарације зуба на промене вредности *Perim*.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом у испитиванима групама нису утврђене статистички значајне разлике вредности *Perim* ни у једном од испитиваних интервала након препарације у односу на почетну (контролну) вредност.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом у испитиваним групама, поређењем вредности *Perim* у испитиваним периодима након препарације понаособ, такође нису утврђене статистички значајне разлике, те промене овог параметра ни током овог периода нису статистички значајне.

У табели 12 и на графикону 5 приказане су вредности *Circ* пре и након препарације зуба код обе групе испитаника (Г1 и Г2).

**Табела 12.** Вредности *Circ* пре (*Circ1*) и након препарације зуба (*Circ2*, *Circ3*, *Circ4*) у односу на позицију демаркације препарације.

	Г1		Г2			
	X ± SD	(Me)	X ± SD	(Me)		
<i>Circ1</i> (К)	0,886 ± 0,032	(0,891)	0,884 ± 0,031	(0,889)		
<i>Circ2</i> (а)	0,889 ± 0,027	(0,895)	0,896 ± 0,033	(0,898)		
<i>Circ3</i> (б)	0,885 ± 0,035	(0,894)	0,895 ± 0,025	(0,900)		
<i>Circ4</i> (с)	0,894 ± 0,034	(0,901)	0,883 ± 0,026	(0,879)		
Friedman test	p	$\chi^2$	Kendall's W	p	$\chi^2$	Kendall's W
	0,9536	0,33	0,00	0,0158*	10,35	0,12

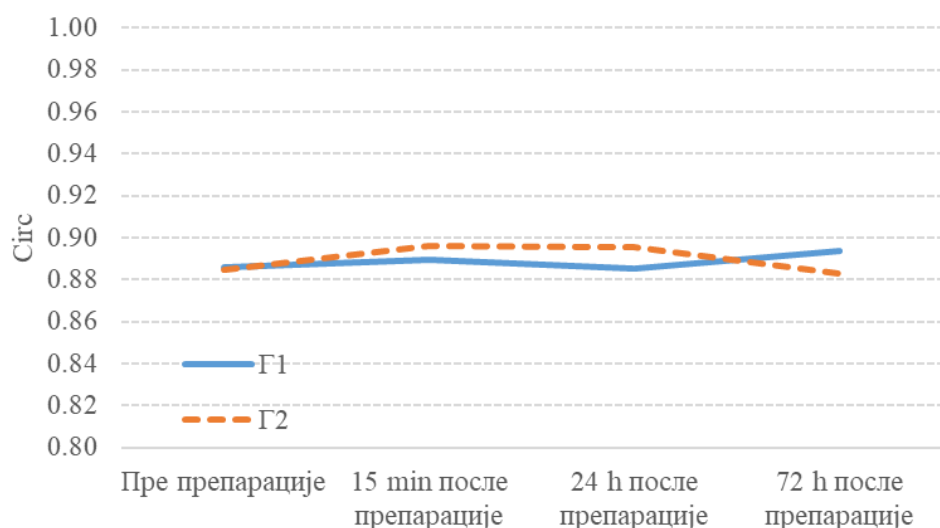
Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)

\* – p<0,05

Легенда – опсервациони интервали:

*Circ1* (К) – пре брушења; *Circ2* (а) – 15 минута након брушења;

*Circ3* (б) – 24 h након брушења; *Circ4* (с) – 72 h након брушења.



**Графикон 5.** Средње вредности *Circ* у испитиваним групама током опсервационих интервала.

У обе испитиване групе, 15 минута након интервенције долази до благог раста вредности *Circ*, које у наредним периодима опадају, али у Г1 групи вредност након 72 h бележи изванредан пораст.

Поређењем вредности *Circ*, одговарајућим тестом за поређење независних узорака, између испитиваних група ни у једном од опсервационих интервала нису утврђене статистички значајне разлике.

Поређењем вредности *Circ*, *Friedman*-овим тестом, у групи Г1 нису утврђене статистички значајне промене током испитиваног периода, а изузетно ниска вредност *Kendallovog W* теста указује на безначајан ефекат препарације на промене *Circ* током испитиваног периода. Међутим, у групи Г2, на основу *Friedman*-овог теста, промене *Circ* у испитиваном периоду су статистички значајне ( $p < 0,05$ ), а вредност *Kendallovog W* теста од 0,12 указује на мали ефекат препарације на промене *Circ* у овој групи.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом у испитиваним групама нису утврђене статистички значајне разлике *Circ* ни у једном од периода после препарације у односу на вредност овог параметра пре препарације.

Поређењем вредности *Circ* након препарације понаособ, *Wilcoxon Signed Ranks* тестом, између опсервационих интервала у испитиваним групама нису утврђене статистички значајне разлике вредности овог параметра.

У табели 13 и на графикону б приказане су вредности *Feret* пре и након препарације зуба код обе групе испитаника (Г1 и Г2).

**Табела 13.** Вредности *Feret* пре (*Feret1*) и након препарације зуба (*Feret2*, *Feret3*, *Feret4*) у односу на позицију демаркације препарације.

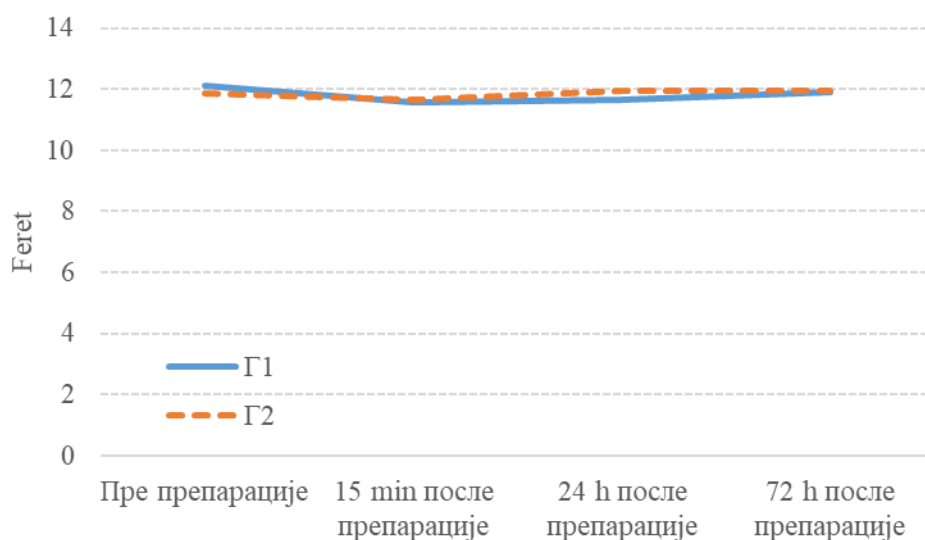
	Г1			Г2		
	X ± SD	(Me)		X ± SD	(Me)	
<i>Feret1</i> (K)	12,123 ± 1,350	(11,736)		11,845 ± 1,200	(11,736)	
<i>Feret2</i> (a)	11,577 ± 1,170	(11,591)		11,654 ± 1,094	(11,383)	
<i>Feret3</i> (b)	11,660 ± 1,367	(11,279)		11,952 ± 1,265	(11,826)	
<i>Feret4</i> (c)	11,915 ± 1,258	(11,619)		11,937 ± 1,465	(11,571)	
<i>Friedman</i>	p	$\chi^2$	Kendall's W	p	$\chi^2$	Kendall's W
test	0,9344	0,48	0,01	0,6149	1,80	0,02

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)

Легенда – опсервациони интервали:

*Feret1* (K) – пре брушења; *Feret2* (a) – 15 минута након брушења;

*Feret3* (b) – 24 h након брушења; *Feret4* (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 6.** Средње вредности *Feret* у испитиваним групама током опсервационих интервала.

У обе испитиване групе, 15 минута након препарације долази до пада вредности *Feret*, које у наредним периодима расту, иако се у Г2 бележи благи пад 72 h након препарације.

Поређењем вредности *Feret*, одговарајућим тестом за поређење независних узорака, између испитиваних група ни у једном од опсервационих интервала нису утврђене статистички значајне разлике.

Поређењем вредности *Feret*, *Friedman*-овим тестом, у испитиваним групама нису утврђене статистички значајне промене током испитиваног периода. Изузетно ниске вредност *Kendallovog W* теста, указују на безначајан ефекат препарације на промене вредности *Feret* током испитиваног периода.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом у испитиваним групама нису утврђене статистички значајне разлике вредности *Feret* ни у једном од интервала после препарације у односу на вредност овог параметра пре препарације.

Такође, поређењем вредности *Feret* након препарације, *Wilcoxon Signed Ranks* тестом, између опсервационих интервала понаособ, нису утврђене статистички значајне разлике вредности овог параметра у испитиваним групама.

У табели 14 и на графикону 7 приказане су вредности *IntDen* пре и након препарације зуба код обе групе испитаника (Г1 и Г2).



**Табела 14.** Вредности *IntDen* пре (*IntDen1*) и након препарације зуба (*IntDen2*, *IntDen3*, *IntDen4*) у односу на позицију демаркације препарације.

	Г1			Г2		
	X ± SD	(Me)		X ± SD	(Me)	
IntDen1 (K)	20,702 ± 6,082 <sup>**a</sup>	(21,232)		17,692 ± 6,047	(15,866)	
IntDen2 (a)	17,288 ± 4,257	(17,835)		16,032 ± 5,865	(14,735)	
IntDen3 (b)	18,268 ± 5,030	(17,476)		16,053 ± 2,854	(16,734)	
IntDen4 (c)	19,234 ± 5,541 <sup>**E</sup>	(18,734)		15,326 ± 4,385	(15,071)	
Friedman test	p	$\chi^2$	Kendall's W	p	$\chi^2$	Kendall's W
	0,0581	7,48	0,08	0,0758	6,88	0,08

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација

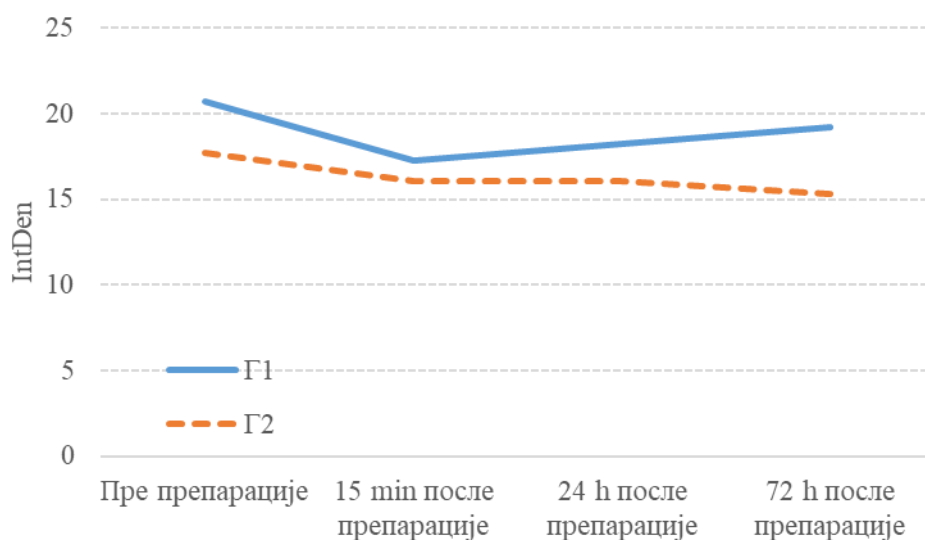
\*\* –  $p < 0,01$ , a – vs *IntDen2* (*Wilcoxon Signed Ranks* тест),

E – vs еквигингивална препарација (*Man-Whitney U* тест)

Легенда – опсервациони интервали:

IntDen1 (K) – пре брушења; IntDen2 (a) – 15 минута након брушења;

IntDen3 (b) – 24 h након брушења; IntDen4 (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 7.** Средње вредности *IntDen* у испитиваним групама током опсервационих интервала.

У обе испитиване групе, 15 минута након препарације долази до пада вредности *IntDen*, које у наредним периодима расту, али се у Г2 бележи пад вредности параметра 72 h након препарације.

Поређењем вредности *IntDen*, *Man-Whitney* тестом, између испитиваних група као једина статистички значајна разлика утврђена је виша вредност *IntDen* 72 h након препарације у Г1 на нивоу статистичке значајности од  $p < 0,01$ , што је последица претходно изнетог. У другим опсервационим интервалима није било статистички значајних разлика.

Поређењем вредности *IntDen*, *Friedman*-овим тестом, у испитиваним групама нису утврђене статистички значајне промене током испитиваног периода. Веома ниске вредност *Kendallovog W* теста указују на мали ефекат препарације на промене вредности *IntDen* током испитиваног периода.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом у испитиваним групама нису утврђене статистички значајне разлике вредности *IntDen* ни у једном од интервала после препарације у односу на вредност овог параметра пре препарације, изузев у Г1 где је 15 минута након препарације утврђена статистички значајно нижа вредност *IntDen* но пре препарације са нивоом статистичке значајности од  $p < 0,01$ , што указује на битан ефекат субгинигивалне препарације зуба на *IntDen* који се манифестује у овом опсервационом интервалу.

Поређењем вредности *IntDen* након препарације, *Wilcoxon Signed Ranks* тестом, између опсервационих интервала понаособ у испитиваним групама нису утврђене статистички значајне разлике вредности овог параметра.

У табели 15 и на графикону 8 приказане су вредности *FeretAngle* пре и након препарације зуба код обе групе испитаника (Г1 и Г2).

У Г1 након препарације евидентан је пад вредности *FeretAngle* у наредним опсервационим интервалима после препарације, док у Г2, 15 минута након препарације долази до раста вредности *FeretAngle*, која након 24 h опада, а потом, након 72 h од препарације поново благо расте.

Поређењем вредности *FeretAngle*, одговарајућим тестом за поређење независних узорака, ни у једном од опсервационих интервала нису утврђене статистички значајне разлике између испитиваних група.

*Friedman*-овим тестом у Г1 су утврђене статистички значајне промене током испитиваног периода ( $p < 0,05$ ), а вредност *Kendallovog W* теста указује на мали ефекат препарације на промене овог параметра. Због нормалне расподеле ове варијабле у Г2 коришћена је *RM ANOVA* за поновљена мерења којом нису утврђене статистички значајне промене вредности *FeretAngle* током испитиваног периода, иако је праг значајности веома близу статистички значајној разлици ( $p = 0,0597$ ). Међутим вредност

$\eta^2$  од 0,09 указује на средњи ефекат брушења на промене вредности *FeretAngle* током времена.

**Табела 15.** Вредности *FeretAngle* пре (*FeretAngle1*) и након препарације зуба (*FeretAngle2*, *FeretAngle3*, *FeretAngle4*) у односу на позицију демаркације препарације.

	Г1		Г2		
	X ± SD	(Me)	X ± SD	(Me)	
FeretAngle1 (K)	114,353 ± 23,783 <sup>*bc</sup>	(118,06)	103,485 ± 25,214	(97,335)	
FeretAngle2 (a)	109,584 ± 23,587 <sup>*c</sup>	(110,35)	106,829 ± 25,668 <sup>*bc</sup>	(101,319)	
FeretAngle3 (b)	97,114 ± 26,231	(96,89)	91,734 ± 23,014	(92,275)	
FeretAngle4 (c)	96,983 ± 24,796	(89,06)	93,934 ± 21,626	(95,589)	
	Friedman test			RM ANOVA	
	p	$\chi^2$	Kendall's W	p	F
	0,0223 <sup>*</sup>	9,60	0,11	0,0597	2,78
				$\eta^2$	0,09

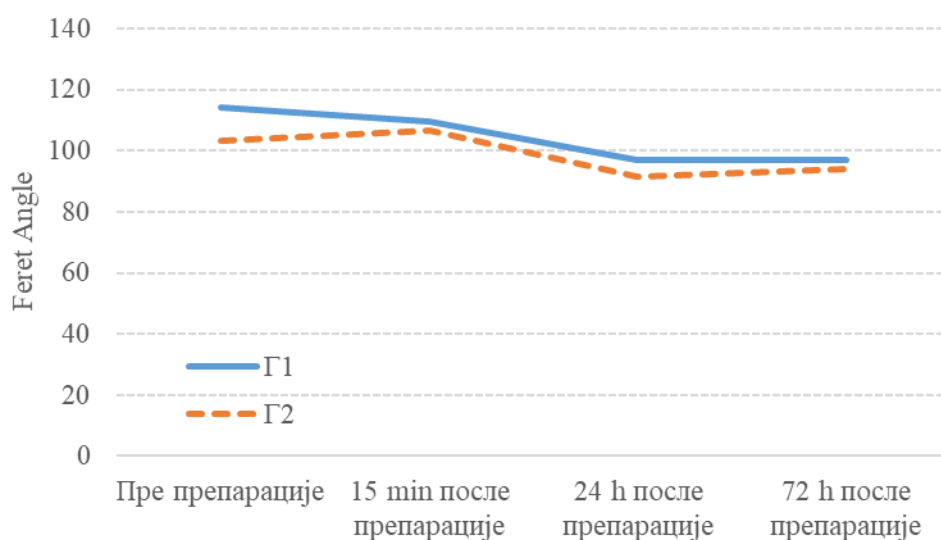
Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација

\* –  $p < 0,05$ , b – vs *FeretAngle3*, c – vs *FeretAngle4* (*Wilcoxon Signed Ranks Test* / *Paired sapled t-test*)

Легенда – опсервациони интервали:

FeretAngle1 (K) – пре брушења; FeretAngle2 (a) – 15 минута након брушења;

FeretAngle3 (b) – 24 h након брушења; FeretAngle4 (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 8.** Средње вредности *FeretAngle* у испитиваним групама током опсервационих интервала.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом у и Г1 у односу на вредност пре препарације утврђене су статистички значајно ниже вредности *FeretAngle* 15 минута н и 24 h након препарације ( $p < 0,05$ ). Студентовим *t*-тестом упарених узорака у Г2 нису утврђене статистички значајне разлике вредности овог параметра у поређењу са вредностима пре брушења.

Поређењем вредности *FeretAngle* након препарације, *Wilcoxon Signed Ranks* тестом, између опсервационих интервала понаособ, у Г1 је утврђена статистички значајно виша вредност *FeretAngle* након 15 минута од препарације, него након 24 h и 72 h ( $p < 0,05$ ). У Г2 применом Студентовог *t*-теста упарених узорака утврђено је да је вредност параметра након 15 минута од препарације статистички значајно виша у односу на вредности 24 h и 72 h од препарације ( $p < 0,05$ ).

У табели 16 и на графикону 9 приказане су вредности *MinFeret* пре и након препарације зуба код обе групе испитаника (Г1 и Г2).

**Табела 16.** Вредности *MinFeret* пре (*MinFeret1*) и након препарације зуба (*MinFeret2*, *MinFeret3*, *MinFeret4*) у односу на позицију демаркације препарације.

	Г1			Г2		
	X ± SD	(Me)		X ± SD	(Me)	
MinFeret1 (K)	8,458 ± 1,085 <sup>*a</sup>	(8,166)		8,433 ± 1,005	(8,268)	
MinFeret2 (a)	7,841 ± 1,030	(7,946)		8,197 ± 1,150	(8,120)	
MinFeret3 (b)	8,115 ± 1,087	(7,977)		8,466 ± 0,871	(8,189)	
MinFeret4 (c)	8,418 ± 1,289	(8,175)		8,288 ± 1,247	(8,137)	
	p	$\chi^2$	Kendall's W	p	$\chi^2$	Kendall's W
Friedman test	0,3080	3,60	0,04	0,3795	3,08	0,03

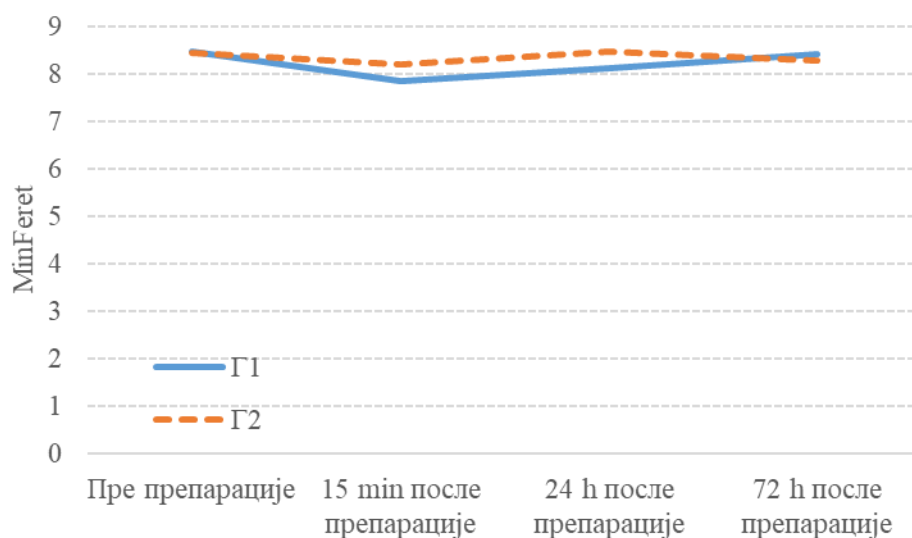
Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација

\* –  $p < 0,05$ , a – vs *MinFeret2* (*Wilcoxon Signed Ranks Test*)

Легенда – опсервациони интервали:

MinFeret1 (K) – пре брушења; MinFeret2 (a) – 15 минута након брушења;

MinFeret3 (b) – 24 h након брушења; MinFeret4 (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 9.** Средње вредности *MinFeret* у испитиваним групама током опсервационих интервала.

У обе испитиване групе, 15 минута након препарације долази до пада вредности *MinFeret*, које у наредним периодима расту, иако се у Г2 бележи благи пад 72 h након препарације.

Поређењем вредности *MinFeret*, одговарајућим тестом за поређење независних узорака, између испитиваних група ни у једном од опсервационих интервала нису утврђене статистички значајне разлике.

Поређењем вредности *MinFeret*, *Friedman*-овим тестом, у испитиваним групама нису утврђене статистички значајне промене током испитиваног периода. Веома ниске вредност *Kendallovog W* теста, указују на безначајан ефекат препарације на промене вредности *MinFeret* током испитиваног периода.

Изузев у Г1, где је вредност *MinFeret* 15 минута након препарације статистички значајно нижа у односу на вредност пре препарације ( $p < 0,05$ ). *Wilcoxon Signed Ranks* тестом у испитиваним групама нису утврђене статистички значајне разлике вредности *MinFeret* ни у једном од интервала после препарације у односу на вредност овог параметра пре препарације.

Такође, поређењем вредности *MinFeret* након препарације, *Wilcoxon Signed Ranks* тестом, између опсервационих интервала понаособ, у испитиваним групама нису утврђене статистички значајне разлике вредности овог параметра.

У табели 17 и на графикону 10 приказане су вредности *Round* пре и након препарације зуба код обе групе испитаника (Г1 и Г2).

**Табела 17.** Вредности *Round* пре (*Round1*) и након препарације зуба (*Round2*, *Round3*, *Round4*) у односу на позицију демаркације препарације.

	Г1		Г2	
	X ± SD	(Me)	X ± SD	(Me)
Round1 (K)	0,738 ± 0,089	(0,763)	0,755 ± 0,071	(0,756)
Round2 (a)	0,713 ± 0,061	(0,724)	0,752 ± 0,076 <sup>*S</sup>	(0,758)
Round3 (b)	0,732 ± 0,067	(0,738)	0,764 ± 0,060	(0,752)
Round4 (c)	0,744 ± 0,051	(0,736)	0,736 ± 0,065	(0,733)

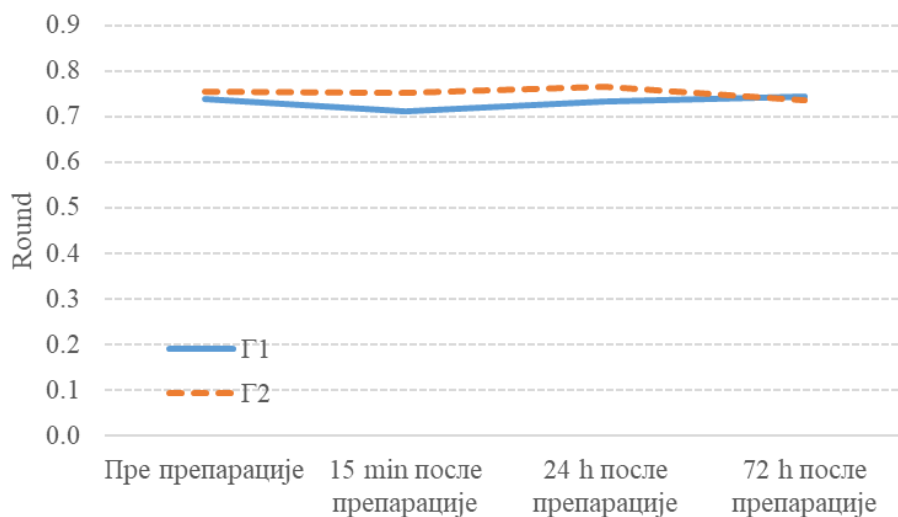
Friedman test			RM ANOVA		
p	$\chi^2$	Kendall's W	p	F	$\eta^2$
0,3560	3,24	0,04	0,3774	1,03	0,0343

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација

\* –  $p < 0,05$ , S – vs субгингивална препарација (*Student t test for independent*)

Легенда – опсервациони интервали:

Round1 (K) – пре брушења; Round2 (a) – 15 минута након брушења;  
Round3 (b) – 24 h након брушења; Round4 (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 10.** Средње вредности *Round* у испитиваним групама током опсервационих интервала.

У обе испитиване групе, 15 минута након препарације долази до пада вредности *Round*, које у наредним периодима расту, мада се у Г2 бележи благи пад 72 h након препарације.

Поређењем вредности *Round*, одговарајућим тестовима за поређење независних узорака, између испитиваних група, као једина статистичка значајност утврђена је статистички значајно виша вредност *Round* у Г2, 15 минута након препарације ( $p < 0,05$ ). У другим опсервационим интервалима није било статистички значајних разлика између испитиваних група.

Поређењем вредности *Round*, *Friedman*-овим тестом, у групи Г1 нису утврђене статистички значајне промене током испитиваног периода, а ниска вредност *Kendall's W* теста указује на безначајан ефекат препарације на промене вредности *Round* током испитиваног периода. Због нормалне расподеле ове варијабле у Г2 коришћена је *RM ANOVA* за поновљена мерења којом такође нису утврђене статистички значајне промене вредности *Round* током испитиваног периода. Међутим вредност  $\eta^2$  од 0,03 указује на слаб ефекат брушења на промене вредности *Round* током испитиваног периода.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом у Г1 нити Студентовим *t*-тестом упарених узорака у Г2 нису утврђене статистички значајне разлике вредности *Round* ни у једном од интервала после препарације у односу на вредност овог параметра пре препарације.

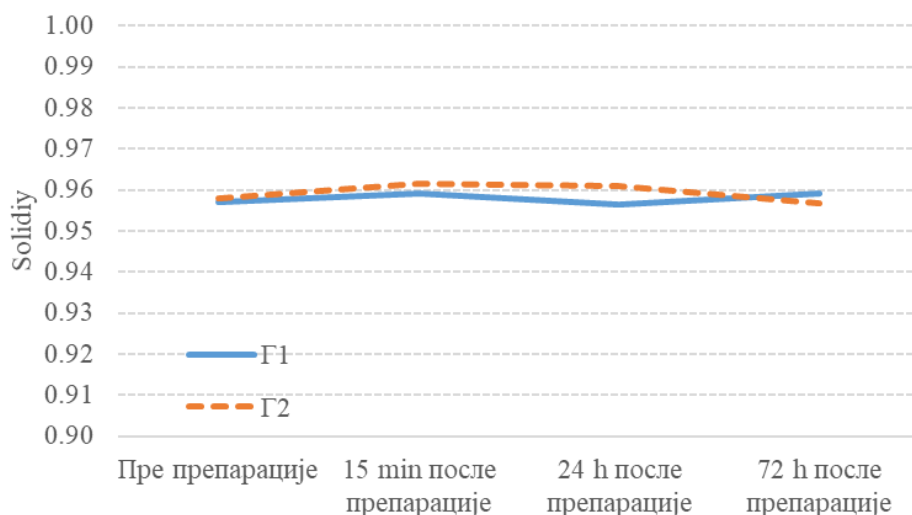
Такође, поређењем вредности *Round* након препарације, између опсервационих интервала понаособ, у испитиваним групама нису утврђене статистички значајне разлике вредности овог параметра.

У табели 18 и на графикону 11 приказане су вредности *Solidity* пре и након препарације зуба код обе групе испитаника (Г1 и Г2).

**Табела 18.** Вредности *Solidity* пре (*Solidity1*) и након препарације зуба (*Solidity2*, *Solidity3*, *Solidity4*) у односу на позицију демаркације препарације.

	Г1		Г2		
	X $\pm$ SD	(Me)	X $\pm$ SD	(Me)	
Solidity1 (K)	0,957 $\pm$ 0,012	(0,959)	0,958 $\pm$ 0,010	(0,957)	
Solidity2 (a)	0,959 $\pm$ 0,010	(0,959)	0,962 $\pm$ 0,010	(0,965)	
Solidity3 (b)	0,957 $\pm$ 0,010	(0,957)	0,961 $\pm$ 0,009	(0,964)	
Solidity4 (c)	0,959 $\pm$ 0,009	(0,960)	0,957 $\pm$ 0,008	(0,959)	
	RM ANOVA			Friedman test	
	p	F	$\eta^2$	p	$\chi^2$ Kendall's W
	0,6212	0,58	0,0196	0,4081	2,89 0,03

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација  
 Легенда – опсервациони интервали: Solidity1 (K) – пре брушења; Solidity2 (a) – 15 минута након брушења;  
 Solidity3 (b) – 24 h након брушења; Solidity4 (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 11.** Средње вредности *Solidity* у испитиваним групама током опсервационих интервала.

У обе испитиване групе вредности *Solidity* веома мало варирају током периода испитивања.

Поређењем вредности овог параметра, одговарајућим тестовима за поређење независних узорака, између испитиваних група ни у једном од опсервационих интервала није било статистички значајних разлика.

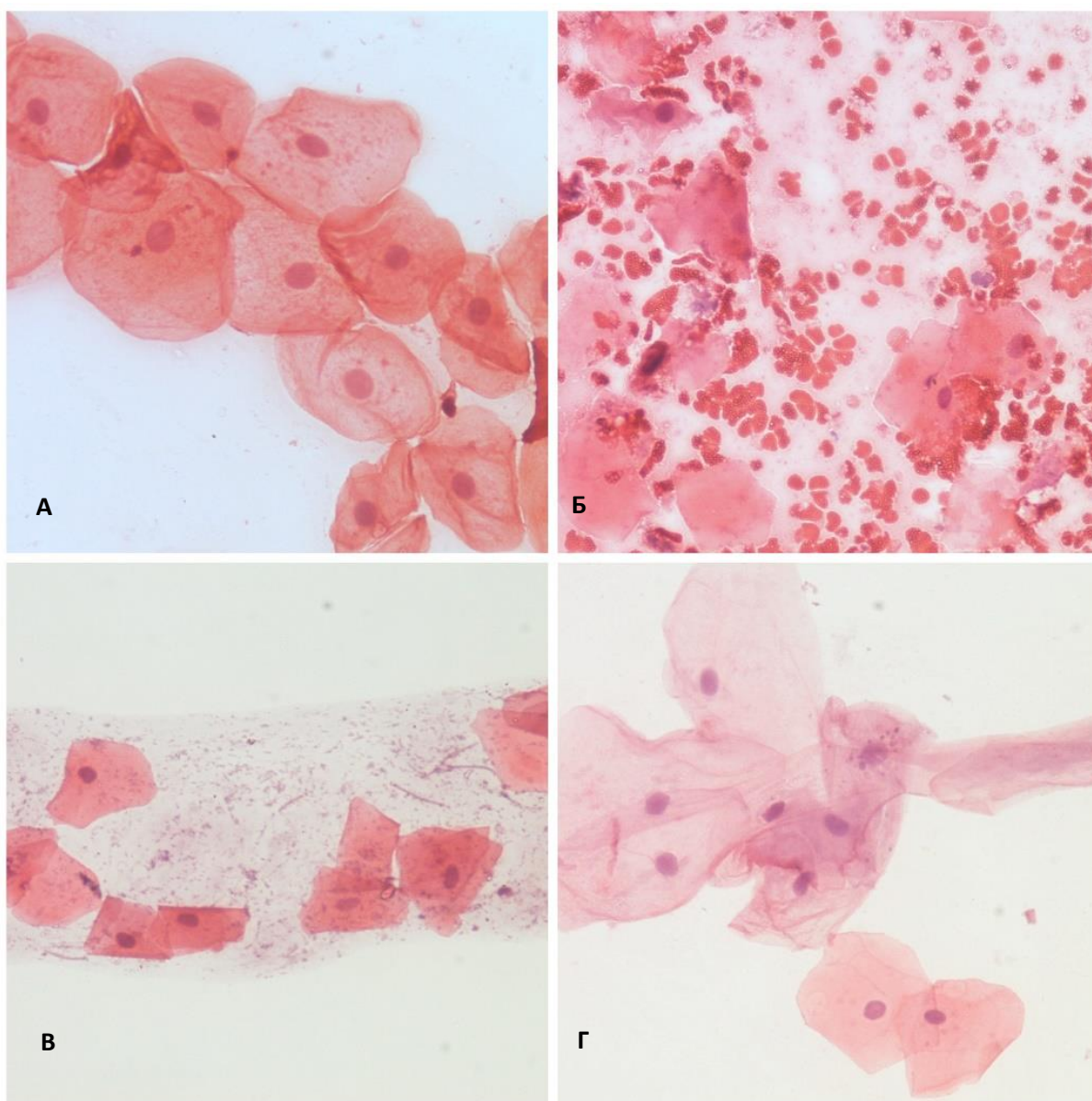
Како су расподеле вредности *Solidity* у Г1 нормалне, применом *RM ANOVA* за поновљена мерења нису утврђене статистички значајне промене вредности овог параметра током испитиваног периода. Међутим вредност  $\eta^2$  од 0,03 указује на мали ефекат брушења на промене вредности *Solidity* током испитиваног периода. Поређењем вредности *Solidity*, *Friedman*-овим тестом, у групи Г2 такође нису утврђене статистички значајне промене током испитиваног периода, док ниска вредност *Kendallovog W* теста указује на безначајан ефекат препарације на промене вредности *Solidity* током испитиваног периода.

Студентовим *t*-тестом упарених узорака у Г1 у односу на вредности пре препарације нису утврђене статистички значајне разлике вредности *Solidity* ни у једном од интервала после препарације. Применом *Wilcoxon Signed Ranks* теста исто је добијено и у Г2.

Такође, поређењем вредности *Solidity* након препарације, између опсервационих интервала понаособ, у испитиваним групама нису утврђене статистички значајне разлике вредности овог параметра. Само је у Г2 утврђена статистички значајно виша вредност овог параметра 24 h у односу на 72 h након препарације ( $p < 0,05$ ).



На слици 15 су приказане цитоморфометријске промене површинских ћелија сквамозног гингивалног епитела током опсервационог периода.



**Слика 16.** Површинске ћелије сквамозног гингивалног епитела током периода опсервације x400.

А – пре брушења; Б – 15 минута након брушења;

В – 24 h након брушења; Г – 72 h након брушења.

### 5.3. РЕЗУЛТАТИ ПРОМЕНЕ ЕКСПРЕСИЈЕ МАРКЕРА ИНФЛАМАЦИЈЕ У ГИНГИВАЛНОЈ ТЕЧНОСТИ НАКОН БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ

У истраживању су испитиване вредности маркера инфламације у гингивалној течности пре брушења зуба (контролни узорци гингивалне течности) и 15 минута, 24 h и 72 h након брушења зуба (студијски узорци гингивалне течности), код пацијената са субгингивалном (Г1) и еквингивалном (Г2) позицијом демаркације препарације. Одређиване су и анализиране концентрације маркера инфламације *IL-1 $\beta$* , *VEGF* и *MMP-9*.

У табели 19 и на графикону 12 приказане су вредности концентрација *IL-1 $\beta$*  у гингивалној течности пре и након препарације зуба код обе групе испитаника.

**Табела 19.** Вредности концентрација *IL-1 $\beta$*  пре (*IL-1 $\beta$  1*) и након препарације зуба (*IL-1 $\beta$  2*, *IL-1 $\beta$  3*, *IL-1 $\beta$  4*) у односу на позицију демаркације препарације.

	Г1			Г2		
	X $\pm$ SD	(Me)		X $\pm$ SD	(Me)	
IL-1 $\beta$ 1(K)	16,86 $\pm$ 1,76	(16,36)		16,30 $\pm$ 1,83	(16,10)	
IL-1 $\beta$ 2 (a)	23,32 $\pm$ 4,16 <sup>***K</sup>	(21,99)		22,03 $\pm$ 4,32 <sup>***K</sup>	(20,88)	
IL-1 $\beta$ 3 (b)	28,58 $\pm$ 2,72 <sup>***Ka*c</sup>	(28,51)		29,73 $\pm$ 2,28 <sup>***Ka</sup>	(29,74)	
IL-1 $\beta$ 4 (c)	24,92 $\pm$ 3,81 <sup>***K</sup>	(25,37)		28,21 $\pm$ 5,90 <sup>***Ka</sup>	(25,45)	
Friedman test	p	$\chi^2$	Kendall's W	p	$\chi^2$	Kendall'sW
	0,0000	66,96	0,74	0,0000	76,68	0,85

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (медијана)

\* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001

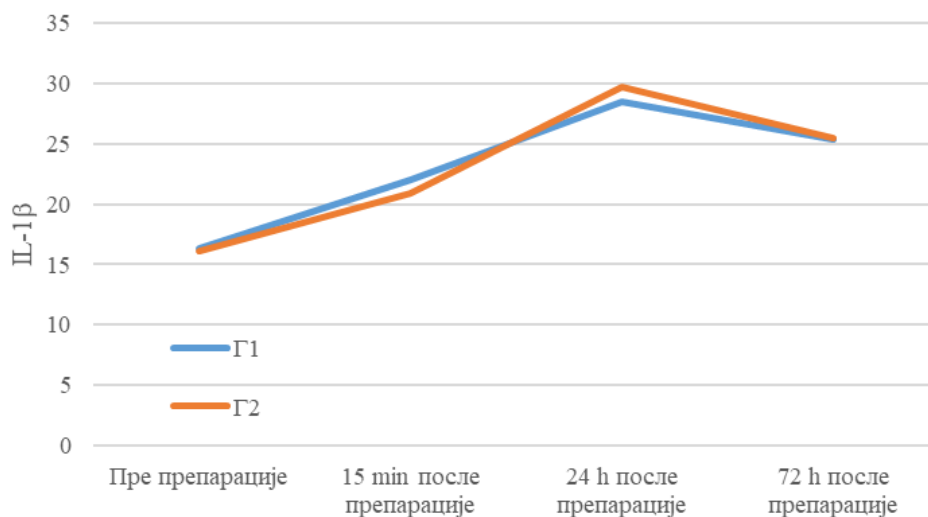
K – vs контрола (*Wilcoxon Signed Ranks Test*),

b – vs *IL-1 $\beta$  3*, c – vs *IL-1 $\beta$  4* (*Wilcoxon Signed Ranks Test*)

Легенда – опсервациони интервали:

IL-1 $\beta$  1(K) – пре брушења; IL-1 $\beta$  2 (a) – 15 минута након брушења;

IL-1 $\beta$  3 (b) – 24 h након брушења; IL-1 $\beta$  4 (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 12.** Средње вредности концентрација  $IL-1\beta$  у испитиваним групама током опсервационих интервала.

У обе испитиване групе вредност концентрације  $IL-1\beta$  у гингивалној течности 15 минута након препарације значајно расте, раст се наставља и 24 h након препарације, док се 72 h након препарације бележи пад вредности.

Поређењем вредности концентрација  $IL-1\beta$  *Man-Whitney* тестом између испитиваних група нису утврђене статистички значајне разлике ни у једном од опсервационих интервала.

*Friedman*-овим тестом код оба типа препарације утврђене су статистички значајне промене концентрације  $IL-1\beta$  током целог испитиваног периода ( $p < 0,001$ ). Вредност *Kendallovog W* теста је нешто виша у Г2, мада је у обе групе ефекат препарације зуба на параметар концентрације  $IL-1\beta$  веома јак.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом у односу на почетну вредност у обе групе бележе се статистички значајне разлике за сва три опсервациона интервала ( $p < 0,001$ ).

*Wilcoxon Signed Rank* тестом, поређењем највиших вредности овог параметра које се бележе 24 h након препарације, утврђено је да су те вредности статистички знатно више но вредности  $IL-1\beta$  15 минута после препарације ( $p < 0,001$ ) у обе испитиване групе. Док је у Г1, концентрација  $IL-1\beta$  24 h после интервенције статистички значајно виша и у односу на вредност након 72 h од препарације зуба ( $p < 0,05$ ), у Г2 нема статистички значајне разлике вредности концентрација  $IL-1\beta$  између ових опсервационих интервала. У Г2 вредност концентрације  $IL-1\beta$  након 72 h статистички је значајно виша у поређењу са вредностима пре препарације, док у Г1 нема статистички значајне разлике при поређењу  $IL-1\beta$  између ова два опсервациона интервала.

У табели 20 и на графикону 13 приказане су вредности концентрација *VEGF* у гингивалној течности пре и након препарације зуба код обе групе испитаника.

**Табела 20.** Вредности концентрација *VEGF* у гингивалној течности пре (*VEGF 1*) и након препарације зуба (*VEGF 2*, *VEGF 3*, *VEGF 4*) у односу на позицију демаркације препарације.

	Г1		Г2			
	X ± SD	(Me)	X ± SD	(Me)		
VEGF1 (K)	6,42 ± 0,72	(6,42)	6,11 ± 2,45 <sup>***c</sup>	(5,16)		
VEGF2 (a)	12,39 ± 2,36 <sup>***KEbc</sup>	(12,46)	7,34 ± 3,19 <sup>***Kc*b</sup>	(5,78)		
VEGF3 (b)	9,10 ± 3,20 <sup>***K**Ec</sup>	(9,10)	6,68 ± 2,77 <sup>***Kc</sup>	(6,06)		
VEGF4 (c)	6,00 ± 2,16 <sup>*E</sup>	(6,20)	4,46 ± 2,08	(3,87)		
Friedman test	p	$\chi^2$	Kendall's W	p	$\chi^2$	Kendall's W
	0,0000	60,12	0,67	0,0000	50,09	0,56

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)

\* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001

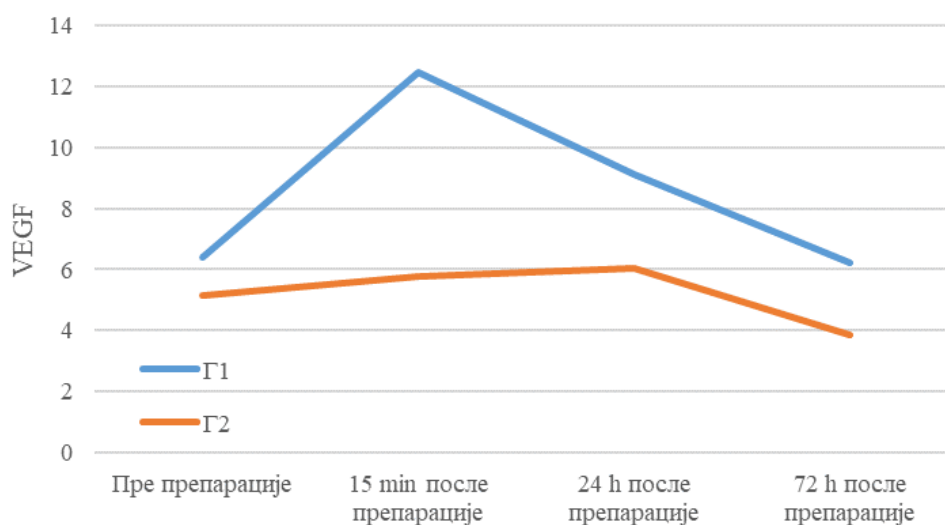
K – vs контрола (*Wilcoxon Signed Ranks Test*), E – vs еквигингивална препарација (*Man-Whitney U test*),

b – vs *VEGF3*, c – vs *VEGF4* (*Wilcoxon Signed Ranks Test*)

Легенда – опсервациони интервали:

VEGF1 (K) – пре брушења, VEGF2 (a) – 15 минута након брушења,

VEGF3 (b) – 24 h након брушења, VEGF4 (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 13.** Средње вредности концентрација *VEGF* у испитиваним групама током опсервационих интервала.

У обе испитиване групе 15 минута након препарације вредности концентрација *VEGF* у гингивалној течности расту, а после 24 h опадају. Након 72 h приближавају се вредностима концентрација које су измерене пре препарације зуба, што указује на смирење инфламаторних промена.

Поређењем вредности *VEGF* *Man-Whitney* тестом између испитиваних група утврђене су статистички значајно више вредности тражене концентрације у свим опсервационим интервалима након препарације у Г1, са нивоима статистичке значајности од  $p < 0,001$  15 минута након препарације,  $p < 0,01$  24 h, и  $p < 0,05$  72 h након препарације.

*Friedman*-овим тестом код оба типа препарације утврђене су статистички значајне промене концентрација *VEGF* током целог испитиваног периода ( $p < 0,001$ ). Вредност *Kendallovog W* теста је битно виша у Г1 но у Г2, а обе вредности указују на висок интензитет ефекта препарације зуба на параметар *VEGF*.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом у односу на почетну вредност у обе групе су утврђене статистички значајно више вредности концентрација *VEGF* 15 минута и 24 h након препарације ( $p < 0,001$ ). Док у Г1 у односу на вредност концентрације *VEGF* пре препарације нема статистички значајне разлике у опсервационом интервалу након 72 h од брушења зуба, код Г2 је вредност концентрације *VEGF* статистички значајно нижа но пре препарације ( $p < 0,001$ ).

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом, поређењем вредности параметра у испитиваним интервалима опсервације након брушења зуба понаособ, утврђене су статистички значајне разлике концентрације *VEGF* између свих опсервационих интервала. Вредност концентрације *VEGF* 15 минута после препарације статистички је значајно виша у односу на вредност концентрације након 24 h ( $p < 0,001$  у Г1, односно  $p < 0,05$  у Г2), као и 72 h после препарације ( $p < 0,001$  у обе групе). Вредност овог параметра 24 h након препарације статистички је значајно виша но након 72 h од препарације ( $p < 0,001$ ).

У табели 21 и на графикону 14 приказане су вредности концентрација *MMP-9* у гингивалној течности пре и након препарације зуба код обе групе испитаника.

У обе испитиване групе вредности концентрација *MMP-9* у гингивалној течности 15 минута након препарације падају, да би 24 h након препарације расле, а потом благо опале након 72 h од препарације.

**Табела 21.** Вредности концентрација *MMP-9* у гингивалној течности пре (*MMP-9 1*) и након препарације зуба (*MMP-9 2*, *MMP-9 3*, *MMP-9 4*) у односу на позицију демаркације препарације.

	Г1		Г2			
	X ± SD	(Me)	X ± SD	(Me)		
MMP-9 1 (К)	20,68 ± 1,12 <sup>a***</sup>	(20,97)	20,44 ± 2,00	(21,13)		
MMP-9 2 (а)	11,76 ± 2,96	(10,65)	18,33 ± 2,02	(18,01)		
MMP-9 3 (б)	21,28 ± 0,63 <sup>a***</sup>	(21,45)	20,53 ± 2,18	(21,46)		
MMP-9 4 (с)	21,19 ± 0,62 <sup>a***</sup>	(21,30)	19,08 ± 2,60	(19,69)		
	р	χ <sup>2</sup>	Kendall's W	р	χ <sup>2</sup>	Kendall's W
Friedman test	0,0000	55,44	0,62	0,0000	23,04	0,26

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)

\* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001

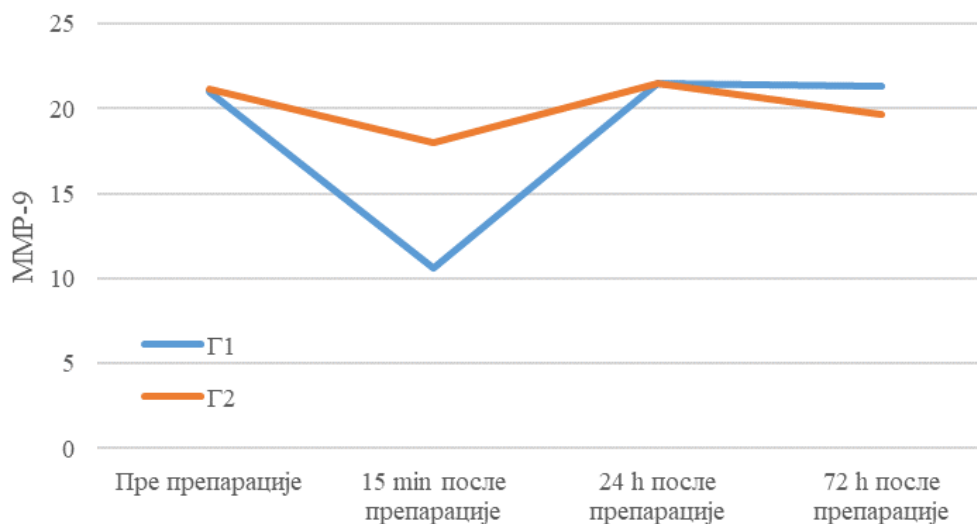
К – vs контрола (*Wilcoxon Signed Ranks Test*), Е – vs еквингивална препарација (*Man-Whitney U test*),

б – vs *MMP-9 3*, с – vs *MMP-9 4* (*Wilcoxon Signed Ranks Test*)

Легенда – опсервациони интервали:

MMP-9 1 (К) – пре брушења; MMP-9 2 (а) – 15 минута након брушења;

MMP-9 3 (б) – 24 h након брушења; MMP-9 4 (с) – 72 h након брушења.



**Графикон 14.** Средње вредности концентрација *MMP-9* у испитиваним групама током опсервационих интервала.

Поређењем вредности концентрација *MMP-9* *Man-Whitney* тестом између испитиваних група утврђена је статистички значајно виша вредност у Г2 (p<0,001) 15 минута

од препарације, док је 72 h након препарације статистички значајно виша вредност у Г1 ( $p < 0,01$ ).

*Friedman*-овим тестом код оба типа препарације утврђене су статистички значајне промене концентрација *MMP-9* током целог испитиваног периода ( $p < 0,001$ ). Вредност *Kendallovog W* теста је значајно виша у Г1 но у Г2, и док у Г1 указује да обе вредности приказују високи интензитет ефекта препарације зуба на параметар концентрације *MMP-9*, у Г2 је тај ефекат мали.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом у односу на почетну вредност у обе групе утврђене су статистички значајно ниже вредности концентрација *MMP-9* у гингивалној течности 15 минута након препарације ( $p < 0,001$ ), док се у наредном интервалу после препарације статистичка значајност губи и вредности концентрација овог параметра у обе групе се приближавају онима пре препарације. *Wilcoxon Signed Ranks* тестом, поређењем вредности параметра у испитиваним периодима опсервације након брушења зуба понаособ, утврђено је да је у обе групе вредност концентрација 24 h након препарације статистички значајно виша од вредности 15 минута од препарације ( $p < 0,001$ ). Статистички значајно више су и вредности концентрација након 72 h од препарације у односу на вредности концентрација пре препарације ( $p < 0,001$  у Г1, односно  $p < 0,05$  у Г2). У Г2 вредност овог параметра је статистички значајно нижа и 72 h у односу на ону од 24 h после препарације ( $p < 0,05$ ), док у Г1 нема статистички значајне разлике.

#### **5.4. РЕЗУЛТАТИ ПРИСУСТВА ПЕРИОДОНТОПАТОГЕНИХ БАКТЕРИЈА У ГИНГИВАЛНОЈ ТЕЧНОСТИ НАКОН БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ**

У истраживању је вршена детекција присуства периодонтопатогених бактерија у гингивалној течности пре препарације зуба (контролни узорци гингивалне течности) и 15 минута, 24 h и 72 h након брушења зуба (студијски узорци гингивалне течности), код пацијената са субгингивалном (Г1) и еквигингивалном (Г2) демаркацијом препарације. Рађена је квалитативна *PCR* анализа присуства периодонтопатогена: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* и *Prevotella intermedia*.

У табели 22 и на графикону 15 приказане су квалитативне *PCR* анализе присуства *Porphyromonas gingivalis* у гингивалној течности пре и након препарације зуба код обе групе испитаника.

**Табела 22.** Позитиван *PCR* налаз *Porphyromonas gingivalis* пре (*PG1*) и након препарације зуба (*PG2*, *PG3*, *PG4*) у односу на позицију демаркације препарације.

	Г1		Г2	
	n	%	n	%
PG1 (К)	19	63,33%	0	0,00%
PG2 (а)	22	73,33%	3	10,00%
PG3 (b)	24	80,00%	8	26,67% **K*c
PG4 (c)	19	63,33%	2	6,67%
	p		p	
Cochran's Q Test	4,91	0,1786	15,44	0,0015 **

Подаци показују заступљеност апсолутним бројевима (n) и процентуално (%).

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$

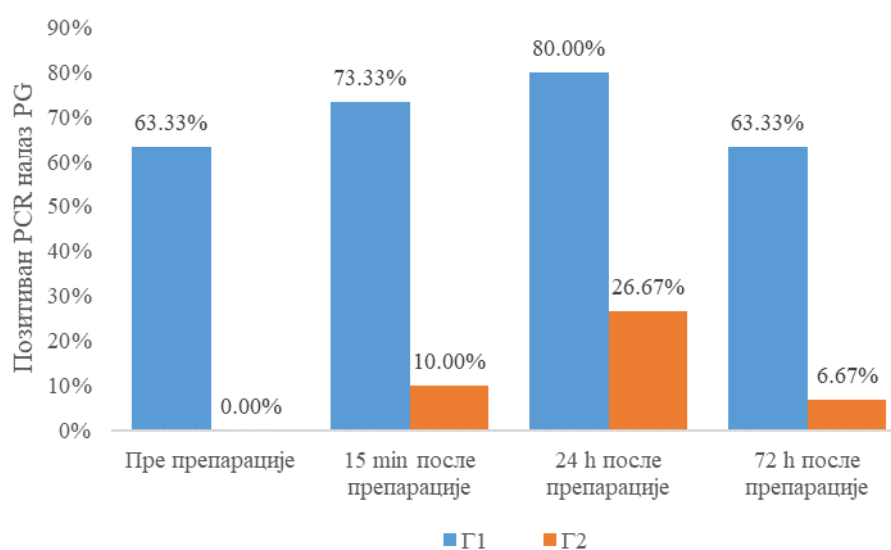
S – vs Г1 1; E – vs Г2 2 ( $\chi^2$  test),

K – vs PG1 (контрола), а – vs PG2; b – vs PG3; c – vs PG4 (*McNemar test*)

Легенда – опсервациони интервали:

PG1 (К) – пре брушења; PG2 (а) – 15 минута након брушења;

PG3 (b) – 24 h након брушења; PG4 (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 15.** Процентуална заступљеност позитивних *PCR* налаза *Porphyromonas gingivalis* у испитиваним групама током опсервационих интервала.



Пре и после брушења зуба, током целог периода испитивања, присуство позитивног *PCR* налаза *Porphyromonas gingivalis* је статистички значајно више у Г1, утврђено  $\chi^2$  тестом ( $p < 0,001$ ), што је последица субгингивалне позиције демаркације препарације.

Позитивни *PCR* налаз заступљенији је 15 минута, а још више 24 h након брушења зуба, у односу на вредности пре интервенције. Након 72 h присуство *Porphyromonas gingivalis* у гингивалној течности је мање.

На основу вредности *Qochran Q* теста утврђено је да се расподеле позитивних налаза *Porphyromonas gingivalis* током испитиваног периода статистички значајно разликују у Г2 ( $p < 0,001$ ), док је заступљеност *PCR* налаза у Г1 стабилна и не варира значајно.

*McNemar* тестом је утврђено да, у односу на заступљеност пре препарације, нема статистички значајних разлика расподеле *PCR* налаза у Г1. У Г2 заступљеност позитивних налаза 24 h након препарације статистички је значајно виша но пре препарације ( $p < 0,001$ ).

Истим тестом, у Г2 је утврђено да је заступљеност позитивног *PCR* налаза *Porphyromonas gingivalis* 24 h након препарације, када је уједно и највиша, статистички значајно већа у односу на вредност 72 h након препарације ( $p < 0,05$ ). У Г1 није било статистички значајних разлика.

У табели 23 и на графикону 16 приказане су квалитативне *PCR* анализе присуства *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* у гингивалној течности пре и након препарације зуба код обе групе испитаника.

Присуство позитивног *PCR* налаза *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* статистички је значајно више у Г1, у односу на Г2, у опсервационим интервалима пре ( $p < 0,01$ ), као и 24 h ( $p < 0,05$ ), односно 15 минута ( $p < 0,001$ ) после брушења зуба. Заступљеност позитивног *PCR* налаза виша је у Г1 и 72 h након препарације, али не статистички значајно.

У односу на заступљеност *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* пре препарације, заступљеност позитивног *PCR* налаза виша је 15 минута, а још виша 24 h након препарације, док је након 72 h та вредност позитивних *PCR* налаза минимално нижа.

На основу вредности *Qochran Q* теста утврђено је да се расподеле позитивних налаза *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* током испитиваног периода статистички значајно разликују у Г1 ( $p < 0,01$ ), а још значајније промене евидентирани су у Г2 ( $p < 0,001$ ).

**Табела 23.** Позитиван *PCR* налаз *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* пре (AA1) и након препарације зуба (AA2, AA3, AA4) у односу на позицију демаркације препарације зуба.

	Г1		Г2	
	n	%	n	%
AA1 (K)	16	53,33%	4	13,33%
AA2 (a)	22	73,33%	7	23,33%
AA3 (b)	26	86,67%	18	60,00%
AA4 (c)	24	80,00%	17	56,67%
	p		p	
Cochran's Q Test	13,44	0,0038	27,94	0,0000

Подаци показују заступљеност апсолутним бројевима (*n*) и процентуално (%)

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$

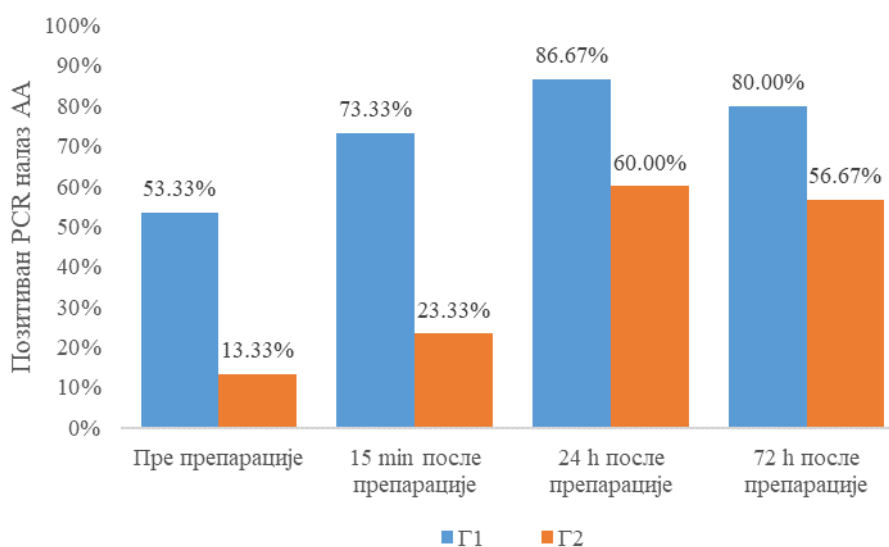
S – vs Г1 1; E – vs Г2 2 ( $\chi^2$  test),

K – vs AA1 (контрола), a – vs AA2; b – vs AA3; c – vs AA4 (*McNemar test*)

Легенда – опсервациони интервали:

AA1 (K) – пре брушењ; AA2 (a) – 15 минута након брушења;

AA3 (b) – 24 h након брушења; AA4 (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 16.** Процентуална заступљеност позитивних *PCR* налаза *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* у испитиваним групама током опсервационих интервала.

*McNemar* тестом је утврђено да су у Г1 у односу на опсервациони интервал пре препарације позитивни *PCR* налази *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* статистички значајно већи 24 h ( $p<0,01$ ) и 72 h након препарације ( $p<0,05$ ). У Г2, у односу на заступљеност пре препарације, заступљеност позитивних *PCR* налаза статистички је значајно виша 24 h и 72 h након брушења понаособ ( $p<0,001$ ).

Поређењем позитивних налаза *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* након препарације у Г1 није утврђена статистички значајна разлика заступљености позитивних налаза између опсервационих интервала понаособ. У Г2, 24 h и 72 h након брушења зуба заступљеност *PCR* позитивних налаза *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* статистички је значајно виша у односу на њихову заступљеност 15 минута после препарације ( $p<0,001$ ).

У табели 24 и на графикону 17 приказане су квалитативне *PCR* анализе присуства *Tannerella forsythia* у гингивалној течности пре и након препарације зуба код обе групе испитаника.

**Табела 24.** Позитиван *PCR* налаз *Tannerella forsythia* пре (TF1) и након препарације зуба (TF2, TF3, TF4) у односу на позицију демаркације препарације.

	Г 1		Г2	
	n	%	n	%
TF1 (K)	18	60,00%	5	16,67%
TF2 (a)	26	86,67%	12	40,00% *K
TF3 (b)	29	96,67%	18	60,00% **K
TF4 (c)	26	86,67%	12	40,00% *K
	p		p	
Cochran's Q Test	15,71	0,0013	21,64	0,0001 ***

Подаци показују заступљеност апсолутним бројевима (n) и процентуално (%)

\* –  $p<0,05$ , \*\* –  $p<0,01$ , \*\*\* –  $p<0,001$

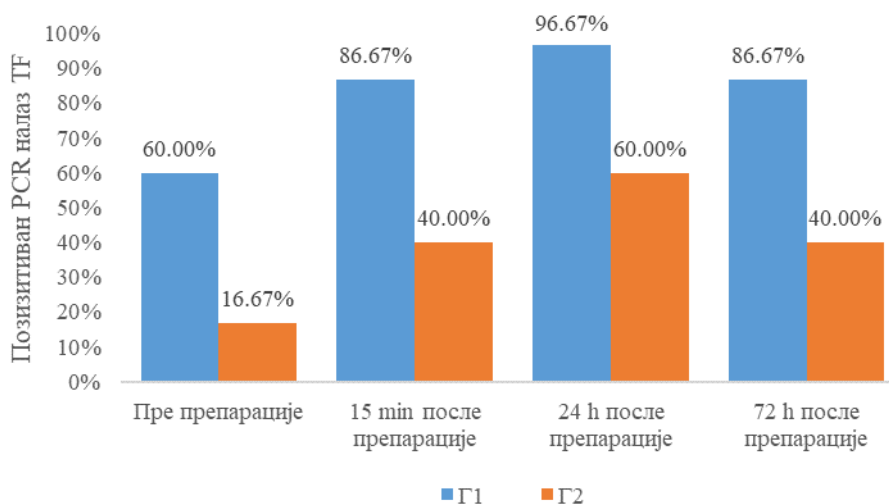
S – vs Г1; E – vs Г2 ( $\chi^2$  test),

K – vs TF1 (K), a – vs TF2; b – vs TF3; c – vs TF4 (*McNemar* test)

Легенда – опсервациони интервали:

TF1 (K) – пре брушења; TF2 (a) – 15 минута након брушења;

TF3 (b) – 24 h након брушења; TF4 (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 17.** Процентуална заступљеност позитивних *PCR* налаза *Tannerella forsythia* у испитиваним групама током опсервационих интервала.

Позитиван *PCR* налаз присуства *Tannerella forsythia* статистички је значајно виши у Г1 у односу на Г2 у свим опсервационим интервалима ( $p < 0,001$ ).

У односу на заступљеност *Tannerella forsythia* пре препарације, виша је учесталост позитивног *PCR* налаза 15 минута, а још виша 24 h након препарације, док је након 72 h ова вредност нижа.

На основу вредности *Qochran Q* теста утврђено је да се расподеле позитивних налаза присуства *Tannerella forsythia* током испитиваног периода статистички значајно разликују у Г1 ( $p < 0,01$ ), а још значајније промене су у Г2 ( $p < 0,001$ ).

*McNemar* тестом у обе групе је утврђена статистички значајно виша заступљеност позитивних налаза 15 минута и 72 h после препарације ( $p < 0,05$ ), а још значајније виша 24 h након препарације ( $p < 0,01$ ) у Г1, односно ( $p < 0,001$ ) у Г2 у односу на период пре брушења.

У периоду након препарације у обе групе није било статистички значајних разлика у заступљености позитивних *PCR* налаза између опсервационих интервала.

У табели 25 и на графикону 18 приказане су квалитативне *PCR* анализе присуства *Prevotella intermedia* у гингивалној течности пре и након препарације зуба код обе групе испитаника.

**Табела 25.** Позитиван *PCR* налаз *Prevotella intermedia* пре (*PI1*) и након препарације зуба (*PI2*, *PI3*, *PI4*) у односу на позицију демаркације препарације зуба.

	Г1		Г2	
	n	%	n	%
PI1 (К)	4	13,33%	4	13,33%
PI2 (a)	5	16,67%	6	20,00%
PI3 (b)	11	36,67% *Ka	13	43,33% *Kc
PI4 (c)	10	33,33%	5	16,67%
	p		p	
Cochran's Q Test	12,33	0,0063 **	25,38	0,0000 ***

Подаци показују заступљеност апсолутним бројевима (n) и процентуално (%)

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$

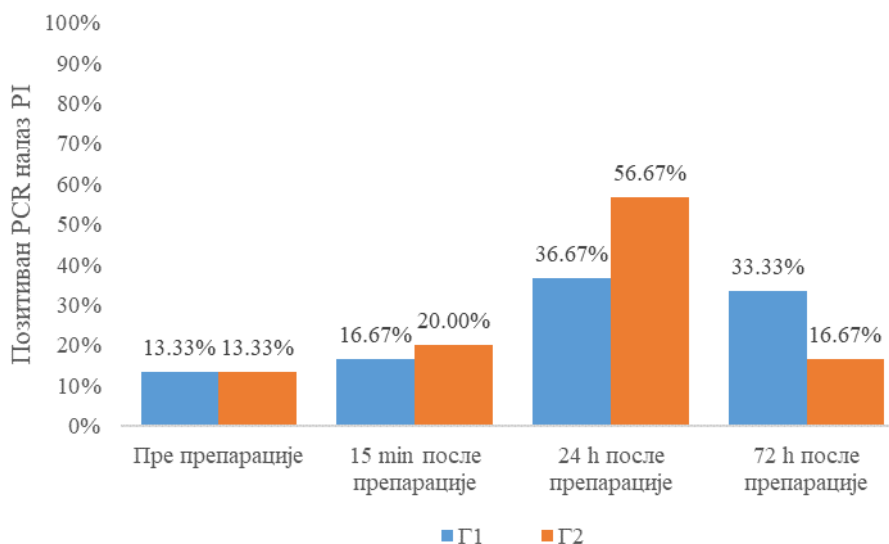
S – vs Г1; E – vs Г2 ( $\chi^2$  test),

K – vs PI1 (контрола), a – vs PI2; b – vs PI3; c – vs PI4 (*McNemar test*)

Легенда – опсервациони интервали:

PI1 (К) – пре брушења, PI2 (a) – 15 минута након брушења,

PI3 (b) – 24 h након брушења, PI4 (c) – 72 h након брушења.



**Графикон 18.** Процентуална заступљеност позитивних *PCR* налаза *Prevotella intermedia* у испитиваним групама током опсервационих интервала.

Заступљеност позитивног *PCR* налаза о присуству периодонтопатогена *Prevotella intermedia* статистички се није значајно разликовао између испитиваних група ни у једном опсервационом интервалу.

У односу на заступљеност *Prevotella intermedia* пре брушења, виша је заступљеност позитивног *PCR* налаза 15 минута, а још виша 24 h након препарације. Након 72 h заступљеност позитивних *PCR* налаза је нижа.

На основу вредности *Qochran Q* теста утврђено је да се расподеле позитивних налаза *Prevotella intermedia* током испитиваног периода статистички значајно разликују у обе групе испитаника ( $p < 0,01$ ).

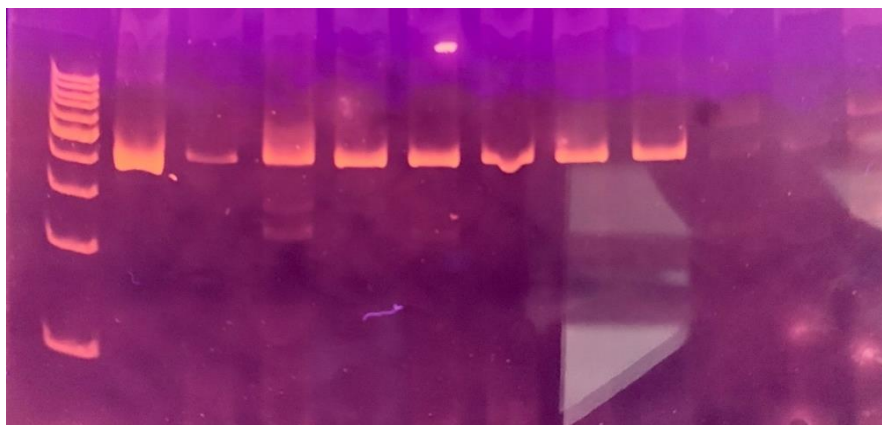
*McNemar* тестом је утврђено да су у обе групе у односу на заступљеност позитивног налаза присуства *Prevotella intermedia* пре препарације, овакви налази 24 h након препарације статистички значајно заступљенији ( $p < 0,05$ ).

У периоду 24 h након препарације у Г1 позитивни налази су заступљенији но 15 минута после препарације, а у Г2 су заступљенији од вредности 72 h после препарације ( $p < 0,05$ ).

На сликама 17, 18, 19 и 20 приказана је визуелизација амплификованих фрагмената *DNK* бактерија на полиакриламидном гелу.



**Слика 17.** Амплификовани фрагменти *DNK* *Prevotella intermedia* на полиакриламидном гелу.



**Слика 18.** Амплификовани фрагменти *DNK*  
*Porphyromonas gingivalis* на полиакриламидном гелу.



**Слика 19.** Амплификовани фрагменти *DNK*  
*Tannerella forsythia* на полиакриламидном гелу.



**Слика 20.** Амплификовани фрагменти *DNK*  
*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* на полиакриламидном гелу.

## 5.5. РЕЗУЛТАТИ КОРЕЛАЦИЈЕ *PCR* НАЛАЗА ПЕРИОДОНТОПАТОГЕНА И ЕКСПРЕСИЈЕ МАРКЕРА ИНФЛАМАЦИЈЕ У ГИНГИВАЛНОЈ ТЕЧНОСТИ

У табелама 26, 27 и 28 приказана је корелација *PCR* налаза периодонтопатогених бактерија и експресија маркера инфламације у гингивалној течности код *Porphyromonas gingivalis*.

**Табела 26.** Вредности концентрација *IL-1 $\beta$*  пре (*IL-1 $\beta$  1*) и након препарације зуба (*IL-1 $\beta$  2*, *IL-1 $\beta$  3*, *IL-1 $\beta$  4*) према резултату *PCR* налаза *Porphyromonas gingivalis* (PG) у гингивалној течности у односу на позицију демаркације препарације зуба.

IL-1 $\beta$	Г1		Г2	
	PCR (PG) –	PCR (PG) +	PCR (PG) –	PCR (PG) +
IL-1 $\beta$ (К)	16,64 $\pm$ 1,86 (16,41)	16,98 $\pm$ 1,66 (16,82)	16,30 $\pm$ 1,83 (16,10)	
IL-1 $\beta$ 2(a)	21,76 $\pm$ 4,12 (21,34)	23,89 $\pm$ 4,12 (22,08)	22,06 $\pm$ 4,28 (21,91)	21,82 $\pm$ 5,62 (19,85)
IL-1 $\beta$ 3(b)	28,32 $\pm$ 2,93 (28,60)	28,64 $\pm$ 2,68 (28,86)	29,90 $\pm$ 2,22 (29,74)	29,26 $\pm$ 2,53 (29,74)
IL-1 $\beta$ 4(c)	24,81 $\pm$ 4,60 (24,90)	24,98 $\pm$ 2,82 (25,10)	27,96 $\pm$ 5,81 (25,37)	31,64 $\pm$ 8,63 (31,64)

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (медијана)  
*Mann-Whitney test*

Легенда – опсервациони интервали:

IL-1 $\beta$  1(К) – пре брушења; IL-1 $\beta$  2 (a) – 15 минута након брушења;  
IL-1 $\beta$  3 (b) – 24 h након брушења; IL-1 $\beta$  4 (c) – 72 h након брушења.

**Табела 27.** Вредности концентрација *VEGF* пре (*VEGF(K)*) и након препарације зуба (*VEGF2(a)*, *VEGF3(b)*, *VEGF4(c)*) према резултату *PCR* налаза *Porphyromonas gingivalis* (PG) у гингивалној течности у односу на позицију демаркације препарације зуба.

VEGF	Г1		Г2	
	PCR (PG) –	PCR (PG) +	PCR (PG) –	PCR (PG) +
VEGF1(К)	6,11 $\pm$ 0,67 (6,20)	6,60 $\pm$ 0,70 (6,50)	6,11 $\pm$ 2,45 (5,16)	
VEGF2(a)	12,51 $\pm$ 2,72 (12,45)	12,34 $\pm$ 2,78 (12,46)	7,32 $\pm$ 3,31 (7,26)	7,56 $\pm$ 2,13 (7,61)
VEGF3(b)	7,90 $\pm$ 2,24 (8,49)	9,40 $\pm$ 3,37 (9,66)	6,79 $\pm$ 3,12 (5,55)	6,37 $\pm$ 1,50 (6,58)
VEGF4(c)	5,35 $\pm$ 1,94 (4,44)	6,38 $\pm$ 2,23 (6,39)	4,42 $\pm$ 2,08 (4,26)	4,99 $\pm$ 1,80 (5,06)

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (медијана)  
*Mann-Whitney test*

Легенда – опсервациони интервали:

VEGF1 (К) – пре брушења; VEGF2 (a) – 15 минута након брушења;  
VEGF3 (b) – 24 h након брушења; VEGF4 (c) – 72 h након брушења.



**Табела 28.** Вредности концентрација *MMP9* пре (*MMP9-1*) и након препарације зуба (*MMP9-2*, *MMP9-3*, *MMP9-4*) према резултату *PCR* налаза *Porphyromonas gingivalis* (PG) у гингивалној течности у односу на позицију демаркације препарације зуба.

MMP-9	Г1		Г2	
	PCR (PG) –	PCR (PG) +	PCR (PG) –	PCR (PG) +
MMP-91(К)	20,63 ± 1,16 (20,46)	20,71 ± 1,13 (21,15)	20,45 ± 2,00 (21,13)	
MMP-9 2(a)	10,94 ± 1,99 (10,65)	12,05 ± 3,22 (10,65)	18,26 ± 2,02 (18,08)	19,00 ± 2,35 (17,93)
MMP-9 3(b)	21,33 ± 0,75 (21,45)	21,27 ± 0,62 (21,45)	20,43 ± 2,46 (21,46)	20,80 ± 1,18 (21,51)
MMP-9 4(c)	20,92 ± 0,93 (21,26)	21,35 ± 0,25 (21,34)	19,06 ± 2,58 (18,96)	19,41 ± 2,07 (19,30)

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)

*Mann-Whitney test*

Легенда – опсервациони интервали:

MMP-9 1 (К) – пре брушења; MMP-9 2 (a) – 15 минута након брушења;

MMP-9 3 (b) – 24 h након брушења; MMP-9 4 (c) – 72 h након брушења.

Иако у оквиру Г1 и Г2 између позитивних и негативних налаза *PCR Porphyromonas gingivalis* тестовима за поређење вредности параметара између независних узорака нису утврђене статистички значајне разлике вредности концентрација биохемијских параметара *IL-1β*, *VEGF* и *MMP9* у гингивалној течности, у битно преовлађујућем броју случајева утврђене вредности концентрација сва три биохемијска параметра више су при позитивном налазу *PCR* (PG) што говори у прилог повезаности *PCR Porphyromonas gingivalis* са вредностима концентрација биохемијских параметара, односно да су вредности концентрација биохемијских параметара у обе групе готово увек више при позитивним *PCR* налазима *Porphyromonas gingivalis*.

У табелама 29, 30 и 31 приказана је корелација *PCR* налаза периодонтопатогених бактерија и експресија маркера инфламације у гингивалној течности код *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

**Табела 29.** Вредности концентрација *IL-1 $\beta$*  пре (*IL-1 $\beta$* ) и након препарације зуба (*IL-1 $\beta$*  2, *IL-1 $\beta$*  3, *IL-1 $\beta$*  4) према резултату *PCR* налаза *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA) у гингивалној течности у односу на позицију демаркације препарације зуба.

IL-1 $\beta$	Г1		Г2	
	PCR (AA) –	PCR (AA) +	PCR (AA) –	PCR (AA) +
IL-1 $\beta$ (К)	16,79 $\pm$ 1,98 (16,36)	16,94 $\pm$ 1,97 (16,36)	16,19 $\pm$ 1,78 (16,10)	16,88 $\pm$ 2,18 (16,44)
IL-1 $\beta$ 2(a)	22,62 $\pm$ 4,40 (20,77)	23,15 $\pm$ 4,20 (21,99)	21,28 $\pm$ 3,60 (20,88)	23,16 $\pm$ 5,17 (23,83)
IL-1 $\beta$ 3(b)	26,82 $\pm$ 3,05 (25,45)	28,46 $\pm$ 2,68 (27,81)	29,82 $\pm$ 2,50 (30,09)	29,67 $\pm$ 2,19 (29,74)
IL-1 $\beta$ 4(c)	24,33 $\pm$ 1,75 (25,37)	25,06 $\pm$ 4,19 (25,37)	28,06 $\pm$ 6,55 (27,67)	28,33 $\pm$ 5,47 (28,12)

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (медијана)

*Mann-Whitney test*

Легенда: опсервациони интервали:

IL-1 $\beta$  1(К) – пре брушења; IL-1 $\beta$  2 (a) – 15 минута након брушења;

IL-1 $\beta$  3 (b) – 24 h након брушења; IL-1 $\beta$  4 (c) – 72 h након брушења.

**Tabela 30.** Вредности концентрација *VEGF* пре (*VEGF(K)*) и након препарације зуба (*VEGF2(a)*, *VEGF3(b)*, *VEGF4(c)*) према резултату *PCR* налаза *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA) у гингивалној течности у односу на позицију демаркације препарације зуба.

VEGF	Г1		Г2	
	PCR (AA) –	PCR (AA) +	PCR (AA) –	PCR (AA) +
VEGF1(К)	6,37 $\pm$ 0,77 (6,28)	6,47 $\pm$ 0,47 (6,57)	5,99 $\pm$ 2,33 (5,16)	6,87 $\pm$ 3,44 (5,16)
VEGF2(a)	12,01 $\pm$ 2,22 (12,13)	12,53 $\pm$ 2,44 (12,46)	6,81 $\pm$ 2,66 (5,55)	9,11 $\pm$ 4,32 (8,35)
VEGF3(b)	8,78 $\pm$ 0,77 (8,92)	9,15 $\pm$ 3,33 (9,33)	6,99 $\pm$ 2,81 (7,14)	6,47 $\pm$ 2,80 (5,55)
VEGF4(c)	6,13 $\pm$ 2,13 (6,20)	5,97 $\pm$ 2,21 (6,21)	4,23 $\pm$ 2,13 (4,53)	4,63 $\pm$ 1,87 (4,77)

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (медијана)

*Mann-Whitney test*

Легенда – опсервациони интервали:

VEGF1 (К) – пре брушења; VEGF2 (a) – 15 минута након брушења;

VEGF3 (b) – 24 h након брушења; VEGF4 (c) – 72 h након брушења.

**Табела 31.** Вредности концентрација *MMP9* пре (*MMP9-1*) и након препарације зуба (*MMP9-2*, *MMP9-3*, *MMP9-4*) према резултату *PCR* налаза *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA) у гингивалној течности у односу на позицију демаркације препарације зуба.

MMP-9	Г1		Г2	
	PCR (AA) –	PCR (AA) +	PCR (AA) –	PCR (AA) +
MMP-91(K)	20,43 ± 1,23 (20,62)	20,90 ± 1,00 (21,26)	20,37 ± 1,80 (20,52)	20,87 ± 3,17 (20,92)
MMP-9 2(a)	11,04 ± 2,60 (9,66)	12,02 ± 3,09 (11,49)	17,32 ± 2,13 (17,15)	17,37 ± 2,13 (17,47)
MMP-9 3(b)	21,52 ± 0,09 (21,56)	21,25 ± 0,67 (21,38)	20,39 ± 2,08 (20,24)	20,64 ± 2,29 (20,87)
MMP-9 4(c)	21,36 ± 0,24 (21,30)	21,15 ± 0,68 (21,30)	18,37 ± 2,25 (19,48)	19,63 ± 2,78 (20,66)

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)

*Mann-Whitney test*

Легенда – опсервациони интервали:

MMP-9 1 (K) – пре брушења; MMP-9 2 (a) – 15 минута након брушења;

MMP-9 3 (b) – 24 h након брушења; MMP-9 4 (c) – 72 h након брушења.

Мада у Г1 и Г2 понаособ између позитивних и негативних налаза *PCR Aggregatibacter actinomycetemcomitans* примењеним тестовима за поређење вредности параметара између независних узорака нису утврђене статистички значајне разлике вредности концентрација *IL-1β*, *VEGF* и *MMP-9*, у апсолутно доминантном броју случајева вредности концентрација испитиваних биохемијских параметара више су при позитивном налазу *PCR Aggregatibacter actinomycetemcomitans* те се може рећи да постоји извесна повезаност *PCR Aggregatibacter actinomycetemcomitans* налаза са вредностима концентрација биохемијских параметара, тако да су при позитивним *PCR* налазима *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* вредности концентрација испитиваних биохемијских параметара више.

У табелама 32, 33 и 34 приказана је корелација *PCR* налаза периодонтопатогених бактерија и експресија маркера инфламације у гингивалној течности код *Tannerella forsythia*.

**Табела 32.** Вредности концентрација *IL-1 $\beta$*  пре (*IL-1 $\beta$  1*) и након препарације зуба (*IL-1 $\beta$  2*, *IL-1 $\beta$  3*, *IL-1 $\beta$  4*) према резултату *PCR* налаза *Tannerella forsythia* (TF) у гингивалној течности у односу на позицију демаркације препарације зуба.

IL-1 $\beta$	Г1		Г2	
	PCR (TF) –	PCR (TF) +	PCR (TF) –	PCR (TF) +
IL-1 $\beta$ (K)	16,74 $\pm$ 1,46 (16,36)	16,94 $\pm$ 1,97 (16,36)	16,19 $\pm$ 1,78 (16,10)	16,88 $\pm$ 2,18 (16,44)
IL-1 $\beta$ 2(a)	23,30 $\pm$ 4,28 (23,92)	23,32 $\pm$ 4,20 (23,54)	21,28 $\pm$ 3,60 (20,88)	23,16 $\pm$ 5,17 (23,83)
IL-1 $\beta$ 3(b)	28,23 $\pm$ – –	28,59 $\pm$ 2,68 (28,81)	29,82 $\pm$ 2,50 (30,09)	29,67 $\pm$ 2,19 (29,74)
IL-1 $\beta$ 4(c)	24,56 $\pm$ 5,18 (24,74)	24,98 $\pm$ 3,69 (25,19)	26,73 $\pm$ 5,58 (25,28)	30,41 $\pm$ 5,90 (28,52)

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (медијана)

*Mann-Whitney test*

Легенда – опсервациони интервали:

IL-1 $\beta$  1(K) – пре брушења; IL-1 $\beta$  2 (a) – 15 минута након брушења;  
IL-1 $\beta$  3 (b) – 24 h након брушења; IL-1 $\beta$  4 (c) – 72 h након брушења.

**Табела 33.** Вредности концентрација *VEGF* пре (*VEGF(K)*) и након препарације зуба (*VEGF2(a)*, *VEGF3(b)*, *VEGF4(c)*) према резултату *PCR* налаза *Tannerella forsythia* (TF) у гингивалној течности у односу на позицију демаркације препарације зуба.

VEGF	Г1		Г2	
	PCR (TF) –	PCR (TF) +	PCR (TF) –	PCR (TF) +
VEGF1(K)	6,73 $\pm$ 0,64 (6,58)	6,21 $\pm$ 0,70 (6,28)	5,56 $\pm$ 1,94 (5,14)	8,86 $\pm$ 3,06 (7,90)*
VEGF2(a)	11,28 $\pm$ 2,74 (10,90)	12,56 $\pm$ 2,30 (12,45)	6,33 $\pm$ 2,74 (5,36)	8,86 $\pm$ 3,33 (8,72)**
VEGF3(b)	8,44 – –	9,13 $\pm$ 3,25 (9,66)	5,97 $\pm$ 1,99 (5,55)	7,15 $\pm$ 3,14 (7,14)
VEGF4(c)	4,88 $\pm$ 1,76 (5,04)	6,17 $\pm$ 2,19 (6,20)	4,34 $\pm$ 2,04 (3,70)	4,62 $\pm$ 2,23 (4,04)

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (медијана)

*Mann-Whitney test*

Легенда – опсервациони интервали:

VEGF1 (K) – пре брушења; VEGF2 (a) – 15 минута након брушења;  
VEGF3 (b) – 24 h након брушења; VEGF4 (c) – 72 h након брушења.

**Табела 34.** Вредности концентрација *MMP9* пре (*MMP9-1*) и након препарације зуба (*MMP9-2*, *MMP9-3*, *MMP9-4*) према резултату *PCR* налаза *Tannerella forsythia* (TF) у гингивалној течности у односу на позицију демаркације препарације зуба.

MMP-9	Г1		Г2	
	PCR (TF) –	PCR (TF) +	PCR (TF) –	PCR (TF) +
MMP-91(К)	20,54 ± 1,21 (20,97)	20,77 ± 1,09 (1,09)	20,37 ± 2,19 (21,16)	20,75 ± 0,39 (20,63)
MMP-9 2(а)	11,48 ± 3,65 (9,73)	11,80 ± 2,92 (11,49)	18,43 ± 2,11 (18,08)	18,18 ± 1,96 (17,47)
MMP-9 3(б)	22,28 – –	21,25 ± 0,61 (21,38)	20,39 ± 0,80 (20,26)	20,62 ± 2,60 (20,99)
MMP-9 4(с)	20,79 ± 0,85 (21,18)	21,25 ± 0,57 (21,34)	19,01 ± 2,74 (19,69)	19,19 ± 2,44 (19,57)

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)

*Mann-Whitney test*

Легенда – опсервациони интервали:

MMP-9 1 (К) – пре брушења; MMP-9 2 (а) – 15 минута након брушења;

MMP-9 3 (б) – 24 h након брушења; MMP-9 4 (с) – 72 h након брушења.

Статистички значајно више вредности концентрација *VEGF* утврђене су *Mann-Whitney* тестом при позитивном *PCR Tannerella forsythia* налазу у Г2 пре ( $p < 0,05$ ) и 15 минута после препарације ( $p < 0,01$ ). Иако без статистички значајних разлика у осталим случајевима, вредности концентрација биохемијских параметара у преовлађујућем броју случајева су више при позитивном налазу *PCR Tannerella forsythia*, што указује на повезаност *PCR Tannerella forsythia* налаза са вредностима концентрација биохемијских параметара. Наиме, при позитивним *PCR* налазима *Tannerella forsythia* вредности концентрација испитиваних биохемијских параметара су у принципу више.

У табелама 35, 36 и 37 приказана је корелација *PCR* налаза периодонтопатогених бактерија и експресија маркера инфламације у гингивалној течности код *Prevotella intermedia*.

**Табела 35.** Вредности концентрација *IL-1 $\beta$*  пре (*IL-1 $\beta$  1*) и након препарације зуба (*IL-1 $\beta$  2*, *IL-1 $\beta$  3*, *IL-1 $\beta$  4*) према резултату *PCR* налаза *Prevotella intermedia* (PI) у гингивалној течности у односу на позицију демаркације препарације зуба.

IL-1 $\beta$	Г1		Г2	
	PCR (PI) –	PCR (PI) +	PCR (PI) –	PCR (PI) +
IL-1 $\beta$ (K)	16,57 $\pm$ 1,60 (16,11)	18,69 $\pm$ 1,82 (19,16)	16,29 $\pm$ 1,76 (16,10)	16,40 $\pm$ 2,57 (15,59)
IL-1 $\beta$ 2(a)	23,22 $\pm$ 3,97 (21,91)	23,84 $\pm$ 5,54 (27,28)	22,13 $\pm$ 4,21 (21,91)	21,65 $\pm$ 5,10 (18,99)
IL-1 $\beta$ 3(b)	28,33 $\pm$ 2,89 (27,81)	29,00 $\pm$ 2,47 (29,21)	29,99 $\pm$ 2,33 (29,74)	29,38 $\pm$ 2,25 (29,21)
IL-1 $\beta$ 4(c)	24,99 $\pm$ 3,32 (25,54)	24,77 $\pm$ 4,84 (23,64)	28,59 $\pm$ 6,30 (25,54)	26,28 $\pm$ 2,93 (25,19)

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (медијана)

*Mann-Whitney test*

Легенда – опсервациони интервали:

IL-1 $\beta$  1(K) – пре брушења; IL-1 $\beta$  2 (a) – 15 минута након брушења;  
IL-1 $\beta$  3 (b) – 24 h након брушења; IL-1 $\beta$  4 (c) – 72 h након брушења.

**Табела 36.** Вредности концентрација *VEGF* пре *VEGF(K)* и након препарације зуба (*VEGF2(a)*, *VEGF3(b)*, *VEGF4(c)*) према резултату *PCR* налаза *Prevotella intermedia* (PI) у гингивалној течности у односу на позицију демаркације препарације зуба.

VEGF	Г1		Г2	
	PCR (PI) –	PCR (PI) +	PCR (PI) –	PCR (PI) +
VEGF1(K)	6,43 $\pm$ 0,71 (6,38)	6,35 $\pm$ 0,68 (6,27)	6,11 $\pm$ 2,56 (5,35)	6,21 $\pm$ 1,40 (6,05)
VEGF2(a)	12,39 $\pm$ 2,31 (12,61)	12,30 $\pm$ 2,79 (12,94)	7,29 $\pm$ 3,49 (6,15)	7,53 $\pm$ 1,56 (6,95)
VEGF3(b)	9,10 $\pm$ 2,88 (9,66)	9,11 $\pm$ 3,84 (8,54)	6,65 $\pm$ 2,67 (6,58)	6,72 $\pm$ 3,00 (5,55)
VEGF4(c)	5,99 $\pm$ 2,11 (6,20)	6,03 $\pm$ 2,36 (6,67)	4,29 $\pm$ 2,09 (3,70)	5,30 $\pm$ 2,06 (4,72)

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (медијана)

*Mann-Whitney test*

Легенда – опсервациони интервали:

VEGF1 (K) – пре брушења; VEGF2 (a) – 15 минута након брушења;  
VEGF3 (b) – 24 h након брушења; VEGF4 (c) – 72 h након брушења.

**Табела 37.** Вредности концентрација *MMP9* пре (*MMP9-1*) и након препарације зуба (*MMP9-2*, *MMP9-3*, *MMP9-4*) према резултату *PCR* налаза *Prevotella intermedia* (PI) у гингивалној течности у односу на позицију демаркације препарације зуба.

MMP-9	Г1		Г2	
	PCR (PI) –	PCR (PI) +	PCR (PI) –	PCR (PI) +
MMP-91(К)	20,64 ± 1,18 (21,24)	20,97 ± 0,71 (21,22)	20,43 ± 1,80 (21,00)	20,52 ± 3,21 (21,32)
MMP-9 2(a)	11,75 ± 3,07 (9,81)	11,78 ± 2,61 (11,49)	18,27 ± 1,83 (17,92)	18,57 ± 2,64 (18,07)
MMP-9 3(b)	21,33 ± 0,62 (21,51)	21,19 ± 0,68 (21,38)	20,81 ± 1,77 (21,46)	20,15 ± 2,64 (21,56)
MMP-9 4(c)	21,20 ± 0,62 (21,30)	21,18 ± 0,64 (21,23)	19,07 ± 2,61 (19,89)	19,12 ± 2,83 (19,89)

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)

*Mann-Whitney test*

Легенда – опсервациони интервали:

MMP-9 1 (К) – пре брушења; MMP-9 2 (a) – 15 минута након брушења;

MMP-9 3 (b) – 24 h након брушења; MMP-9 4 (c) – 72 h након брушења.

Иако у обе испитиване групе понаособ између позитивних и негативних налаза *PCR Prevotella intermedia* тестовима за поређење вредности између независних узорака нису установљене статистички значајне разлика вредности концентрација *IL-1β*, *VEGF* и *MMP9* у гингивалној течности, у преовлађујућем броју случајева биохемијски параметри су виших испитиваних вредности концентрација при позитивном налазу *PCR Prevotella intermedia*, па се може говорити о постојању повезаности *PCR Prevotella intermedia* налаза са вредностима концентрација биохемијских параметара.

## 5.6. РЕЗУЛТАТИ ПИЛОТ СТУДИЈА

### 5.6.1. РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА КЛИНИЧКИХ И ЦИТОМОРФОМЕТРИЈСКИХ ПРОМЕНА НА ТКИВУ ГИНГИВЕ ПРЕ И ПОСЛЕ БРУШЕЊА ЗУБА

Истраживање у пилот студији је обухватило 19 испитаника, старости 35 до 65 година, којима је брушен очњак у горњој вилици за металокерамичку круницу. Демаркација препарације била је локализована 0,3 до 0,5 mm у простору гингивалног сулкуса (субгингивална демаркација). Истраживање је обухватило клиничко одређивање ГИ и ИКРВ, као и анализу цитоморфометријских параметара у четири опсервациона интервала (пре брушења, 15 минута, 24 h и 72 h после брушења горњег очњака).

#### Гингивални индекси (ГИ и ИКРВ)

Вредности оба континуална испитивана параметра највише су 15 минута након брушења, а опадају након 24 h и 72 h од препарације зуба (табела 38 и графикон 19). *Wilcoxon Signed Ranks* тестом утврђено је да су вредности ових параметара статистички значајно више у свим интервалима након, у односу на вредности пре препарације зуба. Такође, вредности испитиваних параметара 24 h и 72 h након брушења зуба статистички су значајно ниже у односу на вредности ових параметара 15 минута након брушења. *Fridman*-овим тестом утврђена је статистички значајна разлика вредности испитиваних параметара током целог периода испитивања, а утицај времена, на основу вредности *Kendalovog* коефицијента конкорданције, статистички је веома јак.

**Табела 38.** Вредности ГИ и ИКРВ током периода испитивања.

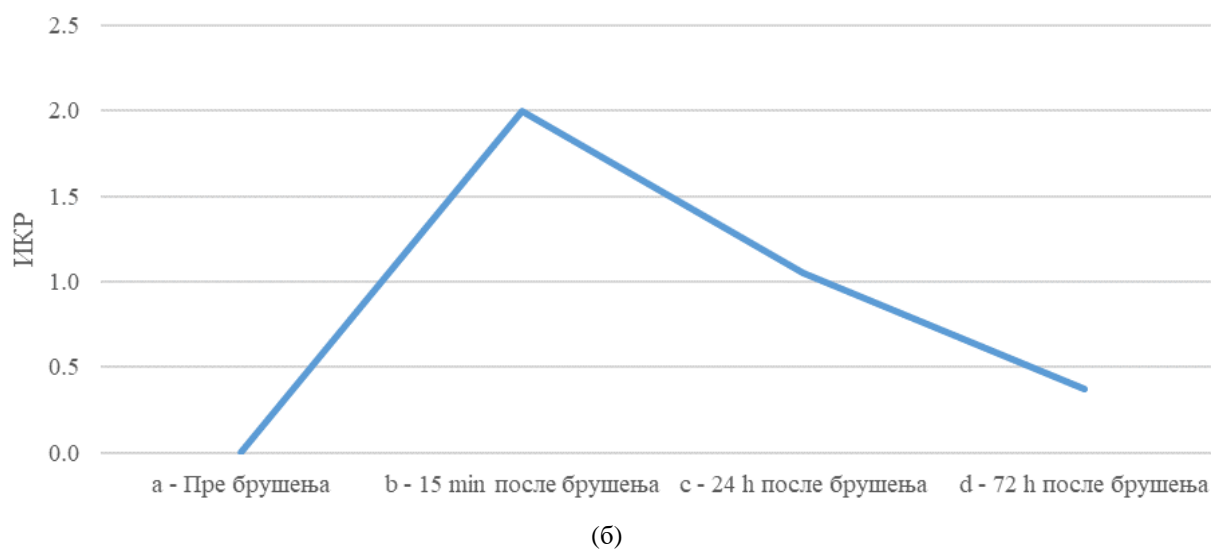
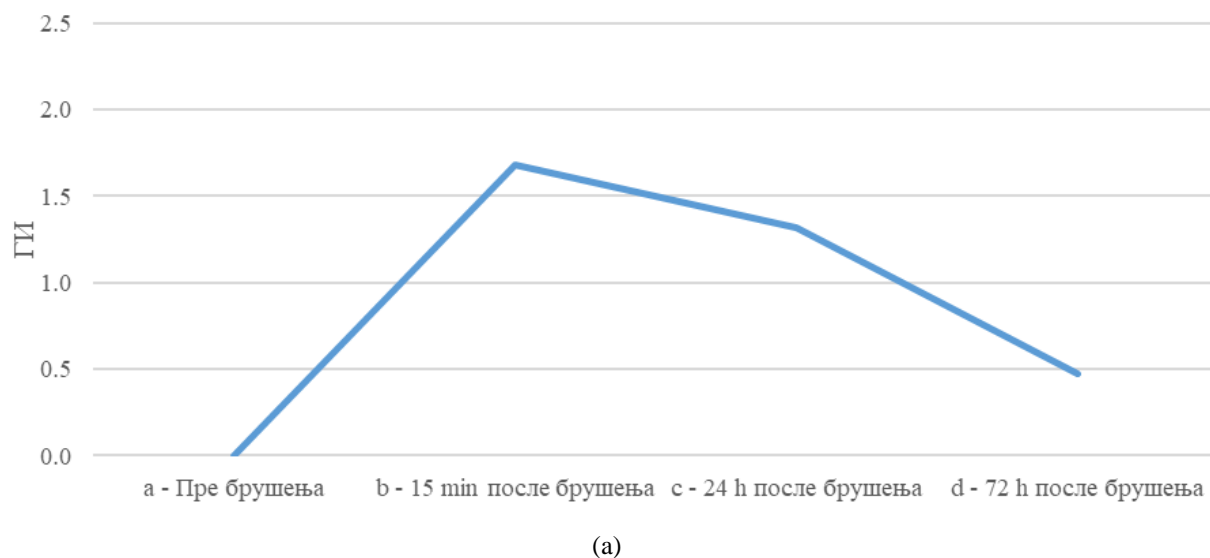
Опсервациони интервал	ГИ		ИКРВ	
a – пре препарације	0,00 ± 0,00	(0,00)	0,00 ± 0,00	(0,00)
b – 15 минута после препарације	1,68 ± 0,48	(2,00) <sup>a***</sup>	2,00 ± 0,47	(2,00) <sup>a***</sup>
c – 24 h после препарације	1,32 ± 0,48	(1,00) <sup>a***b*</sup>	1,05 ± 0,52	(1,00) <sup>ab***</sup>
d – 72 h после препарације	0,47 ± 0,51	(0,00) <sup>a***bc***</sup>	0,37 ± 0,50	(0,00) <sup>a***bc***</sup>
p (Friedman Test)	<0,001		<0,001	
Kendall's Coefficient of Concordance	0,86		0,90	

Параметри су дати као средње вредности ± стандардне девијације (медијане)

(*Wilcoxon Signed Ranks Test*)

\* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001





**Графикон 19.** Кретање средњих вредности ГИ (а) и ИКРВ (б) током испитиваног периода.

Цитоморфометријски преглед је показао да нема статистички значајних разлика у вредностима параметара *Area*, *Perim*, *Feret*, и *Feret Angle* између контролних и експерименталних група, као ни вредностима истих параметара између узорака експерименталних група (табела 39).

**Табела 39.** Цитоморфометријске вредности за време испитивања.

Area	X	± SD	(Me)	p		
				vs 0	vs 1	vs 2
5 мин пре	74,44	± 18,46	(72,38)			
15 мин после	68,75	± 15,58	(68,46)	0,4846		
24 h после	71,13	± 19,09	(66,64)	0,6048	0,9736	
72 h после	80,54	± 23,99	(69,61)	0,5346	0,2465	0,2582
Perim	X	± SD	(Me)	vs 0	vs 1	vs 2
5 мин пре	32,22	± 3,71	(31,32)			
15 мин после	30,95	± 3,36	(30,96)	0,5434		
24 h после	31,35	± 3,71	(30,70)	0,5016	0,9868	
72 h после	32,95	± 4,49	(30,80)	0,6538	0,4078	0,3461
Circ	X	± SD	(Me)	vs 0	vs 1	vs 2
5 мин пре	0,88	± 0,04	(0,89)			
15 мин после	0,89	± 0,03	(0,89)	0,7710		
24 h после	0,89	± 0,03	(0,89)	0,6401	0,7885	
72 h после	0,91	± 0,03	(0,91)	0,0498	0,0279	0,1088
Feret	X	± SD	(Me)	vs 0	vs 1	vs 2
5 мин пре	12,15	± 1,31	(11,87)			
15 мин после	11,78	± 1,30	(11,75)	0,3965		
24 h после	11,77	± 1,38	(11,36)	0,2695	0,5962	
72 h после	12,11	± 1,49	(11,66)	0,9416	0,4853	0,4287
IntDen	X	± SD	(Me)	vs 0	vs 1	vs 2
5 мин пре	21,87	± 6,38	(22,10)			
15 мин после	18,77	± 3,88	(18,13)	0,0802		
24 h после	19,80	± 5,56	(18,63)	0,3515	0,8167	
72 h после	21,99	± 5,45	(21,58)	0,9563	0,0497	0,1416
FeretAngle	X	± SD	(Me)	vs 0	vs 1	vs 2
5 мин пре	108,31	± 24,61	(114,47)			
15 мин после	102,19	± 24,10	(100,69)	0,4500		
24 h после	105,02	± 24,13	(107,24)	0,6971	0,7318	
72 h после	92,88	± 23,06	(84,98)	0,0693	0,2538	0,1561

				P		
MinFerret	X	± SD	(Me)	vs 0	vs 1	vs 2
5 мин пре	8,31	± 1,33	(8,11)			
15 мин после	7,83	± 1,07	(7,95)	0,2270		
24 h после	8,27	± 1,7	(8,03)	0,9190	0,2499	
72 h после	8,92	± 1,51	(8,37)	0,2142	0,0370	0,2278
Round	X	± SD	(Me)	vs 0	vs 1	vs 2
5 мин пре	0,72	± 0,10	(0,76)			
15 мин после	0,70	± 0,06	(0,71)	0,2127		
24 h после	0,73	± 0,08	(0,74)	0,9039	0,1304	
72 h после	0,77	± 0,04	(0,77)	0,3515	0,005	0,1255
Solidity	X	± SD	(Me)	vs 0	vs 1	vs 2
5 мин пре	0,95	± 0,01	(0,96)			
15 мин после	0,96	± 0,01	(0,96)	0,3399		
24 h после	0,95	± 0,01	(0,95)	0,8035	0,2406	
72 h после	0,96	± 0,01	(0,96)	0,0479	0,3696	0,0246

Континуалне варијабле су дате као средње вредности ± стандардна девијација (*SD*, *mediana*).

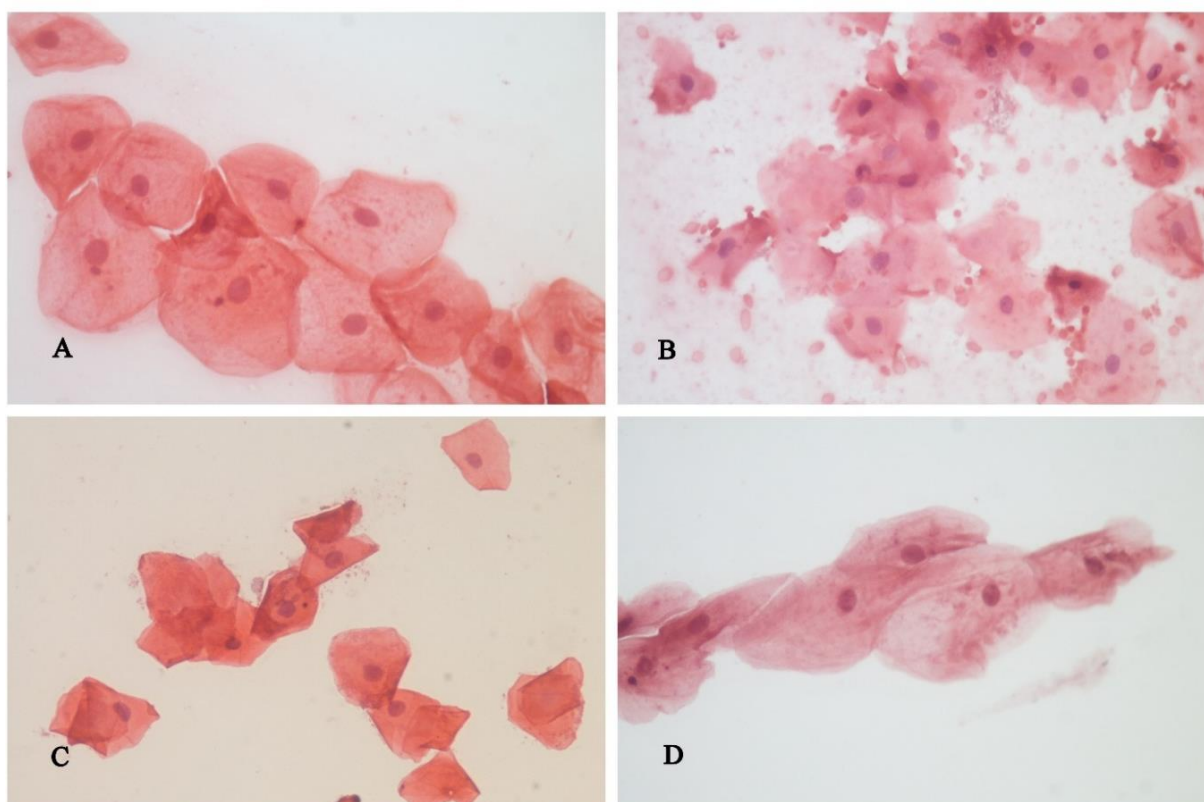
a – vs контрола (5 минута пре брушења), b – vs 15 минута након брушења, c – vs 24 h након брушења.

\* –  $p < 0,05$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  (*Student test* зависних узорака / *Mann Whitney test*)

Такође, није било статистички значајних разлика ни за вредности параметара *IntDen*, *MinFerret* и *Round*.

Доказане су статистички значајно веће вредности параметара *Circ*, *IntDen*, *MinFerret* ( $p < 0,05$ ) као и *Round* ( $p < 0,001$ ) након 72 h, у односу на вредности 15 минута након препарације зуба. Вредности параметра *Solidity* биле су статистички сигнификантно веће у групи узорака након 72 h у односу на узорке узете после 24 h ( $p < 0,05$ ).

Цитоморфометријска анализа на цитолошком материјалу приказана је на слици 20.



**Слика 21.** Површинске ћелије сквамозног гингивалног епитела, Цитолошки брис, *H&E*:

А – пре брушења; В – 15 минута након брушења,

С – 24 h након брушења, D – 72 h након брушења.

### 5.6.2. РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА КОНЦЕНТРАЦИЈЕ *MMP-9* И ПРИСУСТВА ПЕРИОДОНТОПАТОГЕНА У ГИНГИВАЛНОЈ ТЕЧНОСТИ ПРЕ И ПОСЛЕ БРУШЕЊА ЗУБА

У овој пилот студији испитивана је концентрација *MMP-9* у гингивалној течности *ELISA* методом у хомогеној групи од 20 испитаника (старост 30 до 40 година), подељених у две групе: са субгингивалном (група 1) и еквингивалном демаркацијом препарације (група 2). Такође је испитивано присуство периодонтопатогена (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* и *Porphyromonas gingivalis*) *PCR* анализом. Испитивања су вршена у сва четири предвиђена опсервациона интервала (пре брушења, 15 минута, 24 h и 72 h после брушења горњег очњака).

### Експресија *MMP-9*

За вредности концентрација *MMP-9*, посматрана је разлика између две групе испитаника, као и разлика у вредностима у току посматраних интервала, пратећи линеарни и квадратни тренд у опсервационом периоду.

Вредности концентрација *MMP-9* код две групе испитаника након различитих опсервационих интервала приказане су у табели 40 и графикону 20.

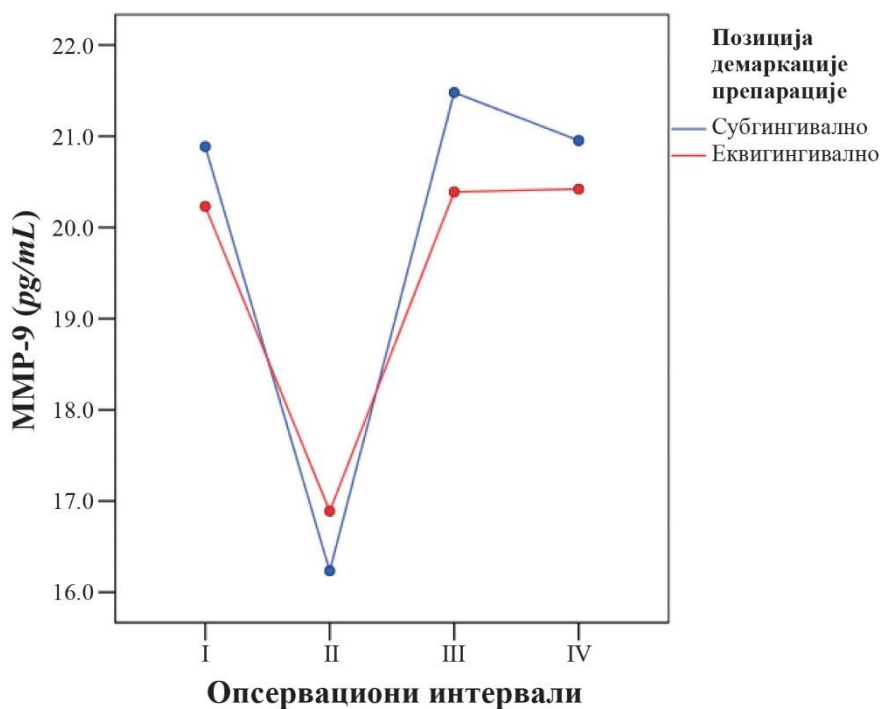
**Табела 40.** Концентрација *MMP-9* током различитих опсервационих интервала.

Опсервациони интервал	Група 1	Група 2
Пре брушења	20,9 ± 1,0 pg/mL	20,2 ± 2,1 pg/mL
15 минута након брушења	16,2 ± 3,5 pg/mL	16,9 ± 2,0 pg/mL
24 h након брушења	21,5 ± 0,6 pg/mL	20,4 ± 2,2 pg/mL
72 h након брушења	21,0 ± 1,2 pg/mL	20,4 ± 2,1 pg/mL

Вредности концентрација *MMP-9* се не разликују статистички значајно у односу на групе испитаника, односно, у односу на позицију демаркације препарације ( $F=3982,8$ ,  $p=0,524$ ).

Вредности концентрација *MMP-9*, одређене у четири мерена интервала, показују статистички значајну разлику у датом опсервационом периоду ( $F=30,561$ ,  $p<0,001$ ). У испитиваном времену постоји статистички значајан линеарни тренд пораста вредности *MMP-9* ( $F=19,010$ ,  $p<0,001$ ) и значајан квадратни тренд са падом вредности *MMP-9*, 15 минута након брушења, а које у даљем току испитиваног времена имају значајан пораст, тако да вредности концентрација након 72 h од брушења бележе и нешто веће вредности него пре почетка брушења.

Вредности концентрација *MMP-9* се разликују у посматраном периоду али интеракција тих промена се значајно не разликује између група ( $F=0,977$ ,  $p=0,392$ ). Промене вредности концентрација *MMP-9* између мерења су у току посматраног периода идентичне за обе групе испитаника.



**Графикон 20.** Вредности концентрација маркера инфламације *MMP-9* између група и посматраних интервала опсервације (pg/mL).

I – пре брушења, II – 15 минута након брушења, III – 24 h након брушења, IV – 72 h након брушења

### Присуство периодонтопатогених бактерија

У табели 41 приказана је разлика учесталости појединих периодонтопатогена посматрана између група испитаника за сваки опсервациони интервал и да ли је промена присуства бактерија била значајна у току испитиваног опсервационог периода. У табели 41, у последњој колони су *p* вредности за *Fisherov* тест којим се тестира разлика учесталости узročника између група у посматраним интервалима. За сваку групу и бактерију урађен је и *Cochran* тест којим је тестирана разлика у присутности периодонтопатогена током времена посматрања, да ли долази до повећања или смањења узročника у неком од интервала.

Код испитаника у групи 2 статистички значајно учесталији периодонтопатогени у гингивалној течности били су: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* потврђен 72 h након брушења ( $p=0,023$ ) и *Prevotella intermedia* у узорку добијеном 15 минута након брушења ( $p=0,033$ ). Разлике учесталости у осталим интервалима посматрања укључујући и остале узročнике (*Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*) у односу на позицију демаркације препарације током брушења нису биле статистички значајне ни за један посматрани интервал. Присуство периодонтопатогена се мењало и у току посматраног периода у обе групе испитаника али за одређене узročнике.

**Табела 41.** Присуство бактерија у гингивалној течности у испитиваним групама и различитим опсервационим интервалима.

Бактерије (време опсервације)	Позиција демаркације препарације		
	Субгингивално	Еквингивално	<i>Fisher test</i>
	10 (50,0%)	10 (50,0%)	( <i>p value</i> )
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>			
Пре брушења	2 (20,0)	6 (60,0)	0,170
15 мин након брушења	1 (10,0)	2 (20,0)	1,00
24 h након брушења	5 (50,0)	7 (70,0)	0,650
72 h након брушења	2 (20,0)	8 (80,0)	0,023*
<i>Cochran test (p вредност)</i>	0,029*	0,026*	
<i>Prevotella intermedia</i>			
Пре брушења	5 (50,0)	6 (60,0)	1,00
15 мин након брушења	0 (0,0)	5 (50,0)	0,033*
24 h након брушења	2 (20,0)	6 (60,0)	0,170
72 h након брушења	1 (20,0)	4 (40,0)	0,121
<i>Cochran test (p вредност)</i>	0,025*	0,697	
<i>Tannerella forsythia</i>			
Пре брушења	9 (90,0)	10 (100,0)	1,00
15 мин након брушења	3 (30,0)	5 (50,0)	0,650
24 h након брушења	7 (70,0)	7 (70,0)	1,00
72 h након брушења	7 (70,0)	7 (70,0)	1,00
<i>Cochran test (p вредност)</i>	0,016*	0,063	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>			
Пре брушења	4 (40,0)	2 (20,0)	0,628
15 мин након брушења	1 (10,0)	1 (10,0)	1,00
24 h након брушења	3 (30,0)	3 (30,0)	1,00
72 h након брушења	1 (10,0)	2 (20,0)	1,00
<i>Cochran test (p вредност)</i>	0,234	0,721	

Подаци су дати бројчано (процентуално),\* – статистичка значајност

Разлика учесталости бактерија у посматраном периоду је била значајна за испитанике у првој групи са субгингивалном позицијом демаркације препарације и то за *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* и *Tannerella forsythia*. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ( $p=0,029$ ), са повећањем присуства узрочника у периоду 24 h у односу на период 15 минута након брушења. Код *Prevotella intermedia* ( $p=0,025$ ), уочено је веће присуство бактерије пре брушења у односу на период 15 минута након брушења. У случају *Tannerella forsythia* ( $p=0,016$ ), присуство бактерије је значајно мање 15 мин након брушења у односу на период пре брушења ( $p=0,031$ ).

У другој групи испитаника са еквигингивалном позицијом демаркације препарације постоји значајна разлика у присуству *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* током посматраног периода ( $p=0,023$ ), са значајним повећањем присуства периодонтопатогена 72 h након брушења у односу на период 15 минута након брушења ( $p=0,033$ ).

## **5.7. РЕЗУЛТАТИ КВАЛИТАТИВНЕ И КВАНТИТАТИВНЕ ДИСТРИБУЦИЈЕ БИОАЕРОСОЛА ЗА ВРЕМЕ БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ**

### **5.7.1. РЕЗУЛТАТИ КВАНТИТАТИВНЕ ДИСТРИБУЦИЈЕ БИОАЕРОСОЛА ЗА ВРЕМЕ БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ**

У табели 42 и на графикону 21 приказан је број колонија аеробних бактерија на Петријевим шољама детектованим на различитој удаљености од усне дупље пацијента током брушења зуба (радно поље) са субгингивалном и еквигингивалном позицијом демаркације препарације.

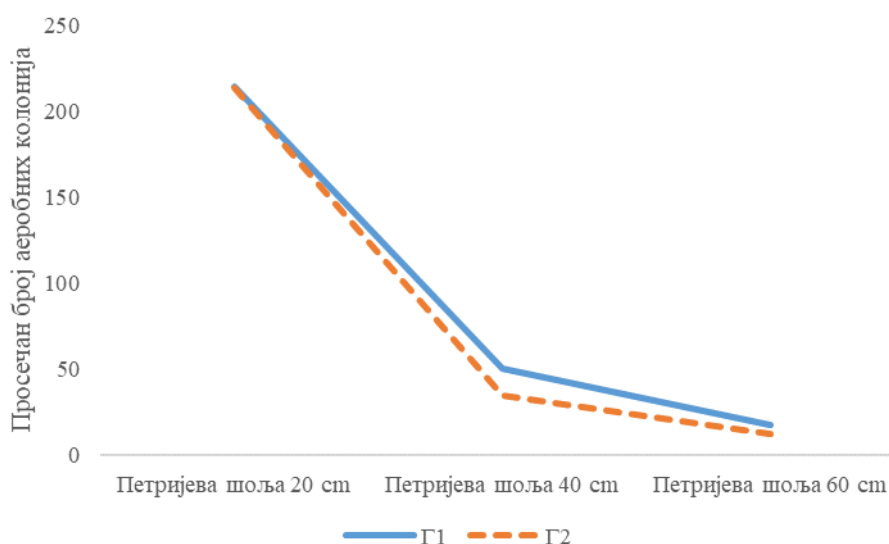


**Табела 42.** Број колонија аеробних бактерија формираних на Петријевим шољама на различитој удаљености од радног поља у односу на позицију демаркације препарације (CFU/Петријева шоља).

Удаљеност Петријеве шоље	Г1		Г2			
	X ± SD	(Me)	X ± SD	(Me)		
20 cm (a)	214,50 ± 265,66 <sup>***bc</sup>	(87,00)	213,47 ± 236,89 <sup>***bc</sup>	(109,00)		
40 cm (b)	49,90 ± 69,71 <sup>***c</sup>	(21,00)	34,40 ± 34,40 <sup>***c</sup>	(20,00)		
60 cm (c)	17,07 ± 18,01	(10,00)	12,33 ± 12,57	(10,00)		
	p	$\chi^2$	Kendall's W	p	$\chi^2$	Kendall's W
Friedman test	0,0000	47,09	0,78	0,0000	59,00	0,98

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)

\* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001, b – vs 40 cm, c – vs 60 cm (*Wilcoxon Signed Ranks Test*)



**Графикон 21.** Средње вредности броја колонија аеробних микроорганизама на различитој удаљености од радног поља у испитиваним групама (CFU/Петријева шоља).

Велики број колонија аеробних микроорганизама утврђен је у обе групе на Петријевим шољама постављеним на 20 cm удаљености од радног поља где се обављала препарација зуба. У Петријевим шољама постављеним на већим удаљеностима у обе групе дошло је огромног пада броја формираних аеробних колонија.

Поређењем броја колонија *Man-Whitney* тестом између испитиваних група нису утврђене статистички значајне разлике ни на једној удаљености Петријевих шоља од радног поља.

*Friedman*-овим тестом код оба типа препарације утврђене су статистички високо значајне промене броја колонија са променом удаљености Петријевих шоља од радног поља. Изузетно високе вредности *Kendallovog W* теста указују на веома велики ефекат удаљености од места препарације зуба на промену броја формираних колонија аероба, а ефекат је виши у Г2.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом утврђено је да је у обе испитиване групе број аеробних колонија на Петријевој шољи на 20 cm удаљености статистички значајно виши од остале две шоље, на 40 и 60 cm, као и да је број формираних колонија на шољи постављеној на 40 cm удаљености статистички значајно виши у односу на шољу удаљености 60 cm, са изузетно високим нивоима значајности ( $p < 0,001$ ).

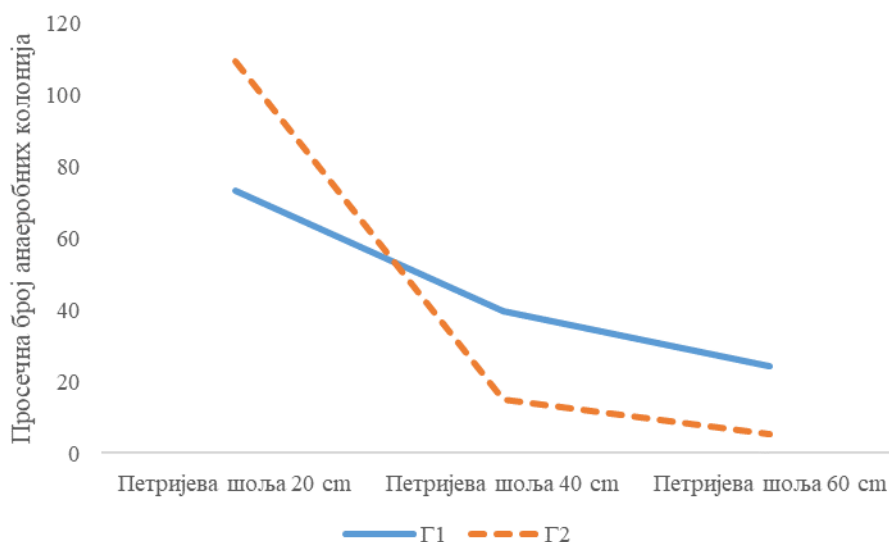
У табели 43 и на графикану 22 приказан је број колонија факултативно анаеробних бактерија на Петријевим шољама детектованим на различитој удаљености од усне дупље пацијента током брушења зуба (радно поље) са субгингивалном и еквигингивалном позицијом демаркације препарације (CFU/Петријева шоља).

**Табела 43.** Број колонија факултативно анаеробних бактерија формираних на Петријевим шољама на различитој удаљености од радног поља у односу на позицију демаркације препарације (CFU/Петријева шоља).

Удаљеност Петријеве шоље	Г1			Г2		
	X ± SD	(Me)		X ± SD	(Me)	
20 cm (a)	73,40 ± 148,82 <sup>**c</sup>	(5,00)		109,33 ± 175,91 <sup>**b***c</sup>	(20,00)	
40 cm (b)	39,87 ± 108,32 <sup>*b</sup>	(0,00)		15,07 ± 54,38 <sup>**c</sup>	(0,00)	
60 cm (c)	24,20 ± 91,92	(0,00)		5,33 ± 18,14	(0,00)	
	p	$\chi^2$	Kendall's W	p	$\chi^2$	Kendall's W
Friedman test	0,0014	13,08	0,22	0,0000	24,95	0,41

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , b – vs 40 cm, c – vs 60 cm (*Wilcoxon Signed Ranks Test*)



**Графикон 22.** Средње вредности броја колонија факултативно анаеробних бактерија на различитој удаљености од радног поља у испитиваним групама (CFU/Петријева шоља).

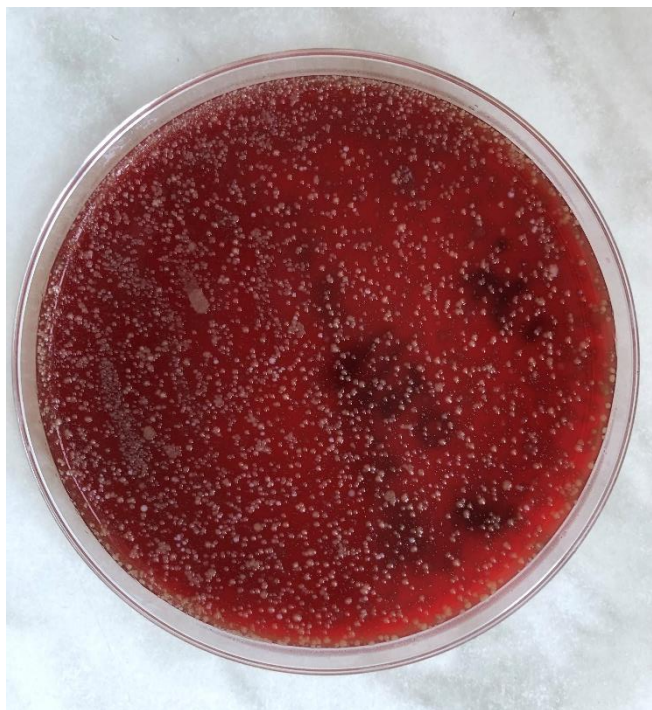
Код обе групе испитаника утврђен је велики број факултативно анаеробних колонија на Петријевим шољама постављеним на 20 cm од радног поља, односно, извора биоаеросола. На Петријевим шољама постављеним на већим удаљеностима у обе групе запажа се осетан пад броја формираних колонија факултативних анаероба.

Поређењем броја колонија *Man-Whitney* тестом између испитиваних група нису утврђене статистички значајне разлике ни на једној удаљености Петријевих шоља од радног поља.

*Friedman*-овим тестом код оба типа препарације утврђене су статистички значајне разлике броја колонија са променом удаљености Петријевих шоља од радног поља, где је обављана препарација, с тим да је ниво значајности виши у Г2. Изузетно високе вредности *Kendallovog W* теста указују на веома велики ефекат удаљености од места препарације зуба на промену броја формираних колонија факултативних анаероба, а ефекат је виши у Г2 ( $p < 0,001$ ) но у Г1 ( $p < 0,01$ ), о чему говоре у прилог и вредности *Kaledovog W* теста, које указују на мали, односно ефекат средњег интензитета.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом у Г1 је утврђено да је број колонија статистички значајно виши на Петријевој шољи на 20 cm удаљености у односу на шољу удаљености 60 cm ( $p < 0,01$ ), а у односу на коју је виши и број колонија на Петријевој шољи на 40 cm ( $p < 0,05$ ). У Г2 је статистички значајно виши број колонија на Петријевој шољи на 20 cm удаљености, како у односу на ону на 40 cm ( $p < 0,01$ ), тако и на ону на 60 cm ( $p < 0,001$ ) удаљености. Такође, виши је и број колонија на Петријевој шољи на 40 cm у односу на шољу на 60 cm ( $p < 0,01$ ) удаљености.

На сликама 22, 23, 24 и 25 приказане су Петријеве шоље, са развијеним колонијама микроорганизама, претходно постављене на различитој удаљености од радног поља (усне дупље пацијента) током брушења зуба, као и контролна Петријева шоља без присуства колонија микроорганизама.



**Слика 22.** Петријева шоља на 20 cm удаљености од радног поља.



**Слика 23.** Петријева шоља на 40 cm удаљености од радног поља.



**Слика 24.** Петријева шоља на 60 cm удаљености од радног поља.



**Слика 25.** Контролна (стерилна) Петријева шоља без присуства колонија микроорганизама.

## 5.7.2. РЕЗУЛТАТИ КВАНТИТАТИВНЕ ДИСТРИБУЦИЈЕ КОЛОНИЈА У ОРАЛНОЈ СРЕДИНИ ПРЕ И ПОСЛЕ БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ

У табели 44 и на графикону 23 приказан је број колонија аеробних бактерија по Петријевој шољи пре и после брушења зуба са субгингивалном и еквигингивалном позицијом демаркације препарације.

**Табела 44.** Број колонија аеробних бактерија из бриса пре (контрола) и после брушења зуба (студијски узорци) у односу на позицију демаркације препарације (CFU/Петријева шоља).

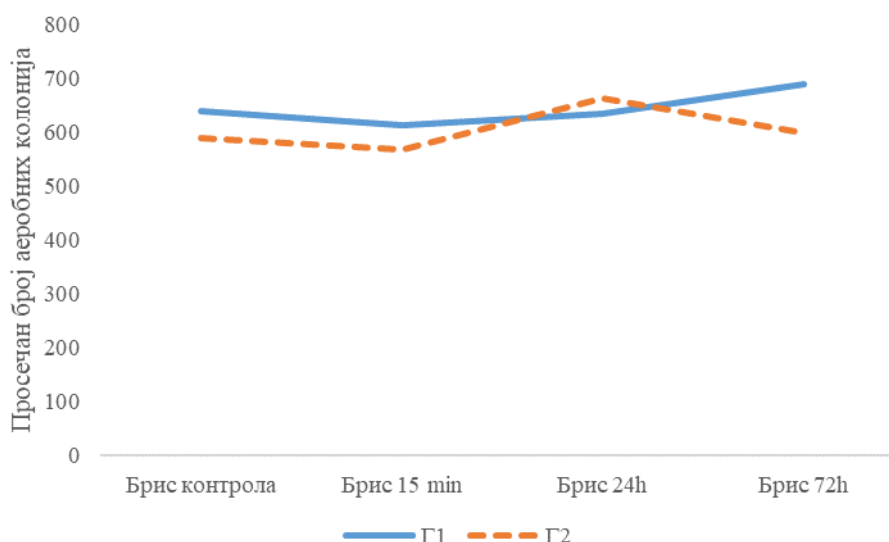
Брис	Г1			Г2		
	X ± SD	(Me)		X ± SD	(Me)	
Контрола	639,77 ± 295,83	(555,00)		589,20 ± 267,16	(535,00)	
15 минута (а)	613,40 ± 277,88	(540,00)		568,57 ± 212,83	(525,00)	
24 h (b)	635,70 ± 284,71	(595,00)		664,17 ± 221,61 <sup>**k*a</sup>	(600,00)	
72 h (c)	690,90 ± 292,47 <sup>*ab</sup>	(632,50)		599,50 ± 201,62	(585,00)	
	p	$\chi^2$	Kendall's W	p	$\chi^2$	Kendall's W
Friedman test	0,0136	10,68	0,12	0,0445	8,07	0,09

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)

\* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001, k – vs контрола,

a – vs 15 минута након препарације, b – vs 24 h након препарације (*Wilcoxon Signed Ranks Test*)

У обе испитиване групе 15 минута након препарације утврђени број аеробних колонија је нижи у односу на број ових колонија из контролног бриса. После 24 h од препарације долази до пораста броја аеробних колонија у обе групе, с тим да је у Г2 овај број колонија виши но у контролном брису. У Г1, 72 h након препарације број аеробних колонија битно расте и већи је и у односу на контролни брис, док у Г2 долази до пада броја колонија и он је релативно близак броју колонија из контролног бриса ове групе.



**Графикон 23.** Средње вредности броја колонија аеробних бактерија из брисева пре и после брушења зуба у различитим опсервационим интервалима (CFU/Петријева шоља).

Поређењем броја колонија *Man-Whitney* тестом између испитиваних група није било статистички значајних разлика у броју формираних колонија нити у контролним нити у студијским брисевима из осталих опсервационих интервала.

*Friedman*-овим тестом код оба типа препарације, односно у обе групе, утврђене су статистички значајне промене броја колонија са временом ( $p < 0,05$ ). Ниске вредности *Kendallovog W* теста указују на релативно низак ефекат времена опсервације на промену броја формираних колонија аероба, а ефекат је виши у Г2.

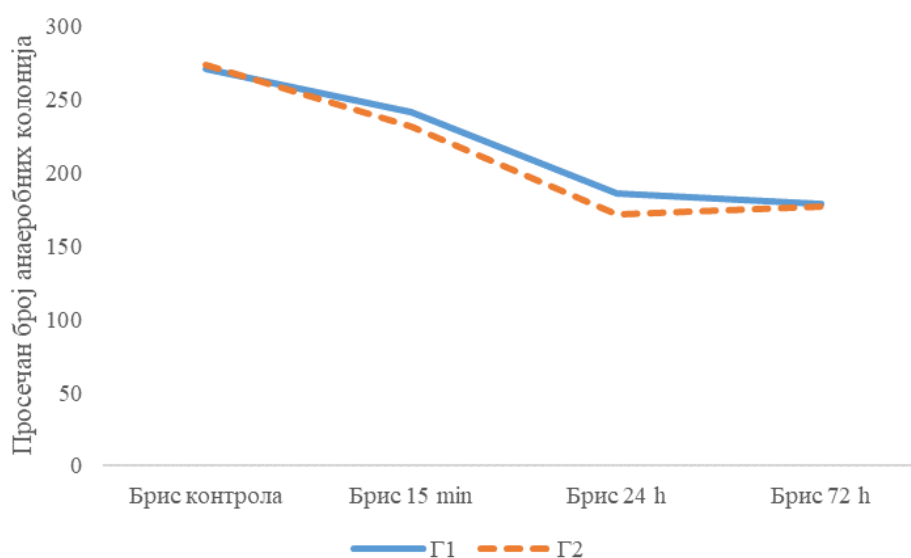
У Г1 *Wilcoxon Signed Ranks* тестом утврђено је да је број колонија 72 h након брушења статистички значајно виши у односу на контролу, као и у односу на период 24 h након препарације ( $p < 0,05$ ). Истим тестом у Г2 највиша вредност броја колонија аероба, у опсервационом интервалу 24 h након препарације, статистички је значајно виша у односу на контролу ( $p < 0,01$ ) и у односу на број колонија утврђених 15 минута након препарације ( $p < 0,05$ ).

У табели 45 и на графикону 24 приказан је број колонија факултативно анаеробних бактерија по Петријевој шољи пре и после брушења зуба са субгингивалном и еквигингивалном позицијом демаркације препарације.

**Табела 45.** Број колонија факултативно анаеробних микроорганизама из бриса пре (контрола) и после брушења зуба (студијски узорци) у односу на тип демаркације препарације (CFU/Петријева шоља).

Брис	Г1			Г2		
	X ± SD	(Me)		X ± SD	(Me)	
Контрола	270,47 ± 291,75	(100,00)		273,87 ± 317,64	(100,00)	
15 минута (а)	241,73 ± 223,33	(100,00)		231,40 ± 225,53	(110,00)	
24 h (b)	185,83 ± 204,99	(100,00)		171,50 ± 181,29	(100,00)	
72 h (c)	179,00 ± 194,18	(100,00)		176,67 ± 187,29	(100,00)	
	ρ	χ <sup>2</sup>	Kendall's W	ρ	χ <sup>2</sup>	Kendall's W
Friedman test	0,9084	0,55	0,01	0,5262	2,23	0,02

Подаци испитиваног параметра су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (медијана)



**Графикон 24.** Средње вредности броја колонија факултативно анаеробних бактерија из брисева пре и после брушења зуба у различитим опсервационим интервалима (CFU/Петријева шоља).



У обе групе 15 минута након препарације утврђени број колонија факултативно анаеробних бактерија нижи је у односу на број колонија из контролног бриса. Број колонија је још мањи 24 h након препарације.

Између испитиваних група није било статистички значајних разлика у броју формираних анаеробних колонија ни у контролном ни у брисевима из осталих опсервационих интервала.

*Friedman*-овим тестом у обе групе утврђене су статистички безначајне промене броја колонија са временом на шта указују изузетно ниске вредности *Kendallovog W* теста.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом ни у једној од група нису утврђене статистички значајне разлике у броју колонија факултативних анаероба између испитиваних опсервационих интервала.

### **5.7.3. РЕЗУЛТАТИ КВАЛИТАТИВНЕ ДИСТРИБУЦИЈЕ МИКРООРГАНИЗАМА ИЗ БИОАЕРОСОЛА ЗА ВРЕМЕ БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ**

У табели 46 и 47 приказана је квалитативна заступљеност колонија аеробних микроорганизама на Петријевим шољама детектованим на различитој удаљености од усне дупље пацијента (радно поље) током брушења зуба са субгингивалном и еквингивалном позицијом демаркације препарације.

У Г1 гледано процентуално у односу на број узорака најзаступљенији су налази *Staphylococcus epidermidis*-а, чије је присуство релативно константно на свим локацијама Петријевих шоља. Следи *Neisseria spp*, чије се процентуално учешће смањује са удаљеношћу Петријевих шоља, а потом *Streptococcus intermedius* чије је присуство релативно константно без обзира на локацију Петријевих шоља.

У Г2 процентуално у односу на број узорака најзаступљенији су налази *Neisseria spp*, чије присуство опада са удаљеношћу Петријевих шоља, а следе *Staphylococcus epidermidis* и *Streptococcus oralis* чије је присуство релативно константно на свим локацијама Петријевих шоља.

**Табела 46.** Заступљеност позитивних налаза колонија аеробних микроорганизама на Петријевим шољама 20, 40 и 60 cm удаљености у односу на радно поље у Г1 (CFU/Петријева шоља).

CFU аеробних микроорганизама	Удаљеност Петријева шоље					
	20 cm		40 cm		60 cm	
<i>Branchamella catarrhalis</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Candida spp.</i>	1	3,33%	1	3,33%	0	0,00%
<i>Corynebacterium spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	1	3,33%
Gram negativni bacili	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Gram pozitivni bacili	1	3,33%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Moraxella catarrhalis</i>	3	10,00%	3	10,00%	3	10,00%
<i>Moraxella spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	1	3,33%
<i>Neisseria elongata</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Neisseria flavescens</i>	1	3,33%	1	3,33%	1	3,33%
<i>Neisseria sicca</i>	0	0,00%	1	3,33%	0	0,00%
<b><i>Neisseria spp</i></b>	<b>13</b>	<b>43,33%</b>	<b>10</b>	<b>33,33%</b>	<b>7</b>	<b>23,33%</b>
<i>Neisseria subflava</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	16,67%	5	16,67%	5	16,67%
<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>	<b>14</b>	<b>46,67%</b>	<b>15</b>	<b>50,00%</b>	<b>13</b>	<b>43,33%</b>
<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>	1	3,33%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus agalactiae</i> (BHS grupe B)	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus alfa haemolyticus</i>	5	16,67%	2	6,67%	0	0,00%
<i>Streptococcus anginosus</i>	3	10,00%	2	6,67%	2	6,67%
<i>Streptococcus cristatus</i>	1	3,33%	1	3,33%	1	3,33%
<b><i>Streptococcus intermedius</i></b>	<b>8</b>	<b>26,67%</b>	<b>6</b>	<b>20,00%</b>	<b>7</b>	<b>23,33%</b>
<i>Streptococcus oralis</i>	4	13,33%	5	16,67%	4	13,33%
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	0	0,00%	1	3,33%	1	3,33%
<i>Streptococcus salivarius</i>	3	10,00%	3	10,00%	3	10,00%
<i>Streptococcus vestibularis</i>	3	10,00%	3	10,00%	3	10,00%

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално у односу на број узорка у групи (n=30)

**Табела 47.** Заступљеност позитивних налаза колонија аеробних микроорганизама на Петријевим шољама 20, 40 и 60 cm удаљености у односу на радно поље у Г2 (CFU/Петријева шоља).

CFU аеробних микроорганизама	Удаљеност Петријева шоље					
	20 cm		40 cm		60 cm	
<i>Branchamella catarrhalis</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Candida spp.</i>	2	6,67%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Corynebacterium spp</i>	0	0,00%	2	6,67%	1	3,33%
Gram negativni bacili	0	0,00%	0	0,00%	2	6,67%
Gram pozitivni bacili	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2	6,67%	2	6,67%	2	6,67%
<i>Moraxella spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Neisseria elongata</i>	1	3,33%	1	3,33%	1	3,33%
<i>Neisseria flavescens</i>	2	6,67%	2	6,67%	2	6,67%
<i>Neisseria sicca</i>	0	0,00%	1	3,33%	0	0,00%
<b><i>Neisseria spp</i></b>	<b>20</b>	<b>66,67%</b>	<b>13</b>	<b>43,33%</b>	<b>10</b>	<b>33,33%</b>
<i>Neisseria subflava</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	10,00%	3	10,00%	5	16,67%
<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>	<b>10</b>	<b>33,33%</b>	<b>10</b>	<b>33,33%</b>	<b>7</b>	<b>23,33%</b>
<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus agalactiae</i> (BHS grupe B)	3	10,00%	3	10,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus alfa haemolyticus</i>	3	10,00%	1	3,33%	0	0,00%
<i>Streptococcus anginosus</i>	1	3,33%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus cristatus</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus intermedius</i>	6	20,00%	3	10,00%	3	10,00%
<b><i>Streptococcus oralis</i></b>	<b>9</b>	<b>30,00%</b>	<b>11</b>	<b>36,67%</b>	<b>8</b>	<b>26,67%</b>
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	2	6,67%	2	6,67%	2	6,67%
<i>Streptococcus salivarius</i>	4	13,33%	4	13,33%	4	13,33%
<i>Streptococcus vestibularis</i>	0	0,00%	0	0,00%	1	3,33%

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално у односу на број узорак у групи (n=30)

У табели 48 и 49 приказана је квалитативна заступљеност факултативно анаеробних бактерија на Петријевим шољама детектованим на различитој удаљености од усне

дупље пацијента (радно поље) током брушења зуба са субгингивалном и еквигингивалном позицијом демаркације препарације.

**Табела 48.** Заступљеност колонија факултативно анаеробних микроорганизама на Петријевим шољама 20, 40 и 60 cm удаљености у односу на радно поље у Г1 (CFU/Петријева шоља).

CFU факултативних анаероба	Удаљеност Петријева шоље					
	20 cm		40 cm		60 cm	
<i>Aerococcus urinae</i>	1	3,33%	0	0,00%	1	3,33%
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	6,67%	2	6,67%	2	6,67%
<b><i>Haemophilus parainfluanzae</i></b>	<b>7</b>	<b>23,33%</b>	<b>6</b>	<b>20,00%</b>	<b>7</b>	<b>23,33%</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>E. coli</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Klebsiella pneumonia</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Klebsiella spp.</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Pediococcus spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<b><i>Streptococcus sanguinis</i></b>	<b>6</b>	<b>20,00%</b>	<b>4</b>	<b>13,33%</b>	<b>3</b>	<b>10,00%</b>

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално у односу на број узорака у групи (n=30)

**Табела 49.** Заступљеност колонија факултативно анаеробних микроорганизама на Петријевим шољама 20, 40 и 60 cm удаљености у односу на радно поље у Г2 (CFU/Петријева шоља).

CFU факултативних анаероба	Удаљеност Петријева шоље					
	20 cm		40 cm		60 cm	
<i>Aerococcus urinae</i>	2	6,67%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	3,33%	1	3,33%	1	3,33%
<b><i>Haemophilus parainfluanzae</i></b>	<b>7</b>	<b>23,33%</b>	<b>5</b>	<b>16,67%</b>	<b>5</b>	<b>16,67%</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	3,33%	1	3,33%	2	6,67%
<i>E. coli</i>	1	3,33%	1	3,33%	0	0,00%
<i>Klebsiella pneumonia</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Klebsiella spp.</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Pediococcus spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<b><i>Streptococcus sanguinis</i></b>	<b>5</b>	<b>16,67%</b>	<b>5</b>	<b>16,67%</b>	<b>4</b>	<b>13,33%</b>

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално у односу на број узорака у групи (n=30)

У обе испитиване групе процентуално, у односу на број узорака, најзаступљенији су налази *Haemophilus parainfluenzae* чије је присуство релативно константно на свим локацијама Петријевих шоља, након чега по заступљености следи *Streptococcus sanguinis*.

У табели 50 и 51 приказана је квалитативна заступљеност колонија аеробних микроорганизама на Петријевим шољама детектованим на различитој удаљености од усне дупље пацијента (радно поље) током брушења зуба са субгингивалном и еквингивалном позицијом демаркације препарације.

У Г1 гледано процентуално, у односу на укупан број колонија аеробних микроорганизама у Петријевим шољама на 20 и 40 cm, најзаступљеније су колоније *Neisseria spp*, а издвајају се по заступљености и колоније *Staphylococcus epidermidis*-а који је у овом смислу најзаступљенији на Петријевим шољама на 60 cm удаљености од места препарације зуба.

У Г2 гледано процентуално, у односу на укупан број колонија аеробних микроорганизама у Петријевим шољама на свим удаљеностима, најзаступљеније су колоније *Streptococcus oralis*-а, а следе *Neisseria spp*. и *Streptococcus intermedius*.

У табелама 52 и 53 приказана је квалитативна заступљеност колонија факултативно анаеробних микроорганизама на Петријевим шољама детектованим на различитој удаљености од усне дупље пацијента (радно поље) током брушења зуба са субгингивалном и еквингивалном позицијом демаркације препарације.

У Г1 гледано процентуално, у односу на укупан број колонија факултативно анаеробних бактерија на Петријевим шољама на свим позицијама, најзаступљеније су колоније *Haemophilus parainfluenzae*, а иза њих следе колоније *Streptococcus sanguinis*. Интересантно је да процентуална заступљеност колонија *Haemophilus parainfluenzae* расте са удаљеношћу Петријевих шоља, док у случају *Streptococcus sanguinis* опада.

У Г2 гледано процентуално, у односу на укупан број колонија факултативно анаеробних бактерија у Петријевим шољама на 40 и 60 cm удаљености, апсолутно доминирају колоније *Haemophilus parainfluenzae*. На Петријевим шољама на 20 cm удаљености, у односу на *Haemophilus parainfluenzae*, нешто су више процентуалне заступљености *Streptococcus sanguinis*-а и *Aerococcus urinae*.

**Табела 50.** Заступљеност колонија аеробних микроорганизама на Петријевим шољама у односу на укупан број колонија на удаљености 20, 40 и 60 cm у односу на радно поље у Г1 (CFU/Петријева шоља).

CFU аеробних микроорганизама	Удаљеност Петријева шоље					
	20 cm		40 cm		60 cm	
<i>Branchamella catarrhalis</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Candida spp.</i>	12	0,19%	3	0,21%	0	0,00%
<i>Corynebacterium spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	3	0,59%
Gram negativni bacili	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Gram pozitivni bacili	100	1,55%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Moraxella catarrhalis</i>	55	0,85%	10	0,71%	8	1,56%
<i>Moraxella spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	3	0,59%
<i>Neisseria elongata</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Neisseria flavescens</i>	20	0,31%	10	0,71%	5	0,98%
<i>Neisseria sicca</i>	0	0,00%	6	0,43%	0	0,00%
<b><i>Neisseria spp</i></b>	<b>1218</b>	<b>18,93%</b>	<b>322</b>	<b>22,89%</b>	<b>45</b>	<b>8,79%</b>
<i>Neisseria subflava</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Staphylococcus aureus</i>	195	3,03%	35	2,49%	19	3,71%
<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>	<b>831</b>	<b>12,91%</b>	<b>191</b>	<b>13,57%</b>	<b>122</b>	<b>23,83%</b>
<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>	8	0,12%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus agalactiae</i> (BHS grupe B)	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus alfa haemolyticus</i>	340	5,28%	66	4,69%	0	0,00%
<i>Streptococcus anginosus</i>	556	8,64%	102	7,25%	25	4,88%
<i>Streptococcus cristatus</i>	500	7,77%	100	7,11%	30	5,86%
<b><i>Streptococcus intermedius</i></b>	<b>1000</b>	<b>15,54%</b>	<b>131</b>	<b>9,31%</b>	<b>88</b>	<b>17,19%</b>
<i>Streptococcus oralis</i>	710	11,03%	220	15,64%	74	14,45%
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	0	0,00%	5	0,36%	12	2,34%
<i>Streptococcus salivarius</i>	160	2,49%	40	2,84%	15	2,93%
<i>Streptococcus vestibularis</i>	730	11,34%	166	11,80%	63	12,30%
УКУПНО	6435	100,00%	1407	100,00%	512	100,00%

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално у односу на број узорака у групи (n=30)

**Табела 51.** Заступљеност колонија аеробних микроорганизама на Петријевим шољама у односу на укупан број колонија на удаљености 20, 40 и 60 cm у односу на радно поље у Г2 (CFU/Петријева шоља).

CFU аеробних микроорганизама	Удаљеност Петријева шоље					
	20 cm		40 cm		60 cm	
<i>Branchamella catarrhalis</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Candida spp.</i>	22	0,34%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Corynebacterium spp</i>	0	0,00%	16	1,55%	3	0,81%
Gram negativni bacili	0	0,00%	0	0,00%	12	3,24%
Gram pozitivni bacili	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35	0,55%	7	0,68%	6	1,62%
<i>Moraxella spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Neisseria elongata</i>	50	0,78%	10	0,97%	2	0,54%
<i>Neisseria flavescens</i>	45	0,70%	20	1,94%	8	2,16%
<i>Neisseria sicca</i>	0	0,00%	6	0,58%	0	0,00%
<b><i>Neisseria spp</i></b>	<b>1030</b>	<b>16,08%</b>	<b>159</b>	<b>15,45%</b>	<b>68</b>	<b>18,38%</b>
<i>Neisseria subflava</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	0,55%	17	1,65%	19	5,14%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	731	11,41%	87	8,45%	43	11,62%
<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus agalactiae</i> (BHS групе B)	90	1,41%	15	1,46%	0	0,00%
<i>Streptococcus alfa haemolyticus</i>	690	10,77%	6	0,58%	0	0,00%
<i>Streptococcus anginosus</i>	6	0,09%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus cristatus</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<b><i>Streptococcus intermedius</i></b>	<b>830</b>	<b>12,96%</b>	<b>85</b>	<b>8,26%</b>	<b>48</b>	<b>12,97%</b>
<b><i>Streptococcus oralis</i></b>	<b>2410</b>	<b>37,63%</b>	<b>431</b>	<b>41,89%</b>	<b>97</b>	<b>26,22%</b>
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	200	3,12%	80	7,77%	40	10,81%
<i>Streptococcus salivarius</i>	230	3,59%	90	8,75%	20	5,41%
<i>Streptococcus vestibularis</i>	0	0,00%	0	0,00%	4	1,08%
УКУПНО	6404	100,00%	1029	100,00%	370	100,00%

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално у односу на број узорка у групи (n=30)

**Табела 52.** Заступљеност колонија факултативно анаеробних микроорганизама на Петријевим шољама у односу на укупан број колонија на удаљености 20, 40 и 60 cm у односу на радно поље у Г1 (CFU/Петријева шоља).

CFU факултативних анаероба	Удаљеност Петријево шоље					
	20 cm		40 cm		60 cm	
<i>Aerococcus urinae</i>	500	22,71%	0	0,00%	10	1,38%
<i>Haemophilus influenzae</i>	30	1,36%	20	1,67%	13	1,79%
<b><i>Haemophilus parainfluanzae</i></b>	<b>990</b>	<b>44,96%</b>	<b>920</b>	<b>76,92%</b>	<b>673</b>	<b>92,70%</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Escherichia coli</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Klebsiella pneumonia</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Klebsiella spp.</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Pediococcus spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<b><i>Streptococcus sanguinis</i></b>	<b>682</b>	<b>30,97%</b>	<b>256</b>	<b>21,40%</b>	<b>30</b>	<b>4,13%</b>
Укупно	2202	100,00%	1196	100,00%	726	100,00%

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално  
у односу на број узорак у групи (n=30)

**Табела 53.** Заступљеност колонија факултативно анаеробних микроорганизама на Петријевим шољама у односу на укупан број колонија на удаљености 20, 40 и 60 cm односу на радно поље у Г2 (CFU/Петријева шоља).

CFU факултативних анаероба	Удаљеност Петријево шоље					
	20 cm		40 cm		60 cm	
<i>Aerococcus urinae</i>	1000	30,49%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Haemophilus influenzae</i>	10	0,30%	10	2,21%	10	6,25%
<b><i>Haemophilus parainfluanzae</i></b>	<b>840</b>	<b>25,61%</b>	<b>370</b>	<b>81,86%</b>	<b>128</b>	<b>80,00%</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	400	12,20%	15	3,32%	8	5,00%
<i>Escherichia coli</i>	20	0,61%	1	0,22%	0	0,00%
<i>Klebsiella pneumonia</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Klebsiella spp.</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Pediococcus spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<b><i>Streptococcus sanguinis</i></b>	<b>1010</b>	<b>30,79%</b>	<b>56</b>	<b>12,39%</b>	<b>14</b>	<b>8,75%</b>
Укупно	3280	100,00%	452	100,00%	160	100,00%

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално  
у односу на број узорак у групи (n=30)



#### 5.7.4. РЕЗУЛТАТИ КВАЛИТАТИВНЕ ДИСТРИБУЦИЈЕ КОЛОНИЈА У ОРАЛНОЈ СРЕДИНИ ПРЕ И ПОСЛЕ БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ

У табелама 54 и 55 приказана је заступљеност налаза колонија аеробних микроорганизама у контролном, и брисевима у предвиђеним опсервационим интервалима, у групама са субгингивалном и еквингивалном позицијом демаркације препарације.

У Г1 гледано процентуално, у односу на број узорака, најзаступљенији су налази *Neisseria spp*, чије је присуство релативно константно и у контролном и брисевима у осталим опсервационим интервалима. Као следећи микроорганизам који се издваја је *Streptococcus intermedius*.

У Г2 процентуално, у односу на број узорака, најзаступљенији су налази *Neisseria spp*, а следе, иако доста ниже заступљености, налази *Streptococcus oralis*-а и *Streptococcus intermedius*-а. Присуство свих микроорганизама је релативно стабилно у контролном и брисевима у осталим опсервационим интервалима.

У табелама 56 и 57 приказана је заступљеност налаза колонија факултативно анаеробних бактерија у контролном, и брисевима у предвиђеним опсервационим интервалима, у групама са субгингивалном и еквингивалном позицијом демаркације препарације.

У обе групе, у односу на број узорака, процентуално су најзаступљенији позитивни налази колонија *Haemophilus parainflanzae*, а иако знатно ниже заступљености следе налази *Streptococcus sanguinis*-а.

У табелама 58 и 59 приказана је заступљеност колонија аеробних микроорганизама у контролном, и брисевима у предвиђеним опсервационим интервалима, у односу на укупан број колонија, у групама са субгингивалном и еквингивалном позицијом демаркације препарације.

У Г1 преовлађују колоније *Streptococcus intermedius*-а у контролном брису, након 15 минута и након 24 h, док је други микроорганизам по заступљености *Neisseria spp*, више заступљености 72 h након препарације.

У Г2 процентуално је слична заступљеност микроорганизама, али у односу на остале колоније више су заступљене *Streptococcus oralis*-а, *Streptococcus intermedius*-а и *Neisseria spp*.

**Табела 54.** Заступљеност позитивних налаза аеробних микроорганизама у контролном и брисевима у опсервационим интервалима у Г1 (CFU/Петријева шоља).

CFU аеробних микроорганизама	Брис							
	Kontrola		15 min		24 h		72 h	
<i>Branchamella catarrhalis</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Candida spp.</i>	2	6,67%	4	13,33%	3	10,00%	4	13,33%
<i>Corynebacterium spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Gram negativni bacili	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Gram pozitivni bacili	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Moraxella catarrhalis</i>	3	10,00%	3	10,00%	3	10,00%	3	10,00%
<i>Moraxella spp</i>	1	3,33%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Neisseria elongata</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Neisseria flavescens</i>	1	3,33%	1	3,33%	1	3,33%	1	3,33%
<i>Neisseria sicca</i>	1	3,33%	1	3,33%	1	3,33%	1	3,33%
<b><i>Neisseria spp</i></b>	<b>21</b>	<b>70,00%</b>	<b>18</b>	<b>60,00%</b>	<b>20</b>	<b>66,67%</b>	<b>23</b>	<b>76,67%</b>
<i>Neisseria subflava</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	13,33%	2	6,67%	3	10,00%	4	13,33%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	16,67%	4	13,33%	2	6,67%	3	10,00%
<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>	1	3,33%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus agalactiae</i> (BHS групе В)	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus alfa haemolyticus</i>	2	6,67%	4	13,33%	8	26,67%	9	30,00%
<i>Streptococcus anginosus</i>	3	10,00%	2	6,67%	3	10,00%	3	10,00%
<i>Streptococcus cristatus</i>	2	6,67%	2	6,67%	2	6,67%	2	6,67%
<b><i>Streptococcus intermedius</i></b>	<b>10</b>	<b>33,33%</b>	<b>8</b>	<b>26,67%</b>	<b>7</b>	<b>23,33%</b>	<b>7</b>	<b>23,33%</b>
<i>Streptococcus oralis</i>	4	13,33%	5	16,67%	5	16,67%	4	13,33%
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1	3,33%	3	10,00%	2	6,67%	2	6,67%
<i>Streptococcus salivarius</i>	3	10,00%	3	10,00%	3	10,00%	3	10,00%
<i>Streptococcus vestibularis</i>	3	10,00%	4	13,33%	1	3,33%	1	3,33%

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално  
у односу на број узорак у групи (n=30)

**Табела 55.** Заступљеност позитивних налаза аеробних микроорганизама у контролном и брисевима у опсервационим интервалима у Г2 (CFU/Петријева шоља).

CFU аеробних микроорганизама	Брис							
	Контрола		15 мин.		24 h		72 h	
<i>Branchamella catarrhalis</i>	0	0,00%	1	3,33%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Candida spp.</i>	2	6,67%	6	20,00%	5	16,67%	4	13,33%
<i>Corynebacterium spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Gram negativni bacili	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Gram pozitivni bacili	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2	6,67%	2	6,67%	2	6,67%	2	6,67%
<i>Moraxella spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Neisseria elongata</i>	2	6,67%	1	3,33%	1	3,33%	1	3,33%
<i>Neisseria flavescens</i>	1	3,33%	1	3,33%	1	3,33%	1	3,33%
<i>Neisseria sicca</i>	1	3,33%	1	3,33%	1	3,33%	1	3,33%
<b><i>Neisseria spp</i></b>	<b>20</b>	<b>66,67%</b>	<b>19</b>	<b>63,33%</b>	<b>20</b>	<b>66,67%</b>	<b>21</b>	<b>70,00%</b>
<i>Neisseria subflava</i>	1	3,33%	1	3,33%	1	3,33%	1	3,33%
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	10,00%	2	6,67%	3	10,00%	4	13,33%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	16,67%	5	16,67%	1	3,33%	2	6,67%
<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus agalactiae</i> (BHS групе В)	3	10,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus alfa haemolyticus</i>	1	3,33%	3	10,00%	7	23,33%	6	20,00%
<i>Streptococcus anginosus</i>	1	3,33%	0	0,00%	1	3,33%	1	3,33%
<i>Streptococcus cristatus</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<b><i>Streptococcus intermedius</i></b>	<b>8</b>	<b>26,67%</b>	<b>6</b>	<b>20,00%</b>	<b>6</b>	<b>20,00%</b>	<b>7</b>	<b>23,33%</b>
<b><i>Streptococcus oralis</i></b>	<b>8</b>	<b>26,67%</b>	<b>8</b>	<b>26,67%</b>	<b>8</b>	<b>26,67%</b>	<b>7</b>	<b>23,33%</b>
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	2	6,67%	2	6,67%	2	6,67%	2	6,67%
<i>Streptococcus salivarius</i>	4	13,33%	4	13,33%	4	13,33%	3	10,00%
<i>Streptococcus vestibularis</i>	0	0,00%	1	3,33%	0	0,00%	0	0,00%

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално  
у односу на број узорак у групи (n=30)

**Табела 56.** Заступљеност позитивних налаза факултативно анаеробних микроорганизама у контролном и брисевима у опсервационим интервалима у Г1 (CFU/Петријева шоља).

CFU факултативних анаероба	Брис							
	Контрола		15 мин.		24 h		72 h	
<i>Aerococcus urinae</i>	1	3,33%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	6,67%	2	6,67%	1	3,33%	1	3,33%
<b><i>Haemophilus parainfluenzae</i></b>	<b>21</b>	<b>70,00%</b>	<b>24</b>	<b>80,00%</b>	<b>23</b>	<b>76,67%</b>	<b>24</b>	<b>80,00%</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Escherichia coli</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Klebsiella pneumonia</i>	1	3,33%	1	3,33%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Klebsiella spp.</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Pediococcus spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<b><i>Streptococcus sanguinis</i></b>	<b>6</b>	<b>20,00%</b>	<b>8</b>	<b>26,67%</b>	<b>5</b>	<b>16,67%</b>	<b>4</b>	<b>13,33%</b>

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално у односу на број узорака у групи (n=30)

**Табела 57.** Заступљеност позитивних налаза факултативно анаеробних микроорганизама у контролном и брисевима у опсервационим интервалима у Г2 (CFU/Петријева шоља).

CFU факултативних анаероба	Брис							
	Контрола		15 мин.		24 h		72 h	
<i>Aerococcus urinae</i>	0	0,00%	2	6,67%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	6,67%	2	6,67%	1	3,33%	1	3,33%
<b><i>Haemophilus parainfluenzae</i></b>	<b>17</b>	<b>56,67%</b>	<b>21</b>	<b>70,00%</b>	<b>21</b>	<b>70,00%</b>	<b>21</b>	<b>70,00%</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0,00%	1	3,33%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Escherichia coli</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Klebsiella pneumonia</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Klebsiella spp.</i>	3	10,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Pediococcus spp</i>	2	6,67%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<b><i>Streptococcus sanguinis</i></b>	<b>6</b>	<b>20,00%</b>	<b>6</b>	<b>20,00%</b>	<b>5</b>	<b>16,67%</b>	<b>6</b>	<b>20,00%</b>

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално у односу на број узорака у групи (n=30)

**Табела 58.** Заступљеност колонија аеробних микроорганизама у контролном и брисевима у опсервационим интервалима у односу на укупан број колонија у Г1 (CFU/Петријева шоља).

CFU аеробних микроорганизама	Брис							
	Контрола		15 min		24 h		72 h	
<i>Branchamella catarrhalis</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Candida spp.</i>	30	0,16%	184	1,00%	150	0,79%	175	0,84%
<i>Corynebacterium spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Gram negativni bacili	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Gram pozitivni bacili	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Moraxella catarrhalis</i>	85	0,44%	90	0,49%	130	0,68%	250	1,21%
<i>Moraxella spp</i>	20	0,10%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Neisseria elongata</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Neisseria flavescens</i>	100	0,52%	80	0,43%	90	0,47%	100	0,48%
<i>Neisseria sicca</i>	500	2,61%	500	2,72%	500	2,62%	500	2,41%
<b><i>Neisseria spp</i></b>	<b>3628</b>	<b>18,90%</b>	<b>3080</b>	<b>16,74%</b>	<b>2906</b>	<b>15,24%</b>	<b>3802</b>	<b>18,34%</b>
<i>Neisseria subflava</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Staphilococcus aureus</i>	1040	5,42%	60	0,33%	125	0,66%	240	1,16%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	260	1,35%	540	2,93%	520	2,73%	160	0,77%
<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>	30	0,16%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus agalactiae</i> (BHS групе B)	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus alfa haemolyticus</i>	1000	5,21%	2000	10,87%	4000	20,97%	4500	21,71%
<i>Streptococcus anginosus</i>	1500	7,82%	1000	5,43%	1030	5,40%	1500	7,24%
<i>Streptococcus cristatus</i>	1000	5,21%	1000	5,43%	1000	5,24%	1000	4,82%
<b><i>Streptococcus intermedius</i></b>	<b>5000</b>	<b>26,05%</b>	<b>4000</b>	<b>21,74%</b>	<b>3500</b>	<b>18,35%</b>	<b>3500</b>	<b>16,89%</b>
<i>Streptococcus oralis</i>	1800	9,38%	1820	9,89%	2120	11,12%	2000	9,65%
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	200	1,04%	1500	8,15%	1000	5,24%	1000	4,82%
<i>Streptococcus salivarius</i>	1500	7,82%	1500	8,15%	1500	7,87%	1500	7,24%
<i>Streptococcus vestibularis</i>	1500	7,82%	1048	5,70%	500	2,62%	500	2,41%
<b>Укупно</b>	<b>19193</b>	<b>100,00%</b>	<b>18402</b>	<b>100,00%</b>	<b>19071</b>	<b>100,00%</b>	<b>20727</b>	<b>100,00%</b>

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално у односу на број узорака у групи (n=30)

**Табела 59.** Заступљеност колонија аеробних микроорганизама у контролном и брисевима у опсервационим интервалима у односу на укупан број колонија у Г2 (CFU/Петријева шоља).

CFU аеробних микроорганизама	Брис							
	Контрола		15 min		24 h		72 h	
<i>Branchamella catarrhalis</i>	0	0,00%	12	0,07%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Candida spp.</i>	120	0,68%	245	1,44%	210	1,05%	195	1,08%
<i>Corynebacterium spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Gram negativni bacili	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Gram pozitivni bacili	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Moraxella catarrhalis</i>	70	0,40%	70	0,41%	100	0,50%	150	0,83%
<i>Moraxella spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Neisseria elongata</i>	22	0,12%	40	0,23%	500	2,51%	400	2,22%
<i>Neisseria flavescens</i>	100	0,57%	80	0,47%	90	0,45%	100	0,56%
<i>Neisseria sicca</i>	500	2,83%	500	2,93%	500	2,51%	500	2,78%
<b><i>Neisseria spp</i></b>	<b>3824</b>	<b>21,63%</b>	<b>3520</b>	<b>20,64%</b>	<b>3970</b>	<b>19,92%</b>	<b>2840</b>	<b>15,79%</b>
<i>Neisseria subflava</i>	500	2,83%	20	0,12%	400	2,01%	500	2,78%
<i>Staphilococcus aureus</i>	540	3,05%	60	0,35%	125	0,63%	240	1,33%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	170	0,96%	810	4,75%	500	2,51%	60	0,33%
<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus agalactiae</i> (BHS групе B)	30	0,17%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Streptococcus alfa haemolyticus</i>	500	2,83%	1500	8,79%	3500	17,57%	3000	16,68%
<i>Streptococcus anginosus</i>	500	2,83%	0	0,00%	30	0,15%	500	2,78%
<i>Streptococcus cristatus</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<b><i>Streptococcus intermedius</i></b>	<b>4000</b>	<b>22,63%</b>	<b>3000</b>	<b>17,59%</b>	<b>3000</b>	<b>15,06%</b>	<b>3500</b>	<b>19,46%</b>
<b><i>Streptococcus oralis</i></b>	<b>3800</b>	<b>21,50%</b>	<b>3700</b>	<b>21,69%</b>	<b>4000</b>	<b>20,08%</b>	<b>3500</b>	<b>19,46%</b>
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1000	5,66%	1000	5,86%	1000	5,02%	1000	5,56%
<i>Streptococcus salivarius</i>	2000	11,31%	2000	11,73%	2000	10,04%	1500	8,34%
<i>Streptococcus vestibularis</i>	0	0,00%	500	2,93%	0	0,00%	0	0,00%
Укупно	17676	100,00%	17057	100,00%	19925	100,00%	17985	100,00%

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално  
у односу на број узорака у групи (n=30)

У табелама 60 и 61 приказана је заступљеност колонија факултативно анаеробних микроорганизама у контролном и брисевима у предвиђеним опсервационим интервалима, у односу на укупан број колонија, у групама са субгингивалном и еквигингивалном позицијом демаркације препарације.

У обе групе, у односу на укупан број колонија, процентуално су најзаступљенији налази колонија *Haemophilus parainfluanzae*, а иако знатно ниже заступљености следе колоније *Streptococcus sanguinis*-а.

**Табела 60.** Заступљеност колонија факултативно анаеробних микроорганизама у контролном и брисевима у опсервационим интервалима у односу на укупан број колонија у Г1 (CFU/Петријева шоља).

CFU факултативних анаероба	Брис							
	Контрола		15 min		24 h		72 h	
<i>Aerococcus urinae</i>	500	6,16%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Haemophilus influenzae</i>	150	1,85%	170	2,34%	170	2,34%	70	1,30%
<b><i>Haemophilus parainfluanzae</i></b>	<b>4450</b>	<b>54,84%</b>	<b>3920</b>	<b>54,05%</b>	<b>3920</b>	<b>54,05%</b>	<b>3300</b>	<b>61,45%</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Escherichia coli</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Klebsiella pneumonia</i>	14	0,17%	2	0,03%	2	0,03%	0	0,00%
<i>Klebsiella spp.</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Pediococcus spp</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<b><i>Streptococcus sanguinis</i></b>	<b>3000</b>	<b>36,97%</b>	<b>3160</b>	<b>43,57%</b>	<b>3160</b>	<b>43,57%</b>	<b>2000</b>	<b>37,24%</b>
Укупно	8114	100,00%	7252	100,00%	7252	100,00%	5370	100,00%

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално у односу на број узорака у групи (n=30)

**Табела 61.** Заступљеност колонија факултативно анаеробних микроорганизама у контролном и брисевима у опсервационим интервалима у односу на укупан број колонија у Г2 (CFU/Петријева шоља).

CFU факултативних анаероба	Брис							
	Контрола		15 min		24 h		72 h	
<i>Aerococcus urinae</i>	0	0,00%	1000	14,41%	0,00%	0	0,00%	
<i>Haemophilus influenzae</i>	150	1,83%	170	2,45%	75	1,46%	70	1,32%
<b><i>Haemophilus parainfluenzae</i></b>	<b>4060</b>	<b>49,42%</b>	<b>2742</b>	<b>39,50%</b>	<b>2570</b>	<b>49,95%</b>	<b>2230</b>	<b>42,08%</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0,00%	30	0,43%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Escherichia coli</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Klebsiella pneumonia</i>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Klebsiella spp.</i>	6	0,07%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Pediococcus spp</i>	1000	12,17%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<b><i>Streptococcus sanguinis</i></b>	<b>3000</b>	<b>36,51%</b>	<b>3000</b>	<b>43,22%</b>	<b>2500</b>	<b>48,59%</b>	<b>3000</b>	<b>56,60%</b>
Укупно	8216	100,00%	6942	100,00%	5145	100,00%	5300	100,00%

Заступљеност је дата апсолутним бројевима и процентуално  
у односу на број узорака у групи (n=30)



## **6. ДИСКУСИЈА**

### **6.1. ДИСКУСИЈА ПРОМЕНА КЛИНИЧКИХ ПАРАМЕТАРА ИНФЛАМАЦИЈЕ ГИНГИВЕ НАКОН БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ**

Велики број параметара, као што су естетика, адекватна функција и оклузија, маргинални руб гингиве, позиција демаркације препарације и здравље гингиве и дубљих ткива пародонта, утиче на успех фиксне протетске терапије (275, 276). Субгингивална позиција демаркације може утицати на инфламацију ткива гингиве и пародонта, због чега је неопходно поштовање обима биолошке ширине приликом брушења зуба и припреме за прихватање фиксне протетске конструкције (277). Честа компликација везана за позицију демаркације препарације је апикална миграција гингиве, углавном као последица трауме током брушења зуба, јатрогене хроничне инфламације ткива и лошег квантитативног и квалитативног састава гингиве (278).

Као резултат оштећења епителног припоја гингиве могу настати крварење при сондирању, инфламација гингиве, хиперплазија гингивалног ткива, губитак епителног припоја, последични губитак коштаног ткива и формирање пародонталних џепова (279). Bertoldi и сар. у истраживању клиничког утицаја субгингивално позиционираних дубоких композитних рестаурација, уз поштовање биолошке ширине, доказују значајно смањење количине оралног биофилма, крварења гингиве и дубине сондирања након периода од 3 месеца у односу на период пре израде испуна. Степен инфламације гингиве интактног дела зуба и субгингивалне рестаурације био је сличан (280). Хистолошким испитивањем присутног инфилтрата доказано је да је степен инфламаторног одговора гингиве био сличног интензитета око субгингивалних рестаурација и ткива гингиве без рестаурација. Истраживања ове групе аутора доказују да је субгингивално позиционирана рестаурација са поштовањем простора биолошке ширине комплементарна са здравим гингивалним ткивом око природног зуба (280).

У случају протетских рестаурација, резултати досадашњих истраживања закључују да је степен инфламације гингиве у корелацији са близином маргиналног руба вештачке крунице и епителног припоја гингивалног ткива (281).

Са овом врстом испитивања кренуло се још половином прошлог века, са закључком да се инфламација јавља без обзира на позицију демаркације препарације (282). Marcum је хистолошком анализом ткива гингиве паса утврдио најјачи запаљенски одговор кад је демаркација препарације близу алвеоларној кости (282). Newcomb је 1974. године објавио истраживање о повезаности субгингивалне позиције демаркације препарације и настанка инфламаторних промена на гингиви (283). Silness је уочио да је гингива око вештачких круница са супрагингивалном позицијом руба мање инфламирана у односу на субгингивалну демаркацију препарације (284). Са друге стране, постоји опсег индикација (ранија препарација, каријес у врату зуба, хиперосетљивост дентина, кратке клиничке круне) када је субгингивална демаркација препарације неопходна.

У овом истраживању испитиван је утицај позиције демаркације препарације на клиничке и лабораторијске параметре инфламације гингиве. Истраживање се базирало на испитивању две позиције демаркације препарације зуба облика полужлеба за израду металокерамичке крунице, са потенцијалним штетним дејством на ткиво гингиве, које су међусобно поређене. Време брушења зуба износило је 15 минута, с обзиром да је то просечно време потребно за брушење једног зуба. Испитаници код којих су брушени зуби са демаркацијом препарације позициониране субгингивално чинили су групу 1, док су групу 2 чинили испитаници са демаркацијом препарације позициониране еквигингивално.

Контролну групу чинили су испитивани параметри пре брушења зуба, док су експерименталне групе чинили испитивани параметри у три временска интервала (15 минута, 24 и 72 часа) након почетка брушења зуба.

Како би се добили релевантни закључци о утицају саме позиције демаркације препарације зуба на ткиво гингиве, одрађена је базична терапија пародонтопатије и пре брушења зуба доказано је одсуство инфламације и оштећења ткива гингиве код свих испитаника. Пре почетка израде протетског рада и пре брушења зуба код свих испитаника одређени су клинички параметри здравља ткива пародонта применом *CPITN* индекса, чиме су сви испитаници доведени на нулту полазну тачку. Настале промене гингиве које су пратиле опсервациони период резултат су искључиво утицаја брушења зуба са различитом позицијом демаркације препарације на ткиво.

Одређивањем *CPITN* индекса пре почетка брушења није добијена статистички значајна разлика између група.

За клиничку процену здравља гингиве одређивани су ГИ и ИКРВ у сва четири опсервациона интервала. Испитивани индекси указали су на одсуство инфламације пре

брушења зуба за обе испитиване групе. Контролне вредности ГИ биле су 0 код оба типа демаркације препарације, док су статистички значајно више вредности ГИ добијене у обе експерименталне групе у сва три опсервациона интервала ( $p < 0,001$ ).

Највише вредности ГИ добијене су одмах након брушења зуба, са нижим вредностима у осталим опсервационим интервалима након брушења зуба, што указује на постепено оздрављење ткива гингиве и реверзibilни ток инфламације.

У целокупном периоду испитивања уочене су велике промене ГИ које указују да брушење зуба недвосмислено утиче на ткиво гингиве. Поређењем контролних вредности ГИ са свим експерименталним вредностима након брушења зуба (ГИ2, ГИ3, ГИ4) присутне су више вредности у Г1 у односу на Г2, са статистички значајним разликама за интервал непосредно након брушења зуба ( $p < 0,001$ ) и интервал након 24 h од почетка брушења ( $p < 0,05$ ), док статистички значајна разлика није примећена у последњем опсервационом интервалу након 72 h.

Више вредности ГИ добијене код субгингивалне демаркације (0,88) у односу на еквигингивалну демаркацију (0,63) указују на већи инфламаторни ефекат брушења зуба са субгингивалном позицијом, што је у позитивној корелацији са резултатима других аутора.

Код оба типа демаркације међусобним поређењем ГИ након брушења зуба понаособ (одређиване у опсервационим интервалима) утврђене су статистички значајне разлике између свих вредности ( $p < 0,001$ ) изузев код еквигингивалне демаркације између ГИ2 и ГИ3 са статистички нижом значајношћу ( $p < 0,05$ ).

Аналогни резултати добијени су код одређивања ИКРВ пре и након брушења зуба. Код обе позиције демаркације иницијалне вредности пре брушења износиле су 0. Највише вредности ИКРВ су одмах након брушења, док су вредности у наредним опсервационим интервалима ниже, што указује на оздрављење ткива гингиве са временом.

Статистички значајно више вредности обе испитиване групе демаркације утврђене су у сва три опсервациона интервала (ИКРВ2, ИКРВ3, ИКРВ4) у односу на контролу са значајношћу  $p < 0,001$ , осим у Г2 са нижом значајношћу за четврти опсервациони интервал  $p < 0,05$ .

Вредности ИКРВ су статистички значајно више у Г1 у односу на Г2 у студијским узорцима (ИКРВ2, ИКРВ3, и ИКРВ4) са максималним нивоом значајности непосредно након брушења зуба ( $p < 0,001$ ), и присутном значајношћу  $p < 0,05$  код интервала 24 h и 72 h након брушења.

Код оба испитивана типа демаркације у студијским узорцима ИКРВ утврђене су статистички значајне разлике током испитиваног периода ( $p < 0,001$ ), који је за ИКРВ исти код оба типа демаркације што недвосмислено указује на велики ефекат брушења зуба на промену ИКРВ са временом.

Резултати дисертације потврдили су закључке претходно урађене пилот студије. У резултатима пилот студије вредности ГИ и ИКРВ код пацијената са субгингивалном позицијом демаркације препарације зуба у првом опсервационом интервалу (пре почетка брушења зуба) биле су 0. Вредности су биле највише непосредно након брушења зуба што је указало на умерену инфламацију гингиве, са постепеним опадањем након 24 h и 72 h. У свим опсервационим интервалима након брушења зуба вредности гингивалних индекса биле су статистички значајно веће. Такође, у трећем и четвртом опсервационом интервалу (24 h и 72 h) вредности одређиваних параметара су биле статистички значајно ниже у односу на други опсервациони интервал (након 15 минута).

Добијени резултати су у позитивној корелацији са налазима других аутора који су веће вредности оба испитивана индекса уочили након брушења зуба. Сви добијени закључци иду у прилог теорији да су промене на гингивалном ткиву настале због механичке повреде (285, 286).

Веће вредности ГИ и ИКРВ добијене су у случају сугбингивалне позиције демаркације препарације зуба у поређењу са здравим контролним параметрима гингиве. Такође су доказане веће вредности поменутих индекса код субгингивалне позиције границе брушења зуба у облику линије, у односу на демаркацију облика полужлеба (287).

Уколико је позиција руба крунице смештена дубље у гингивалном сулкусу, инфламација гингиве је већа, што је у студији Newcomb потврђено мерењем гингивалних индекса (283). Постоји позитивна корелација између запаљења гингиве и удаљености ивице вештачке крунице од ивице алвеоларне кости. Зато је маргинални руб крунице потребно сместити у простору биолошке ширине гингиве, што даље од ивице алвеоларне кости (око 0,5 mm у гингивалном сулкусу) (283).

Двадесетшестогодишња студија која се бавила испитивањем клиничких параметара инфламације, као што су гингивални индекси, плак индекс, степен гингивалне рецесије, показала је да су оштећења пародонта присутнија код субгингивалних рестаурација, позиционираних испод ивице гингиве на удаљености већој од 1mm, у односу на растојање мање од 1mm или зубе без рестаурација (288). Иста студија је праћењем промена ткива у трајању од три године доказала губитак епителног припоја, код субгингивалне позиције рестаурација (288).

Субгингивална позиција демаркације препарације може бити узрок пролонгираног оштећења гингивалног и пародонталног ткива. У петнаестогодишњем истраживању доказано је присуство већих вредности ГИ и ИКРВ при сондирању код испитаника са фиксним конструкцијама у поређењу са испитаницима са природним зубима. Такође, вредност ГИ од 2 и 3 била је чешћа код субгингивалне, у односу на друге позиције демаркације (289).

Јатрогена оштећења гингиве могу бити узрокована и другим фазама у изради фиксне протетске конструкције. Велики број аутора бавио се истраживањем штетног утицаја брушења, ретракционих процедура и отискивања на инфламацију гингиве (290, 291). Акса и сар. су доказали потпуно оздрављење гингивалног ткива паса седам дана након апликације ретракционог раствора алуминијум хлорида, а Ahmadzadeh и сар. ретракционог средства на бази ферисулфата (292, 293).

Резултати истраживања Игића о утицају различитих ретракционих процедура на инфламацију гингиве показују да су ГИ и ИКРВ статистички значајно већи 24 h након третмана (умерена гингивална инфламација), и да се постепено смањују након периода од 72 h када је присутна блага инфламација (294). Поред тога, веће вредности клиничких параметара инфламације након ретракционих процедура су примећене у групи испитаника са брушеним у поређењу са небрушеним зубима, чиме је показан позитиван утицај брушења зуба на пораст индекса инфламације гингиве, а у складу је са резултатима који су добијени у дисертацији (294).

## **6.2. ДИСКУСИЈА ЦИТОМОРФОМЕТРИЈСКИХ ПРОМЕНА НА ТКИВУ ГИНГИВЕ НАКОН БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ**

Цитоморфометрија представља методу ексфолијативне цитологије и микроскопског анализирања десквамираних епителних ћелија коже и слузокоже (295).

Рарапicolaou први пут уводи цитоморфометрију као дијагностичку процедуру испитивања рака, давне 1943. године (296). Ова процедура пружа могућност примене једноставног, брзог, безболног, неинвазивног ексфолијативног дијагностичког средства у испитивању промена оралних лезија (297). Цитоморфометрија се базира на испитивању ћелијске морфологије, којом се изражава биолошко понашање ћелија и верификује свака њена промена (298).

Епител гингиве је плочастослојевите грађе, са најдубљим базалним слојем и површним рожнатим слојем. Ћелије базалног слоја имају највећа једра и мању цитоплазму. Идући од базалног слоја према периферији ткива величина једра се смањује а повећава се величина цитоплазме (299). Промене које су условљене физиолошким активностима доводе до смањења једра које се у рожнатом слоју у потпуности губи (300).

Ћелијско једро регулише све метаболичке процесе у ћелији, прати структурне и морфолошке промене и представља регулаторни центар ћелије (301).

За рано испитивање абнормалности ћелија могу се применити цитолошка и морфолошка испитивања (302) што омогућава примену цитоморфометрије у испитивањима инфламације гингивалног ткива. Површински слој епитела чине неправилне десквамиране епителне ћелије полигоналног облика. Једноставно се могу узорковати и микроскопски анализирати у циљу испитивања морфолошких промена које могу указати ефекат брушења зуба на потенцијалну инфламацију гингиве (301).

Свака промена ћелија на молекуларном нивоу реперкутује се на њен морфолошки изглед. Изглед ћелије и њених саставних јединица зависе од њеног нормалног функционисања које се испољава променама у цитоплазми, док је за биолошку активност ћелије задужено једро (303). Морфолошким и физиолошким мењањем ћелија током периода диференцијације долази до промена у самој величини и структури једра (304).

Цитоморфометријским испитивањима епителних ћелија гингиве могу се пратити структурне промене које настају у једру ћелија током брушења зуба. У истраживању су опсервиране вредности цитоморфометријских параметара гингиве пре брушења зуба (контролни узорци бриса гингиве) као и 15 минута, 24 h и 72 h након брушења зуба (студијски узорци бриса гингиве), код пацијената са субгингивалном (Г1) и еквигингивалном (Г2) позицијом демаркације препарације.

Анализирани су следећи једарни параметри: површина (*Area*), обим (*Perimeter*, *Perim*), циркуларност (*Circularity*, *Circ*), заобљеност (*Roundness*, *Round*), *Feret* дијаметар (*Feret diameter*, *Feret*), *Feret* угао (*FeretAngle*), минимални *Feret* (*MinFeret*), интегрисана оптичка густина (*Integrated Optical Density*, *IntDen*) и чврстоћа једра (*Solidity*).

Површина једра се смањила код оба типа демаркације препарације непосредно након брушења зуба, са постепеним порастом вредности након једног и три дана. Код испитаника са субгингивалном демаркацијом препарације примећено је значајно смањење једра непосредно након брушења, у односу на вредности пре брушења зуба.

Промена циркуларности једра примећена је и у групи са субгингивалном и еквигингивалном демаркацијом препарације у виду благог пораста, са постепеним опадањем

кроз опсервациони период, изузев у групи са субгингивалном позицијом демаркације препарације и порастом вредности циркуларности након три дана. Статистичка значајност у опсервационом периоду уочена је у групи брушених зуба са еквигингивалном демаркацијом препарације, што указује на мали ефекат препарације на промену циркуларности једра.

Непосредно након брушења зуба дошло је до пада вредности *Feret* у обе испитиване групе са постепеним порастом током времена. Такође, дошло је до благог пада вредности након три дана у групи брушених зуба са еквигингивалном демаркацијом препарације.

Испитивањем је обухваћено праћење вредности оптичке густине кроз опсервациони период. Оба типа демаркације препарације праћена су падом вредности непосредно након брушења зуба. Међутим вредност оптичке густине се неједнако мењала између испитиваних група. Заправо, у групи испитаника са субгингивалном позицијом демаркације дошло је до статистички значајног пораста вредности оптичке густине након три дана у односу на иницијалне вредности пре брушења, што указује на битан ефекат субгингивалне позиције демаркације зуба на вредност оптичке густине. Са друге стране, у групи са еквигингивалном позицијом дошло је до смањења вредности након три дана.

Статистички значајна промена вредности *FeretAngle* уочена је између испитиваних група. Док је у групи са субгингивалном позицијом демаркације уочен пад вредности у опсервационим интервалима након брушења зуба, у групи са еквигингивалном позицијом дошло је до раста вредности непосредно након брушења, пада вредности након једног дана, и поновног раста вредности *FeretAngle* након три дана од брушења зуба. Вредност  $\eta^2$  од 0,09 указује на средњи ефекат позиције демаркације зуба на промену испитиваног параметра током времена.

Уочено је смањење вредности параметра *MinFeret* у обе испитиване групе непосредно након периода брушења зуба, са статистичком значајношћу у групи са субгингивалном позицијом демаркације, и благим порастом кроз опсервациони период. Такође, у групи са еквигингивалном позицијом примећен је благи пад испитиваног параметра три дана након брушења зуба.

Заобљеност једра смањила се и у групи са субгингивалном и еквигингивалном позицијом демаркације и постепено порасла са временом, уз примећени пад након три дана у групи са еквигингивалном демаркацијом. Вредност  $\eta^2$  од 0,03 указује на слаб ефекат брушења зуба на промену параметра заобљености једра током опсервационог периода.

Обим и чврстоћа једра нису се значајно мењали између испитиваних група кроз опсервациони период. Осим што је уочено статистички значајно увећање чврстоће једра у групи са еквигингивалном позицијом демаркације у интервалу након једног дана у поређењу са интервалом након три дана од брушења зуба.

У резултатима претходно одрађене пилот студије код брушења зуба са субгингивалном позицијом демаркације препарације статистички значајно повећање вредности циркуларности, оптичке густине, заобљености једра и *MinFeret* уочено је након периода од три дана у поређењу са вредностима непосредно након брушења зуба. Такође, статистички значајно веће вредности параметра чврстоће једра су уочене у узорцима након три дана у односу на узорке након једног дана од брушења зуба. Нису добијене статистички значајне разлике за вредности параметара обим једра, површина једра, *Feret*-ов дијаметар, и *Feret*-ов угао кроз опсервациони период.

Доказано је да је активност ћелија повезана са величином једра, односно активна деоба ћелија одликује се повећањем једара (305).

Инфламација ткива гингиве доводи до промена унутар самих ћелија, величине једара и цитоплазме, са прогресивним променама једара и последичним смањењем цитоплазме ћелија (306).

Истраживања Игића показују да примена ретракционих средстава у поступку припреме гингивалног сулкуса за отискивање брушених зуба доводи до повећања једра, са постепеним смањењем површине у временском периоду од три дана, што указује на присуство реверзибилне инфламације гингиве. Осим површине, повећани су и други морфометријски параметри једра, обим и циркуларност, док је вредност *Feret* дијаграма смањена након ретракционе процедуре. Морфометријски параметри, оптичка густина и заобљеност једра, разликовали су се у зависности од примењеног ретракционог средства, да би се након три дана вратили на иницијалне вредности, што опет указује на присуство реверзибилних промена у гингивалном епителу (294).

Након примене различитих модалитета пародонталне терапије величина једра се смањује, што указује на утицај инфламације и ефекат терапије на морфолошке параметре ћелијског једра (307).

Резултати бројних истраживања указују да најранији показатељи ћелијских промена могу бити повећање површине једра, повећање односа једро/цитоплазма, и прогресивно смањење површине цитоплазме (308-310).



Смањење површине ћелија може се користити као еквивалент диспластичних промена, уз примарно смањење површине ћелија пре смањења једра, чиме се цитоморфометријском анализом кератиноцита олакшава рано откривање болести (311).

Ramaesh и сар. показују да се дијаметар цитоплазме разликује у зависности од здравља посматраних ћелија, са највећим вредностима код здраве гингиве, нижих вредности код диспластичних ћелија, и најмањих вредности код присутног сквамозног карцинома (312).

Повећање једра јавља се код болести оралних ткива, као што је леукоплакија, са променама у осталим морфолошким параметрима једра. Повећањем дијаметра једра од здравог гингивалног ткива ка оболелом, сразмерно долази до смањења дијаметра цитоплазме (313). Једра малигних епителних ћелија карактеришу се повећањем димензија са карактеристичним нуклеарним бојењем, хиперхроматизмом (314).

Површина ћелијског једра се повећава у патолошким стањима, што је доказано у истраживању Weigum и сар, почевши од здравог ткива гингиве, ка дисплазији, и присутних највећих вредности површине једра код оралног сквамозног карцинома (315). Цитоморфометријска испитивања спроведена код пушача, у поређењу са непущачима, показују повећање једарних вредности, смањење цитоплазматских параметара и појаву инфламаторних промена (316). Иритација оралног епитела показала је повећане вредности површине ћелијског једра код пушача (317).

Patel и сар. испитивањем гингивалних размаза здравог гингивалног ткива показали су варијације у димензијама једра и цитоплазме и односа једро/цитоплазма у различитим узрастима испитаника (295). Цитоморфометријске варијације ћелија у зависности од узраста испитаника објашњавају се природним механизмом старења. Дељење базалних ћелија гингивалног епитела је ограничених могућности, што последично доводи до таложења остарелих ћелија због смањења њиховог даљег обнављања (318). Након терапије гингивитиса код деце доказано је смањење величине једра у епителним ћелијама гингиве (304).

Доказана је значајна разлика у цитоморфометријским испитивањима здравог гингивалног ткива код жена и мушкараца млађе животне доби до двадесете године, што се објашњава повећаним лучењем полних хормона (295). Хормонски дисбаланс може довести до инфламације гингивалног ткива, што се одражава на самом једарном нивоу ћелија, у виду повећања (319).

У резултатима дисертације није примећено повећање једра ћелија што се, према претходно наведеним литературним подацима, може објаснити одсуством значајне инфламације која би се показала и на специфичном цитолошком нивоу. Међутим, објашње-

ње се може наћи и у великом распону узраста испитаника оба пола, што евентуално може утицати на добијене резултате. Са друге стране, егзактно су опсервиране цитоморфометриске промене на епителу третиране гингиве и посматран њихов ток у опсервационим интервалима што јесте литературно први покушај објашњавања утицаја брушења зуба на његова потпорна ткива, те самим тим има научни значај и потенцијал да се употреби у студијама које следе.

Осим цитоморфометријских, хистолошка истраживања пружају могућност испитивања патогенезе оштећења гингивалног ткива на основу квалитативних и квантитативних промена имфламаторног ескудата (304).

Компијутеризована морфометријска технологија пружила је могућност прецизног испитивања различитих параметара једара и њиховог коришћења у дијагностици оралних лезија. Бојењем препарата добија се јасан увид стања цитоплазме на основу сазревања и количине присутног кератина у епителним ћелијама (313).

### **6.3. ДИСКУСИЈА ПРОМЕНА ЕКСПРЕСИЈЕ МАРКЕРА ИНФЛАМАЦИЈЕ У ГИНГИВАЛНОЈ ТЕЧНОСТИ НАКОН БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ**

Обољења пародонта су запаљенске природе и изазвана су полимикробном инфекцијом, која се развија постепено, обухватајући све структуре потпорног апарата зуба, иницијално почевши од гингивалног ткива. Почињу као инфламација гингиве, односно гингивитис. Уколико се не дијагностикује и не лечи на време, гингивитис доводи до неповратног разарања меких и тврдых ткива и коначно до губитка зуба (320-322).

Епидемиолошки подаци показују да 15 до 20% одрасле популације има унапредовалу хроничну пародонтопатију (322). Yang и сар. наводе да скоро половина популације Сједињених Америчких Држава старијих од 30 година има пародонтопатију, док 10% има тежак облик ове болести (323). Главни етиолошки фактор настанка обољења пародонта јесте формирање комплексног биофилма на површини зуба. Развој обољења могу поспешити услови животне средине, социјални, бихевиорални, генетски фактори и системске болести (323). Појаву болести потенцирају системска обољења као што су дијабетес, васкуларни поремећаји и кардиоваскуларне болести (324-326).

У дисертацији се пошло од претпоставке да брушење зуба, као свакодневна стоматопротетска процедура, може довести до инфламације гингиве механичким путем или

променом састава оралне микрофлоре. Инфламација гингиве може се потврдити већом концентрацијом њених маркера у гингивалној течности. На експресију испитиваних маркера инфламације (*IL-1 $\beta$* , *MMP-9* и *VEGF*) може утицати и локација демаркације препаратације, која је у студији код половине испитаника позиционирана субгингивално, а код преосталих испитаника еквигингивално, према клинички постављеној индикацији. Несанирање почетних запаљенских лезија у гингивалном ткиву резултовало би прогресијом запаљења у дубља ткива пародонта (периодонтални лигамент, цемент корена зуба и алвеоларна кост), што би се завршило иререверзибилним променама и могућим губитком зуба. Са друге стране, контролисано брушење и рано препознавање знакова инфламације гингиве учинило би настале промене реверзибилним, а протетску терапију дуготрајном и ефикасном.

Без обзира на неприкосновену улогу биофилма у развоју пародонталних обољења, он сам није довољан за деструкцију пародонталних ткива. Присуство биофилма може изазвати и претерану реакцију домаћина, што резултује ослобађањем проинфламаторних цитокина који поспешују патогенезу болести (323).

Патолошке промене у потпорном ткиву настају директним или индиректним дејством периодонталних патогена. Индиректна активност патогена огледа се кроз дејство имунолошких и неимунолошких ћелија домаћина, које ослобађају проинфламаторне цитокине под утицајем бактеријских агенаса. Присуство патогена у пародонталном ткиву изазива неспецифични имуни одговор, реакцију имуних ћелија, и подразумева активацију великог броја плазма ћелија које синтетишу имуноглобулине (327).

Патогенеза пародонталне болести најједноставније се може објаснити дејством различитих фактора (липополисахариди, протеазе, токсини, липазе и др.) на тригер ћелије које учествују у локалном имунолошком одговору (фибробласти и епителне ћелије потпорног апарата зуба) и на ћелије алвеоларне кости, иницирајући ослобађање проинфламаторних цитокина (интерлеукини, фактора тумор некрозе алфа (*TNF- $\alpha$* ), простагландина *E2*, *RANKL* и др.) и реактивних врста кисеоника (*reactive oxygen species-ROS*), који покрећу каскадну реакцију деструкције потпорних ткива зуба. Ови медијатори саставни су део имунолошког одговора домаћина који појачава експресију *MMPs* у лезијама захваћеним пародонталном болешћу (320, 322).

### 6.3.1. ДИСКУСИЈА ПРОМЕНА КОНЦЕНТРАЦИЈЕ *IL-1 $\beta$* У ГИНГИВАЛНОЈ ТЕЧНОСТИ НАКОН БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ

Интерлеукини су проинфламаторни цитокини са улогом у активацији, диференцијацији и пролиферацији леукоцита. *IL-1 $\beta$*  производе моноцити, макрофаги и дендритичне ћелије. *IL-1 $\beta$*  је важан медијатор инфламаторног одговора који стимулише ћелијску активност у виду диференцијације, пролиферације и апоптозе (328).

Faizuddin и сар. доказали су присуство већих концентрација *IL-1 $\beta$*  код испитаника са гингивитисом у односу на пацијенте са здравим пародонтом у гингивалној течности (329). У истраживању Abo-Elmagd и сар. доказано је да је концентрација *IL-1 $\beta$*  била значајно већа један до три дана након брушења зуба са субгингивалном позицијом демаркације препарације, у поређењу са вредностима *IL-1 $\beta$*  две недеље након брушења (330), што је у складу са резултатима добијеним у овом истраживању.

Наиме, резултати испитивања концентрације *IL-1 $\beta$*  код испитаника са субгингивалном и еквингингивалном позицијом демаркације препарације пре брушења зуба, и у опсервационим интервалима од 15 минута, 24 h и 72 h након брушења зуба показали су пораст *IL-1 $\beta$*  одмах након третмана у односу на контролу. Тренд пораста се задржао током читавог периода испитивања, односно 72 h након препарације није се вратио на иницијалне, почетне вредности.

У обе испитиване групе вредност концентрације *IL-1 $\beta$*  у гингивалној течности 15 минута након препарације значајно расте, раст се наставља и 24 h након препарације, док се 72 h након препарације бележи пад вредности у односу на претходне опсервационе интервале, али не и на вредности пре брушења зуба.

Поређењем вредности *IL-1 $\beta$*  *Man-Whitney* тестом између испитиваних група нису утврђене статистички значајне разлике ни у једном од опсервационих интервала. Ефекат препарације зуба на вредност концентрације *IL-1 $\beta$*  веома је јак у обе групе, нешто израженији у Г2.

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом у односу на почетну вредност у обе групе бележе се статистички значајне разлике за сва три опсервациона интервала ( $p < 0,001$ ).

*Wilcoxon Signed Ranks* тестом, поређењем највиших вредности концентрација овог параметра које се бележе 24 h након препарације, утврђено је да су те вредности статистички знатно више но вредности концентрација *IL-1 $\beta$*  15 минута после препарације ( $p < 0,001$ ) у обе испитиване групе. У Г1, концентрација *IL-1 $\beta$*  24 h после брушења је

статистички значајно виша и у односу на вредност концентрације након последњег опсервационог интервала (72 h) ( $p < 0,05$ ). У Г2 вредност концентрације *IL-1 $\beta$*  након 72 h статистички је значајно виша у поређењу са вредностима пре препарације, док у Г1 нема статистички значајне разлике при поређењу *IL-1 $\beta$*  између ова два опсервациона интервала.

Оба типа демаркације препарације изазвала су пораст концентрације *IL-1 $\beta$*  у гингивалној течности, што указује на инфламаторни потенцијал брушења зуба, те могућу појаву јатрогеног гингивитиса. Брзом санацијом насталих промена спречава се даље оштећење потпорног апарата зуба, односно прогресија болести. Наравно, никада не треба изгубити из вида и мере превенције, које промене на ткиву могу минимизирати.

Истраживања Moretti и сар. указују на утицај позиције демаркације препарације на инфламаторне промене гингиве мерењем концентрације *IL-1 $\beta$* . Вредности интерлеукина биле су статистички значајно веће код субгингивалне у односу на екви и супрагингивалну позицију демаркације, док је стање здравља гингиве одређено гингивалним индексима било боље код супрагингивалне позиције (331). Ови резултати су у позитивној корелацији са резултатима нашег истраживања, доказујући да је пораст концентрације *IL-1 $\beta$*  у оралним течностима један од првих знакова развоја пародонталних обољења.

У истраживању Gonzáles и сар. вршена је анализа клиничких параметара инфламације гингиве, гингивалних индекса, и концентрације *IL-1 $\beta$*  из узорак гингивалне течности. Испитаници су се суздржали од свих мера уклањања оралног биофилма и у различитом временским интервалима је вршено оцењивање индекса и узимање узорака гингивалне течности. Резултати ове студије показали су постепени пораст концентрације *IL-1 $\beta$* , као и клиничких параметара запаљења кроз време, што указује на повезаност овог цитокина и инфламације гингивалног ткива (332). Текуће године (2023.) објављено је истраживање које се бавило испитивањем *IL-1 $\beta$*  код пацијената са пародонтопатијом градираном од првог до четвртог степена. Доказано је да се концентрација интерлеукина повећавала са порастом степена оштећења пародонталног ткива (333).

Истраживања других аутора показују повезаност између концентрације *IL-1 $\beta$*  у гингивалној течности и дубине гингивалног сулкуса која је већа код присутне инфламације ткива гингиве (334). Велики број истраживања бавио се испитивањима концентрације *IL-1 $\beta$*  у пљувачки код пацијената са пародонтопатијом, дубљим пародонталним џеповима и већем крварењу при сондирању. Резултати истраживања су сагласни да је већа концентрација *IL-1 $\beta$*  у пљувачки присутна код пацијената са присутним болестима пародонта (335-337).

Једна опсежна мета-анализа бавила се испитивањем поузданости различитих биомаркера у пљувачки за откривање пародонталне инфламације код системски здравих испитаника. Добијени резултати показују да је највећа вредност осетљивости за дијагнозу пародонтитиса добијена за *IL-1 $\beta$*  (78,7%) (338).

Lerner и сар. добили су више вредности *IL-1 $\beta$*  у гингивалној течности код испитаника тинејџерске доби са пародонтитисом (339). У испитивању деце узраста 11-16 година са гингивитисом, доказане су више вредности *IL-1 $\beta$*  у узорцима гингивалне течности у поређењу са децом здравог пародонта (98).

Истраживања Hussain и сар. обухватила су испитивања концентрације *IL-1 $\beta$*  у гингивалној течности и пљувачки. Детектоване су више просечне концентрације *IL-1 $\beta$*  у гингивалној течности у групи испитаника са хроничном пародонтопатијом него у групи испитаника са гингивитисом и групи здравих испитаника. Просечна концентрација у пљувачки је била једнака у групи са пародонтопатијом и гингивитисом (340).

Од стране неких аутора дата је препорука да се концентрација *IL-1 $\beta$*  у гингивалној течности може користити као квантитативна мера процене стања гингиве, уз очекиване више вредности код присутне инфламације (341). Концентрације *IL-1 $\beta$*  у серуму пацијената са хроничном пародонтопатијом могу бити поуздани маркери инфламације пародонта, због функције цитотоксина у инфламацији (342).

Влоепен и сар. указују на значај утицаја излагања проинфламаторном интерлеукину – *IL-1 $\beta$*  на фенотип ћелија. Истраживањем је показано да само једно излагање интерлеукину може довести до промена фенотипа ћелија сличним остеобластима у ћелије које доводе до деструкције кости (343).

Велики број аутора испитивао је корелацију између ортодонтског померања зуба током ношења апарата и концентрације *IL-1 $\beta$*  у гингивалној течности. Zheng и сар. у свом истраживању показују праћење промене концентрације *IL-1 $\beta$*  кроз временски период (0, 7, 14, 21, 28 дана) од постављања ортодонтског апарата. Концентрација интерлеукина била је виша у свим временским интервалима у односу на почетну вредност са најзначајнијим повећањем концентрације 7. дана (344). Motyl и сар. у испитивању нивоа *IL-1 $\beta$*  у гингивалној течности приликом процедуре ортодонтске ретракције очњака доказали су максимално повећање вредности концентрације *IL-1 $\beta$*  24-72 h од примене механичке силе (345). Такође, други аутори су показали значајни пораст концентрације *IL-1 $\beta$*  већ након 24 h од ортодонтског третмана (346).

У литератури се могу наћи и подаци који показују повезаност обољења пародонта са узастопним повећањем концентрације *IL-1 $\beta$*  и других проинфламаторних цитокина.

Резултати једне опсежне мета-анализе указују да су концентрације *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IFN- $\gamma$* , *MCP-1/CCL2*, мерене из узорака гингивалне течности, знатно веће код испитаника са дијагнозом хроничног пародонтитиса у поређењу са здравим испитаницима. Такође, доказано је значајно смањење концентрација *IL-1 $\beta$*  и *IL17* након нехируршког третмана лечења пародонта (347).

Sanchez и сар. испитивали су концентрације *IL-1 $\beta$* , простагландина Е2 (*PGE2*) у узорцима пљувачке, и пародонтални статус код испитаника након пародонталног третмана. Резултати овог испитивања показали су смањење оба медијатора након пародонталног лечења (348).

Syndergaard и сар. у резултатима свог истраживања доказали су 1,5 пута веће вредности концентрација саливарних маркера инфламације, *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *MMP-8*, код испитаника са гингивитисом у поређењу са испитаницима са здравом гингивом. У истом испитивању добијено је смањење концентрација маркера инфламације након базичне терапије пародонтопатије у поређењу са вредностима пре терапије (349).

Као одговор на повећање концентрације *IL-1 $\beta$*  и *TNF- $\alpha$*  бројне ћелије пародонталног ткива реагују производњом цитокина *IL-6*, значајним у инфламаторном одговору организма (97). Међутим, мишљења неких аутора (350) су да долази до повећања концентрације *IL-6* у пљувачки код болести пародонта, док други нису добили такве резултате (351).

*IL-4* је цитокин који такође показује већу експресију код пацијената са пародонтитисом (352).

У другој студији испитиване су концентрације интерлеукина *IL-1 $\alpha$*  и *IL-8* у гингивалној течности код пацијената са фиксним протетским конструкцијама код којих је брушење изведено са различитим позицијама демаркације. Доказано је да су вредности концентрација биле веће код еквигингивалне позиције у поређењу са супрагингивалном позицијом демаркације препарације зуба (353).

### **6.3.2. ДИСКУСИЈА ПРОМЕНА КОНЦЕНТРАЦИЈЕ *VEGF***

#### **У ГИНГИВАЛНОЈ ТЕЧНОСТИ НАКОН БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ**

*VEGF* представља субфамилију фактора раста, пореклом из тромбоцита. Улога *VEGF*-а јесте у васкулогенези (формирање крвног система ембриона) и ангиогенези (раст мреже крвних судова), те се може дефинисати као сигнални протеин кога производе ћелије одговорне за поменуте генезе. Серумска концентрација *VEGF*-а је висока код

бронхијалне астме и ниска код дијабетеса (354). Повећана експресија *VEGF*-а присутна је код оштећења ткива гингиве и пародонцијума (355).

Бројне студије доказују утицај *VEGF*-а на прогресију оштећења ткива пародонта, с обзиром на присуство већих вредности концентрација код гингивитиса и пародонтопатије у односу на здраву гингиву (123, 356). King-Tung и сар. доказали су повећане концентрације *HIF-1 $\alpha$*  и *VEGF*-а у узорцима биопсиране гингиве код особа са пародонталним оштећењима у поређењу са гингивом здравих испитаника (115).

Резултати нашег истраживања показали су пораст концентрација *VEGF* у гингивалној течности код обе испитиване групе 15 минута након препарације зуба са тенденцијом пада 24 h после интервенције. У обе групе испитаника утврђене су статистички значајно више вредности концентрација *VEGF* 15 минута и 24 h након препарације ( $p < 0,001$ ). Након 72 h испитиване концентрације су се приближиле вредностима измереним пре препарације зуба, што указује на смиривање инфламаторних промена.

Утврђено је да препарација зуба има значајан утицај на вредност концентрације параметра *VEGF*. Поређењем вредности концентрација *VEGF* између испитиваних група утврђене су статистички значајно више вредности у Г1, са нивоима статистичке значајности од  $p < 0,001$  15 минута након препарације,  $p < 0,01$  након 24 h, као и  $p < 0,05$  72 h након препарације, што указује на већи инфламаторни потенцијал субгингивалне позиције демаркације препарације. То потврђује и вредност *Kendallovog W* која је битно виша у Г1 но у Г2. Добијени резултати потврђују хипотезу да се субгингивалном демаркацијом препарације више оштећује гингивално ткиво.

Поређењем вредности параметара у испитиваним периодима опсервације након брушења зуба понаособ, утврђене су статистички значајне разлике концентрација *VEGF* између свих опсервационих интервала. Вредност концентрације *VEGF* 15 минута после препарације статистички је значајно виша у односу на вредност након 24 h ( $p < 0,001$  у Г1, односно  $p < 0,05$  у Г2), као и 72 h после препарације ( $p < 0,001$  у обе групе). Вредност овог параметра 24 h након препарације статистички је значајно виша но након 72 h од препарације ( $p < 0,001$ ).

Добијени резултати показали су пораст концентрације *VEGF* у гингивалној течности након препарације зуба, што указује на чињеницу да брушење зуба може утицати на развој гингивитиса и у складу је са добијеним вредностима клиничких параметара инфламације (повећање вредности гингивалног индекса и индекса крварења). Аналогно томе, утврђена је и реверзибилност насталих инфламаторних промена, што је потврђено и клиничким прегледом. Резултати других аутора указују на исте закључке, да са инфла-



мацијом гингиве расте и концентрација *VEGF* у гингивалној течности и пљувачки. Тако су, Afacan и сар. у испитивању гингивалне течности на присуство *VEGF* и *HIF-1 $\alpha$* , код испитаника са здравом гингивом, гингивитисом и пародонтитисом, доказали значајно повећање концентрација оба параметра код испитаника са гингивитисом у поређењу са здравом гингивом, односно испитаника са пародонтитисом (357). У истраживању Borges и сар. такође указују на присуство већих концентрација *VEGF* у инфламираном ткиву гингиве (358).

Други аутори су се бавили проценом стања пародонта код испитаника са агресивном пародонтопатијом мерењем концентрација *VEGF*, *HIF-1 $\alpha$* , и *TNF- $\alpha$*  у узорцима гингивалне течности, пре и након базичне терапије пародонтопатије. Резултати истраживања показују значајно мање концентрације испитиваних параметара након пародонталне терапије, што указује да ови медијатори имају велики утицај на инфламацију ткива пародонта (359). Romano и сар. у испитивању медијатора инфламације код пацијената са пародонтопатијом трећег степена, доказују смањење концентрација *VEGF* након нехируршке терапије пародонтопатије, израженије код испитаника са споро напредујућом пародонтопатијом у односу на агресивни тип (125).

У испитивању вредности *VEGF* у гингивалној течности код испитаника са периимплантитисом резултати показују присуство већих концентрација у поређењу са здравим ткивом пародонта, што доказује да *VEGF* може иницијативно утицати на настанак гингивитиса (360).

Matarese и сар. у својој студији закључују да се *VEGF* може користити као инфламаторни маркер код оштећења ткива пародонта, који може помоћи у дијагнози и сврсисходно терапији болести (361).

Вредности концентрација *VEGF* у гингивалној течности расту у складу са озбиљношћу оштећења ткива пародонта (362).

Мишљења других аутора су да *VEGF* има важнију улогу у излечењу пародонталних лезија, него прогресији болести (355). Док Türeg и сар. доказују сразмерно смањење концентрација *VEGF* након периода лечења базичном терапијом пародонтопатије, и пропорционално повећање концентрација *VEGF* са погоршањем клиничке слике болести (363).

Аналогно вредностима концентрације *IL-1 $\beta$* , након брушења дошло је и до пораста концентрације *VEGF* у опсервационим интервалима након 15 минута и 24 h. Веће вредности уочене су у случају субгингивално позициониране демаркације препарације, што је доказало постављену хипотезу истраживања. Вредности испитиваних параметара опадале су са временом, те су се приближиле почетним након 72 h, што указује на реверзибилност инфламаторних промена у обе експерименталне групе.

### 6.3.3. ДИСКУСИЈА ПРОМЕНА КОНЦЕНТРАЦИЈЕ *MMP-9* У ГИНГИВАЛНОЈ ТЕЧНОСТИ НАКОН БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ

*MMPs* представљају структурално сродну, али генетски различиту, суперфамилију протеаза које активно учествују у физиолошком развоју и ремоделацији, али и патолошкој инфламацији и малигној деструкцији ткива (364). Ови ензими су се раније назвали интерстицијалне колагеназе и желатиназе (141).

*MMPs* се могу поделити у пет великих група: колагеназе (*MMP* 1,8 и 13), стромелизини (*MMP* 5,10 и 11), желатиназе (*MMP* 2 и 9), *MMP* мембранског типа (*MMP* 14,15,16 и 17) и остале *MMPs* (145, 364).

*MMPs* делују по принципу интеракције ћелија-ћелија, односно ћелија-екстрацелуларни матрикс. Описане интеракције индукују производњу различитих ензима, активатора, инхибитора, фактора раста и цитокина, чиме се регулишу ремоделација или деструкција пародонталног ткива (365, 366).

Група *MMPs* поседује својство разградње скоро свих компоненти екстрацелуларног матрикса и ћелијских мембрана, и њихова прекомерна активност деструише пародонтално ткиво (367, 368). Дејство *MMPs* остварује се и регулацијом дејства различитих биоактивних нематриксних супстрата, као што су фактори раста, медијатори имунитета, цитокини, хемокини, чиме посредно контролишу проинфламаторне и антиинфламаторне процесе (143, 366, 369).

Vu и Werb су доказали учешће *MMPs* у ремоделирању ткива, тако што утичу на ћелијско понашање, нпр. изазивањем миграције ћелија у нормалном расту и поновном моделирању ткива, као што је зарастање рана и ангиогенеза (370). Експресија и активност *MMPs* у ткивима обично је ниска, али се значајно повећава у патолошким процесима, као што су хронична запаљења и деструктивна обољења костију (371). Soder и сар. су поставили хипотезу да пародонтални патогени иницирају више нивое *MMPs* у гингивалној течности, што може изазвати повећање концентрација ових ензима у плазми, чиме се доприноси патогенези атеросклерозе као системске болести. Аутори су доказали да *MMPs* могу да продру из инфламаторних ћелија пародонталних џепова у циркулацију (372).

Дејство *MMPs* супримирано је ткивним инхибиторима матрикс металопротеиназа. Претпоставља се да је деструкција пародонталног ткива последица дисбаланса између синтезе *MMPs* и њихових инхибитора (*TIMPs*) (364). Код људи су присутна четири типа

инхибитора *MMPs*: *TIMP-1*, *TIMP-2*, *TIMP-3* и *TIMP-4*. *TIMPs* регулишу ензимску активност *MMPs* и имају улогу у обнављању компоненти екстрацелуларног матрикса, ткива и ремоделирању ћелија (373, 374).

*MMP-9* је протеолитички ензим који разграђује денатурисани колаген, посебно колаген типа IV, главну компоненту базалних мембрана ћелија, као и протеогликане и еластин (150). Његово ослобађање из активираних моноцита, лимфоцита и полиморфонуклеарних леукоцита је строго регулисано цитокинима, тако да се лучи као проензим који је неактиван док му се протеолитичким ензимима (стромелизин-1, *MMP-2* и други *MMP*) не уклони пропептидни део (151).

*MMP-9* се обично лучи у комбинацији са специфичним инхибитором, *TIMP-1*. Неравнотежа између *MMP-9* и *TIMP-1* доводи до прекомерне деградације ткива, уобичајено код хроничних инфламаторних болести укључујући хронични пародонтитис (152-155). Ingman и сар. су доказали повишене нивое *TIMP-1*, ендогеног инхибитора *MMP-9*, у односу на контролу код пацијената са пародонтитисом (375).

Истраживања бројних аутора показују да полиморфонуклеарни леукоцити и моноцити, односно макрофаги, као одговор на дејство присутних бактерија, мигрирају на места запаљења где дегранулацијом ослобађају *MMP-8* и *MMP-9* (145, 364). Разне ћелијске линије, нпр. полиморфонуклеарни леукоцити, макрофаги, кератиноцити, фибробласти, остеокласти, еозинофили и неутрофили, повезани су са експресијом гена *MMP-9*, који се налази на хромозому 20q11.2-13.1 (137). Утврђено је да *MMP-9* регулише ослобађање појединих медијатора током раних фаза инфламације, укључујући *IL-1*, *IL-6* и *IL-8* и простагландине (373, 376).

Lazar и сар. су доказали корелацију *MMP-9* и циклооксигеназе 2 (*Cox-2*) у развоју пародонталне болести где се окидачем патолошког процеса може сматрати моноклеарни инфилтрат. Експресија *Cox-2* и *MMP-9* у инфламираном гингивалном ткиву не указује на хистолошки подтип болести (гингивитис и хронична пародонтитис), већ се везује за озбиљност насталих оштећења (377). Присуство биофилма на зубима активира *Cox-2* која представља индуцибилни ензим који није присутан у здравом ткиву и већ је карактеристичан за ћелије укључене у запаљенске процесе. *Cox-2* игра важну улогу у инфламаторним одговорима пародонталног ткива тако што катализује претварање арахидонске киселине у простагландине, који су важни посредници у оштећењу меких ткива и костију, стимулацијом вазодилатације и повећавањем капиларне пермеабилности (378, 379). У клиничкој пракси се препоручује третман оболелих *Cox-2* инхибиторима

уместо неселективних нестероидних антиинфламаторних лекова и инхибитора *MMPs* (хемијски модификовани тетрациклини) (377).

Велики број публикација показао је експресију и активност *MMPs* код упале гингиве, што је доказано анализом узорака гингивалне течности и пљувачке (141, 380-382). Са друге стране, литературни подаци показују смањење концентрације *MMPs* након оздрављења пародонталног ткива (148, 149, 383). Гингивална течност и пљувачка представљају одличне дијагностичке медијуме биохемијских и имунолошких маркера, за праћење пародонталних и периимплантатних обољења (89, 384).

Концентрације *MMP-9* и *MMP-13* у гингивалној течности су предложене као корисни биомаркери за прогресију болести код пацијената са умереном хроничном пародонтопатијом са активним местима, у опсервационом периоду од два месеца. Ови налази су у складу са другим студијама пресека које показују да су поменуте концентрације *MMP-9* и *MMP-13* у корелацији са активношћу хроничне пародонтопатије (385, 386). *MMP-9* је осетљивији параметар за дијагнозу пародонталних обољења у односу на *MMP-13* (366, 387). По питању ресорпције костију, постоје супротна мишљења о улози *MMP-9*. Са једне стране, остеокласти експримирају овај ензим на изузетно високом нивоу. Друге студије сугеришу да *MMPs* имају, у најбољем случају, веома мали допринос у коштаној ресорпцији и да селективни инхибитор *MMP-9*, *ТИМР-1*, није показао значајан инхибиторни ефекат на функцију остеокласта (388). Хемијска инхибиција *MMP-9* смањује ортодонтске покрете зуба (137). Хипертрофија гингиве без знакова запаљења може бити узрокована реакцијом гингивалног ткива на механичко напрезање изазвано ортодонтским силама, које стимулише активност *MMP-9* (137).

У студији Hill и сар. као маркер инфламације из ове групе коришћена је *MMP-9* присутна у сулкусном и џепном епителу, као и у леукоцитима инфилтрираног пародонталног ткива и остеокластима (389-391). *MMP-9* представља главну желатиназу (желатиназа Б) у гингивалној течности (392). Присуство *MMP-9* у гингивалној течности уско је повезано са присуством специфичних патогена, као што су *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola* (130, 393). Потенцијална дијагностичка вредност гингивалне течности од посебног је значаја за одређивање степена патолошких промена у пародонталном ткиву, посебно уколико се комбинује са детекцијом патогена из биофилма и клиничким пародонталним параметрима (147). Са порастом тежине пародонталног обољења расте и концентрација *MMP-9* у гингивалној течности (141), а аналогно се смањује њиховим лечењем (392).

Резултати ове студије показали су промену концентрације *MMP-9* у гингивалној течности испитаника након брушења зуба са субгингивалном и еквигингивалном позицијом демаркације препарације облика полужлеба. У истраживању се пошло од претпоставке да брушење зуба мења експресију *MMP-9* и концентрацију овог ензима након брушења зуба, као и да та промена зависи од позиције границе брушеног и небрушеног дела зуба. Посматране су промене концентрација 15 минута и 24 h, односно 72 h након интервенције. Контролни узорци су узимани непосредно пре брушења зуба. Пре извођења предвиђеног експеримента урађена је пилот студија упоредне анализе нивоа *MMP-9* и присуства бактерија *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* у гингивалној течности. Испитивање је спроведено на 20 испитаника са индикацијом за брушење горњег очњака за металокерамичку круницу. Демаркација облика полужлеба је код 10 испитаника позиционирана испод нивоа гингиве (Г1), а код преосталих 10 у нивоу гингиве (Г2). Пацијенти су подељени у две групе према клиничким индикацијама. Циљ пилот студије био је испитивање изводљивости планиране студије, као и добијање прелиминарних резултата који би могли да утичу на дизајн дисертацијом планираног експеримента.

Вредности концентрација *MMP-9*, која је код обе групе испитаника, одређена у четири опсервациона интервала, показују статистички значајну разлику у сваком од њих. У испитиваном времену постоји статистички значајан линеарни тренд пораста вредности концентрација *MMP-9* и значајан квадратни тренд са падом вредности концентрација *MMP-9* 15 минута након брушења. У даљем току испитиваног времена примећен је значајан пораст тако да су вредности концентрација након 72 h од брушења биле нешто веће него пре почетка третмана. Добијени резултати указују на постојање али и реверзибилност гингивалног инфламаторног процеса.

Концентрација *MMP-9* 15 минута након брушења зуба била је значајно нижа од почетних вредности концентрација узорака узетих пре брушења зуба код обе групе испитаника. Смањене вредности концентрација могу се објаснити иригацијом приликом брушења (разводњавањем) и променом реалног састава гингивалне течности непосредно након препарације зуба. С обзиром на описану улогу *MMP-9* у етиопатогенези инфламације гингиве и пародонталних обољења уопште, може се закључити да је експресија *MMP-9* као маркера инфламација била неочекивана након толико кратког времена од механичког оштећења тврдог зубног ткива. Са друге стране, 24 h након интервенције, концентрација *MMP-9* се повећала у односу на контролу, у обе групе испитаника. То указује на развој инфламације гингиве, додуше реверзибилног карактера. Уз све мере опреза,

концентрација *MMP-9* углавном се вратила на почетни стадијум (ниво контроле) након последњег опсервационог интервала, када се наставило са клиничком и лабораторијском израдом предвиђених протетских надокнада.

Пилот студијом није уочена разлика у концентрацији *MMP-9* између испитаника са субгингивалном и еквигингивалном позицијом границе препарације зуба. Интересантно је да позиција демаркације није значајно утицала на концентрацију *MMP-9*, ни у једном од опсервационих интервала. У истраживању се пошло од претпоставке да брушење зуба унутар гингивалног сулкуса може да доведе до већих механичких оштећења што би, уз евентуалну промену микробне флоре уз експозицију субгингивалних анаероба, резултовало интензивнијом инфламацијом гингиве. Свакако, све препоруке иду у корист еквигингивалног у односу на субгингивални завршетак препарације зуба, пре свега у циљу превенције гингивитиса, што овом студијом није потврђено.

Слични резултати добијени су повећањем броја испитаника на 60, како је било предвиђено експерименталним дизајном дисертације. *Friedman*-овим тестом код оба типа препарације утврђене су статистички значајне промене концентрације *MMP-9* током целог испитиваног периода ( $p < 0,001$ ). У обе испитиване групе вредност концентрације *MMP-9* у гингивалној течности 15 минута након препарације пада, да би 24 h након препарације расла, а потом благо опала након 72 h од препарације. Вредност концентрације *Kendallovog W* је значајно виша у Г1 но у Г2. Док у Г1 указује да обе вредности приказују високи интензитет ефекта препарације зуба на параметар концентрације *MMP-9*, у Г2 је тај ефекат мали, што указује на већу употребну вредност еквигингивалне демаркације препарације.

Поређењем вредности параметра у испитиваним периодима опсервације након брушења зуба понаособ, утврђено је да је у обе групе вредност концентрације 24 h након препарације статистички значајно виша од вредности концентрације 15 минута од препарације ( $p < 0,001$ ), што ипак указује на инфламаторни ефекат препарације зуба. Статистички значајно више су и вредности концентрације након 72 h од препарације у односу на оне 15 минута пре препарације ( $p < 0,001$  у Г1, односно  $p < 0,05$  у Г2). Пораст концентрације *MMP-9* у гингивалној течности 24 h након брушења зуба указује да брушење зуба може да утиче на појаву гингивитиса. Са друге стране, пад након три дана недвосмислено указује на реверзибилност насталих промена, што је у потпуности усклађено са резултатима концентрација осталих испитиваних маркера инфламације, као и других сегмената истраживања унутар дисертације.

*MMP-9* је суштински модулатор одбране домаћина током почетне имунолошке фазе, што заузврат, може покренути каскаду која укључује читав одбрамбени механизам домаћина, ендотелну хомеостазу, водећи до повећаног ризика од развоја пародонталне болести (394, 395). Овим се може објаснити пораст концентрације *MMP-9* у гингивалној течности један дан након брушења зуба, покретањем имунолошких ресурса гингиве.

Настала инфламација је у нашој студији имала реверзибилни карактер. Добијени резултати су у позитивној корелацији са резултатима Soder и сар, који су показали да је концентрација *MMP-9* повећана у гингивалној течности у почетној фази пародонталног обољења и да има кључну улогу у неоангиогенези, која је у вези са одговором домаћина на пародонталне патогене (396). Главни извор *MMP-9* су полиморфонуклеарни неутрофили у раној фази гингивалне инфламације и епителне ћелије гингиве код већ узнапредовалог пародонтитиса (397).

Налази других аутора показали су повезаност експресије *MMP-9* са оштећењем пародонталног ткива током активних фаза пародонтитиса (398). Неке студије су показале високе нивое азот оксида и *MMP-9* код пацијената са активном пародонталном болешћу (399).

Експресија *MMP-9* се повећава са тежином пародонталне болести, те је доказана позитивна корелација између њене концентрације у гингивалној течности и пљувачки, и степена инфламације гингиве, дубине пародонталних цепова и миграције зуба (367, 400, 401). Описано је повећање концентрације *MMP-9* у гингивалној течности код хроничног гингивитиса, мада су вредности више уколико је инфламаторни процес активан (402, 403).

Kim је истраживала терапијске ефекте шестонедељне нехируршке терапије пародонталне болести мерењем клиничких параметара инфламације и концентрација *MMP-9* у пљувачки. Резултати су показали значајно смањење испитиваних концентрација три недеље након почетка терапије, док су се клинички параметри побољшали (404).

Детекција концентрације *MMP-9* може бити користан биомаркер за дијагнозу и контролу терапије пародонталних обољења (150). Резултати неких студија показали су да пушачи имају виши ниво *MMP-9* него непушачи међу пацијентима са и без пародонталних обољења (150). *MMP-9* из пљувачке, такође се користила у истраживањима као маркер инфламације пародонталних ткива, због виших концентрација код оболелих пацијената и нижих концентрација након оздрављења (398, 405). Саливарна *MMP-9* потиче углавном из неутрофила и кератиноцита гингиве (141, 392).

#### **6.4. ДИСКУСИЈА ПРИСУСТВА ПЕРИОДОНТОПАТОГЕНИХ БАКТЕРИЈА У ГИНГИВАЛНОЈ ТЕЧНОСТИ НАКОН БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ**

Усну дупљу човека насељава око 700 врста бактерија (406, 407). Око 50% ових врста још увек нису култивисане (164). Бактерије су локализоване у свим деловима усне дупље.

У пљувачки се налази „планктонска фаза” оралне микрофлоре и то око 109 микроорганизама по милилитру, који се гутају непрекидно. На тај начин дневно око 5 g бактерија дневно „нестане“ у стомаку. Дакле, њихов број се, на супрот повећању количине оралног биофилма, не умножава (408). Бактерије из усне дупље насељавају тврда и мека орална ткива. Док се микроорганизми стално уклањају са меких ткива (усне, образи) покретима језика, на површини зуба или на денталним материјалима, који су тврде подлоге, формира се дентални плак или биофилм, организована микробна заједница. Биофилм се састоји од адхезивних конзорцијума микроорганизама (углавном бактерија, мало археа, вируса, гљивица, амеба и практично непознате, али вероватно велике популације бактериофага). Биофилм је структурирана заједница бактеријских ћелија затворених у самопроизведен (хидратисани) полимерни матрикс (409). Биофилм на површини зуба може бити супрагингивални или субгингивални (408).

Биофилм је одговоран за развој каријеса, гингивитиса и пародонтопатије. Микробиологија оралног биофилма је врло комплексна и тема је бројних истраживања. Стварање оралног биофилма се одвија кроз три фазе (410). Прва фаза подразумева адхеренцију преобладајућих микробних колонизатора, најчешће стрептокока. Адхериране бактерије мењају своју околину стварајући повољне услове за адхеренцију генетички различитих бактерија, чиме настаје рани биофилм. Он представља заједницу састављену од аеробних и аеротолерантних бактеријских родова *Actinomyces*, *Veillonella*, *Haemophilus*, *Neisseria* и *Fusobacterium* (411). Процењује се да микроорганизми чине мање од 10% суве масе биофилма, док 90% чини екстрацелуларни матрикс (412). Екстрацелуларни матрикс се састоји од хетерогене мешавине полисахарида, протеина и екстрацелуларне ДНК, и његово формирање представља другу фазу формирања биофилма, након почетног пријањања и пролиферације микроорганизама (413). Супрагингивални биофилм локализован је на зубној глеђи и састављен је од факултативних и анаеробних врста (414). Супрагингивални биофилм узрок је неспецифичног запаљења гингиве (гингивитис). Ствара-



њем анаеробног окружења и апикалном прогресијом супрагингивалног плака, настаје субгингивални биофилм.

Субгингивални биофилм је тродимензионална структурирана заједница бактерија везаних за површину корена зуба. Спољном површином субгингивални плак окренут је ка гингивалном ткиву, а присутне бактерије могу да изазову његову инфламацију, односно гингивитис. Ову врсту биофилма карактерише континуирано прилагођавање променљивим условима оралне средине, односно динамичку равнотежу микроорганизама, ћелијског и одбрамбеног одговора домаћина (415).

Основу субгингивалног биофилма чине *Actinomices spp*, *F. nucleatum*, *T. forsythia*, *Sinergistetes spp.* и *Treponema spp.* У спољашњем слоју пријањајућег биофилма, најближе епителу и ћелијама одбране домаћина, налазе се агрегати и микроколоније *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* и *Parvimonas micra* (раније *Peptostreptococcus micros*) (416). Субгингивални биофилм представља заједницу анаеробних микроорганизама која може изазвати тежа пародонтална оштећења (408). Субгингивални плак се разликује од супрагингивалног, јер у његовом стварању осим присутних микроорганизама учествују ћелије и медијатори инфламације. Коронарни део субгингивалног плака богат је Грам позитивним, а апикални Грам негативним бактеријама, које могу да продру кроз припојни епител гингиве (417, 418). На оболелим местима уочена је већа преваленција и јасно повећан број *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* и *Tannerella forsythia* (419).

Један од циљева израђене дисертације био је утврђивање микробиолошког састава гингивалне течности молекуларно-генетичком *PCR* анализом. Пошло се од претпоставке да брушење зуба механички оштећује гингивално ткиво, посебно у случају када је демаркација препарације позиционирана у пределу гингивалног сулкуса, и тако изазива инфламацију гингиве. Брушење зуба може да промени састав гингивалне течности, дајући простора за развој микроорганизама који би могли штетно деловати на здравље гингиве, али и дубљих пародонталних ткива. С тим у вези, извршена је компарација састава оралне флоре гингивалног сулкуса, пре и након брушења (опсервациони интервали: пре брушења, 15 минута, 24 h и 72 h након брушења), са субгингивалном и еквингивалном позицијом границе брушеног и небрушеног дела зуба.

У односу на раније постављене теорије о утицају квантитета биофилма на развој оралних обољења, данас је актуелна „специфична плак хипотеза“ која потенцира патогеност само оних биофилмова у којима су присутни специфични микроорганизми-перио-

донтопатогени (37). Налаз ових микроорганизама у субгингивалном плаку резултује акутизацијом промена које већ постоје у пародонту и инфламаторном реакцијом гингиве.

У састав субгингивалног оралног биофилма улазе: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*), *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Treponema denticola* (420). У фази егзацербације повећава се број *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, што објашњава и њихов избор за детекцију *PCR* квалитативном анализом у овом истраживању.

Да би неки од описаних микроорганизама изазвао болест потребно је да испуни Кохове постулате прилагођене за пародонтална обољења: већа присутност у оболелим лезијама и одсутност на здравим местима; престанак болести након елиминације и рецидив након њихове поновне појаве; организам домаћина на њихово присуство реагује целуларним и хуморалним имуним одговором и продукцијом антитела; микроорганизми поседују факторе вируленције којима савладавају имунолошке одговоре домаћина (421, 422). Фактори вируленције микроорганизама су капацитети микроорганизама да нападају ткива домаћина кроз токсичне молекуле, бактерије и друге патогене да би добили храну или се везали за ћелије. Тако, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* има следеће факторе вируленције: леукотоксин, колагеназа, ендотоксин, епителни токсини, инхибиторни фактор фибробласта, и сматра се основним узрочником агресивне пародонтопатије. *Porphyromonas gingivalis* садржи колагеназу, протеазе, фибролизин, ендотоксин и фосфолипазу А и чешћи је код хроничне пародонтопатије (423-425). Егзацербација болести тумачи се поновним продором бактерија у таргетирано ткиво (426, 427).

С обзиром да испитаници у истраживању, након претходног пародонталног санирања, нису показивали знаке пародонталних обољења (*CPITN*=2), појава специфичних патогених компоненти, које су биле обухваћене *PCR* анализом говорила је у прилог акутизације болести и развоја запаљења гингиве.

Присуство наведених бактерија у течности гингивалног сулкуса првобитно је испитано пилот студијом којом су обухваћене две групе од по 10 испитаника, са субгингивалном и еквигингивалном позицијом демаркације препарације.

Већа заступљеност испитиваних бактерија уочена је код испитаника са субгингивалном позицијом демаркације. Са свим ограничењима везаним за величину узорка, може се извести закључак да су бактерије биле мање заступљене пре интервенције брушења зуба и то код свих испитаника.

Код испитаника са еквигингивалном позицијом демаркације препарације потврђено је статистички значајно веће присуство *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* у гингивалној течности 72 h након брушења, као и *Prevotella intermedia* у узорку добијеном 15 минута након брушења, у односу на контролне узорке. Разлике учесталости у осталим интервалима посматрања по питању *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* у односу на позицију демаркације препарације нису биле значајне ни за један посматрани период, у односу на вредности пре брушења.

Присуство узрочника се код обе групе испитаника мењало у току посматраног периода. Значајна разлика примећена је код испитаника са субгингивалном демаркацијом, и то за *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* и *Tannerella forsythia*. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* са повећањем присуства бактерија у периоду 24 h у односу на период 15 минута након брушења. Насупрот томе, *Prevotella intermedia* је била присутнија пре брушења у односу на период након 15 минута, што важи и за *Tannerella forsythia*, само са статистичком значајношћу.

Са свим ограничењима везаним за величину узорка, може се извести закључак да су бактерије биле мање заступљене пре интервенције брушења зуба и то код свих испитаника.

У резултатима дисертације уочено је да су испитивани периодонтопатогени у већем броју и проценту у гингивалној течности заступљени након брушења зуба. Исто тако, њихова заступљеност је већа у Г1, односно у случају субгингивалне позиције демаркације препарације, што је и хипотеза истраживања.

С тим у вези, утврђен је статистички значајно већи проценат заступљености *Porphyromonas gingivalis* у Г1 групи и то у току целог периода испитивања. Позитивни PCR налаз заступљенији је 15 минута (73,33%), а још више 24 h након брушења зуба (80%), у поређењу са вредностима пре интервенције (63,33%). Након 72 h присуство *Porphyromonas gingivalis* у гингивалној течности је мање, односно број бактерија одговара контролном узорку (63,33%). Варијације у добијеним вредностима у Г1 нису показале статистичку значајност.

Добијени проценти су значајно нижи у Г2, где пре почетка интервенције у гингивалној течности није пронађен ниједан *Porphyromonas gingivalis*, након 15 минута их је било у 10% случајева. Након 24 h испитивана заступљеност је износила 26,67%, да би се после 72 h спустила на 6,67%. У Г2 је присутна статистички значајна разлика у добијеним вредностима броја и процента *Porphyromonas gingivalis* у свим опсервационим интервалима.

Што се тиче изузетно патогеног *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, његов статистички значајно већи проценат је уочен у Г1 са субгингивалном демаркацијом препа-

рације и то у свим опсервационим интервалима изузев 72 h након брушења, када није било статистичке значајности.

У односу на заступљеност *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* пре препарације (Г1-53,33%; Г2-13,33%), заступљеност позитивног *PCR* налаза виша је 15 минута (Г1-73,33%; Г2-23,33%) а још виша 24 h након препарације (Г1-86,67%; Г2-60%), док је након 72 h та вредност позитивних *PCR* налаза минимално нижа (Г1-80%; Г2-56,67%).

У групи са субгингивалном демаркацијом препарације, позитивни *PCR* налази *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* статистички су значајно већи 24 h ( $p < 0,01$ ) и 72 h након препарације ( $p < 0,05$ ) у односу на опсервациони интервал пре препарације. У Г2, у односу на тај контролни период, заступљеност позитивних *PCR* налаза статистички је значајно више и 24 h и 72 h након брушења понаособ ( $p < 0,001$ ).

Поређењем заступљености овог периодонтопатогена након препарације у Г1 није утврђена статистички значајна разлика заступљености позитивних налаза између опсервационих интервала понаособ. У Г2, 24 h и 72 h након брушења зуба присутност *PCR* позитивних налаза *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* статистички је значајно виша у односу на њихову заступљеност 15 минута након брушења.

*Tannerella forsythia* је статистички значајно више присутна у Г1, у односу на Г2, у свим опсервационим интервалима ( $p < 0,001$ ). У односу на заступљеност *Tannerella forsythia* пре препарације (Г1-60%; Г2-16,67%), ове бактерије има више 15 минута (Г1-86,67%; Г2-40%), а још више 24 h након препарације (Г1-96,67%; Г2-60%), док је након 72 h ова вредност у гингивалној течности нижа (Г1-86,67%; Г2-40%).

У периоду након препарације у обе групе није било статистички значајних разлика у заступљености позитивних *PCR* налаза између опсервационих интервала.

Заступљеност позитивног *PCR* налаза о присуству периодонтопатогена *Prevotella intermedia* статистички се није значајно разликовала између испитиваних група ни у једном опсервационом интервалу.

У односу на заступљеност *Prevotella intermedia* пре брушења (у Г1 и Г2 13,33%), виша је заступљеност позитивног *PCR* налаза 15 минута (Г1-16,67%; Г2-20%), а још виша 24 h након препарације (Г1-36,67%; Г2-43,33%). Након 72 h заступљеност позитивних *PCR* налаза је нижа (Г1-33,33%; Г2-16,67%).

Утврђено је да су у обе групе позитивни налази о присуству *Prevotella intermedia* 24 h након препарације статистички значајно заступљенији. У периоду 24 h након препарације у Г1 позитивни налази су заступљенији но 15 минута после препарације, а у Г2 су заступљенији од вредности 72 h после препарације ( $p < 0,05$ ).

Треба указати на чињеницу да *PCR* техника у овом истраживању није вршила квантитативну, већ само квалитативну анализу микроорганизама, те стога није могуће закључити у којој мери је заправо промењен њихов број. Утврђивање броја бактерија имало би већи научни и клинички значај и биће предмет будућих истраживања. Са друге стране, добијени резултати могу да буду јасна смерница у прелиминарним закључцима утицаја брушења зуба на инфламацију гингиве и дати јасне смернице како водити даља истраживања у циљу превенције настанка пародонталних обољења.

Добијени резултати су у позитивној корелацији са резултатима других аутора. Sanz и сар. су показали да су микроорганизми субгингивалног плака узрочници деструктивних промена на пародонталном ткиву који од почетног гингивитиса резултирају развојем тежих случајева пародонтитиса (428). Дуготрајна и ефикасна контрола субгингивалног плака од пресудног је значаја за заустављање прогресивних процеса на потпорном апарату зуба. Редовни саставни делови микробне флоре у пародонталним лезијама су Грам негативне бактерија као што су: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Spirochetes (Treponema denticola)* и *Capnocytophaga spp.* (191, 429, 430). Присуство периодонталних патогена у плитким џеповима је знак инфекције, а њихова перзистенција у дубоким пародонталним џеповима знак активне или егзацербиране хроничне пародонтопатије (194).

Инфламацију гингиве карактерише присуство Грам негативних бактерија – *Treponema*, *Fusobacterium* и анаероба *Streptococcus* и *Actinomyces*, док су код инфламације пародонта најзаступљеније бактерије *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (431).

Истраживање Huang и сар. указује на значајну разлику између микроорганизама код гингивитиса, у поређењу са здравом гингивом, и присуство бактерија рода *Aggregatibacter*, *Prevotella*, *Treponema*, *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Bacteroidetes*, *Fusobacterium* (432).

Nowicki и сар. у свом истраживању промена микробиоте код гингивитиса, показали су да су код здравог ткива гингиве присутне бактерије *Streptococcus*, *Neisseria*, и *Capnocytophaga*, док су бактерије које предиспонирају болест *Leptotrichia*, *Prevotella* и *Fusobacterium* биле присутне код гингивитиса (433).

Утврђена је позитивна корелација између крварења при сондирању сулкуса и присуства бактерија *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Leptotrichia*, *Selenomonas species* у гингивалном сулкусу испитаника са инфламацијом гингиве (434).

Са друге стране, ови микроорганизми могу бити присутни и у здравом потпорном ткиву зуба. Watson и сар. су у својој студији изоловали *Porphyromonas gingivalis* у 80% код

здраве деце у току и након пубертета (435). Petrović је, аналогно томе, доказала да студенти старости  $22,14 \pm 1,62$  година имају 95,24% ове бактерије идентификоване у субгингивалном оралном биофилму (307). До истих резултата дошли су Cruza и сар. (436) са присуством *Porphyromonas gingivalis* код 80% здравих пацијената, и Lau и сар. 81,3% (437).

Резултати преваленце патогених микроорганизама у оралном биофилму су често контрадикторни, због варијација у дистрибуцији генотипа, захваљујући етничком и географском пореклу испитаника, оралној хигијени, разлици у исхрани, конзумацији алкохола, дувана и др. (438).

Субгингивални биофилм у коме су присутне *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* и *Tannerella forsythia*, било појединачно или у комбинацији, повезан је са високим ризиком за прогресију пародонталних обољења (439-441). Истраживања показују да се субгингивални биофилм код присутне пародонталне болести карактерише присуством бактерија *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema spp*, *Fretibacterium spp* (442).

Пародонтални патогени *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* и *Tannerella forsythia* се чешће откривају у дубоким ( $>5$  mm) него у плитким ( $<4$  mm) пародонталним џеповима (439). Једноставно, присуство ове три бактерије у субгингивалном биофилму представља „црвени комплекс“ који је присутан код тешких облика пародонталне болести (189).

Такође, резултати других истраживања показују присуство микроорганизама рода *Treponema*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, и *Fusobacterium* у субгингивалним узорцима код пацијената са хроничном пародонтопатијом (443).

Велики број истраживача препоручује употребу микробиолошких тестова као додатног дијагностичког алата у разликовању различитих облика пародонталне болести. Карактеризација субгингивалне микрофлоре пре, у току и након терапије је, са једне стране добро дијагностичко средство, а са друге валидан критеријум ефикасности терапије. На основу састава субгингивалног биофилма може се регулисати терапија оштећења пародонта (192, 444-447). Аутори сугеришу да откривање пародонталних патогена, изнад одређених „критичних“ нивоа, након активног третмана показују повећан ризик од рецидива обољења (439, 444).

Постоје разне додатне микробиолошке методе за прецизну дијагнозу и лечење болести пародонтопатије које се заснивају на прегледу анаеробне културе специфичним серолошким тестовима за врсту, *DNK* тестовима, ензимским имуносорбентним тестовима (*ELISA*) и *PCR* методом (191, 445, 448-450).

## 6.5. ДИСКУСИЈА КОРЕЛАЦИЈЕ *PCR* НАЛАЗА ПЕРИОДОНТОПАТОГЕНА И ЕКСПРЕСИЈЕ МАРКЕРА ИНФЛАМАЦИЈЕ У ГИНГИВАЛНОЈ ТЕЧНОСТИ

Многи аутори су закључили позитивну корелацију присуства периодонталних патогена са експресијом гена цитокина у гингивалној течности и гингивалном ткиву (451-454). Генерални закључци у покушају проналаска корелације између биомаркера и микробиолошких података се не могу извести с обзиром да су ограничени у броју испитаних бактеријских сојева и броју тестираних цитокина.

Експресија цитокина *IL-1 $\beta$*  је изузетно регулисана (100). Док је *IL-1 $\alpha$*  биолошки одмах активан, *IL-1 $\beta$*  се синтетише као прекурсор про-*IL-1 $\beta$*  (31 *kDa precursor protein*), и уз помоћ инфламазома постаје биолошки активан (95, 99, 101). Murakami и сар. доказују да посредством периодонтопатогена *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* и *Porphyromonas gingivalis* долази до активирања инфламазома (102).

Синтеза *VEGF* одвија се под утицајем *HIF-1 $\alpha$* , као реакција организма на смањење концентрације кисеоника у ћелијама (117). Присуство анаеробних бактерија у гингивалном сулкусу, оштећења ендотелних ћелија, поремећаји микроциркулације, инфилтрација запаљенских ћелија, активност цитокина и ендотоксина, разлози су хипоксије ћелија пародонта који доводе до синтезе *VEGF* (111-113, 115, 116).

Што се тиче периодонтопатогена *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Prevotella intermedia* чији је позитиван налаз уочен у обе испитиване групе, тестовима за поређење вредности параметара између независних узорака, нису утврђене статистички значајне разлике вредности концентрација биохемијских параметара *IL-1 $\beta$* , *VEGF* и *MMP-9* у гингивалној течности. У случају ових бактерија, повећана концентрација испитиваних маркера инфламације примећена је код већег броја позитивних *PCR* налаза. Код *Tannerella forsythia* статистички значајно више вредности концентрације *VEGF* у гингивалној течности утврђене су при позитивном *PCR* налазу у Г2, и то пре ( $p < 0,05$ ) и 15 минута после препарације ( $p < 0,01$ ). Иако без статистички значајних разлика, у осталим случајевима вредности концентрација биохемијских параметара у преовлађујућем броју су више при позитивном *PCR* налазу, што указује на повезаност присуства ове бактерије и концентрација биохемијских параметара.

Teles и сар. су истраживали однос између биомаркера гингивалне течности (*IL-1 $\beta$* , *IL-8*, *MMP-8*), нивоа 40 бактеријских сојева и клиничких параметара пародонталне болести, откривши позитивну корелацију (455). Аутори су закључили да су бактерије

црвеног комплекса биле у корелацији са експресијом тестираних цитокина (455), док су Dahlen и сар. утврдили статистички значајно повећање *IL-1 $\beta$*  и *IL-8* код пацијената са пародонтитисом (456).

Други аутори доказују да је ниво *IL-1 $\beta$*  повишен код пацијената са тежим пародонталним оштећењем у поређењу са пацијентима са благим и умереним пародонтитисом (457). Такође, Rescala и сар. су утврдили повишен ниво *IL-1 $\beta$*  код пацијената са дубљим у односу на плитке пародонталне цепове (458).

Позитивну корелацију између присуства патогена *Porphyromonas gingivalis* и *Fusobacterium nucleatum* и производње цитокина *IL-6* из хуманих моноцита доказали су Вақи и сар. (459). Истраживање је у складу са налазима Roberts и сар. који су показали способност моноклеарне ћелије пародонталног лигамента да реагује на пародонталне патогене, њихове факторе вируленције, и индукује експресију проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина (*IL-1 $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-12*, *IL-13*, *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* ) у ткивима захваћеним пародонталном болешћу (460). Студија Ramseier и сар. је закључила да комбинација дијагностичких процедура, концентрација *MMP-8* и *MMP-9* у пљувачки, присуство бактерија и урађени ортопантомограми, може предвидети развој пародонталног обољења (461).

*MMP-9*, заједно са *IL 1 $\beta$*  и *Porphyromonas gingivalis* може послужити за израчунавање кумулативног ефекта развоја оштећења пародонта, те се може и успешно користити као дијагностичко средство, посебно у истраживањима јавног здравља великих размера, у којима темељан пародонтолошки преглед није изводљив (462, 463).

Показано је да је експресија *MMP-9* повезана са присуством *Chlamydia pneumoniae* код пацијената коронарним атеросклеротични плаком (464). Иста бактерија пронађена је и у дубоким пародонталним лезијама и такође је повезана са експресијом *MMP-9* (465). *Chlamydia pneumoniae* је са *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Prevotella intermedia* идентификована у атероматозном плаку (466).

Студија Soder и сар. је доказала значајно више присуство *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella nigrescens* и *Treponema denticola* у пародонталним цеповима и већу експресију *MMP-8* и *MMP-9* код оболелих пацијената у односу на здрав пародонт (372).

Јакоб и сар. су показали да присуство *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola* повећавају укупан ниво концентрације *MMP-8* у гингивалној течности (467). Даља истраживања истих аутора показала су да је присуство *Tannerella forsythia* и *Treponema denti-*



*cola* повезано са повећањем концентрације *MMP-9* у већини тестираних узорака гингивалне течности (468).

Такође, Sorsa и сар. доказују да *Treponema denticola* и *Porphyromonas gingivalis* могу активирати про- *MMP-8* и *MMP-9*, што недвосмислено показује да су уједињени у етиопатогенези обољења пародонта (469). Резултати једног истраживања су показали да индукцијом и активацијом про-*MMP-9*, *Porphyromonas gingivalis* утиче на прогресију оралног карцинома (470), док су Yee M и сар. известили утицај ове бактерије на стимулацију интерлеукина *IL-6* и *IL-8* (471).

Реверзибилност насталих промена брушења зуба са субгингивалном и еквингингивалном демаркацијом препарације указује на потенцијално малу вероватноћу да овом свакодневном стоматолошком процедуром дође до трајнијег оштећења пародонталног ткива. Изведено истраживање је клиничка проспективна студија рађена на посебно одабраној хомогеној групи испитаника што је чини посебном у досадашњој литератури. Оптимистични карактер презентованих резултата чини брушење безбедном протетском процедуром са малим клиничким импликацијама.

## **6.6. ДИСКУСИЈА КВАЛИТАТИВНЕ И КВАНТИТАТИВНЕ ДИСТРИБУЦИЈЕ БИОАЕРОСОЛА ЗА ВРЕМЕ БРУШЕЊА ЗУБА СА РАЗЛИЧИТОМ ПОЗИЦИЈОМ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ**

Одређени стоматолошки и медицински третмани доводе до стварања аеросола као резултат производње великог броја ситних честица које се могу удисати ваздухом (472).

Приликом стоматолошких процедура, као што је брушење зуба, помоћу високо-туражних турбина распршује се велика количина аеросола, чиме настаје „влажно“ орално окружење (473).

Аеросоли који настају садрже бројне микроорганизме, пореклом из усне дупље пацијента, па их означавамо као биоаеросоли. Биоаеросоли се дефинишу као честице пречника мањег од  $50 \mu m$ , и имају способност дужег опстанка у ваздуху пре него што дође до њиховог испаравања или слегања на површине (225, 226).

Стоматолошке процедуре које захтевају стварање биоаеросола могу инфицирати незаштићене делове тела терапеута и његових сарадника, као што су кожа, слузокожа, конјунктива, или честице аеросола могу бити удахнуте и изазвати унакрсне инфекције (474). Због саме анатомске близине усне дупље, назофаринкса и доњих дисајних путева,

омогућава се комуникациони отвор за кретање и пролазак микроорганизама пореклом из оралне флоре у ова подручја, чији нису нормални становници (475).

На тај начин, извођењем стоматолошких процедура код пацијената са инфективним болестима омогућава се изворни пут заразе (475). Честице биоаеросола димензија 1 до 10  $\mu\text{m}$  имају могућност продора и таложења у трахеобронхијалном стаблу, међутим честице димензија  $\leq 5 \mu\text{m}$  инхалацијом могу доћи до доњих дисајних путева (476). Највећу опасност представљају честице  $< 1 \mu\text{m}$ , јер удисањем могу доспети до најдубљих структура плућа – алвеола. (228, 229).

Опасност од продирања биоаеросола у респираторне путеве, додатно је подстакнута чињеницама дугог опстанка биоаеросола у ваздуху. Доказано је да је време потребно за слегање честица биоаеросола димензија 10  $\mu\text{m}$  8,2 минута, за 1  $\mu\text{m}$  потребно је 12 сати, док је за честице величине 0,5  $\mu\text{m}$  потребан чак 41 сат, у мирном ваздуху (475). Слегање честица може довести до контаминације предмета и површина и последичних болничких инфекција (477).

Биоаеросоли настали током стоматолошких третмана садрже микроорганизме који су орални резиденти, међутим, могу да садрже и условно патогене или патогене врсте. Грам позитивне коке чине највећи проценат биоаеросола 74% –100%, док је мања процентуална заступљеност Грам позитивних бацила и гљивица (239). Међутим, осим њих могу бити присутне и опортунистичке патогене бактерија рода *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* и гљивица *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Raecilomyces* које могу бити потенцијални узрочници инфекција (245).

Чињеница да је доказано присуство респираторних бактеријских патогена у плувачки инфицираних особа током акутних и хроничних фаза болести, постоји потенцијална опасност од инфицирања путем биоаеросола у стоматолошкој ординацији (478). Међутим, осим код инфицираних пацијената, неки респираторни патогени могу бити присутни у оралној флори системски здравих или асимптоматских особа (479). Бактерије изазивачи респираторних инфективних обољења, као што су *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, и *Mycobacterium tuberculosis* могу бити саставни део биоаеросола, и доказано је да су присутни код 36% пацијената са респираторним болестима (475, 480).

У дисертацији се пошло од претпоставке да брушење зуба доводи до стварања биоаеросола, који садрже микроорганизме, чија се количина удаљавањем од места извора смањује. За узимање узорак у испитивању су коришћене Петријеве шоље, постављене

на различитој удаљености од извора стварања: 20 cm (зона брушења), 40 cm (зона инструментаријума), 60 cm (зона посматрача), које су биле изложене створеном биоаеросољу током препарације. У циљу елиминације могућности присуства микроорганизама који нису пореклом из усне дупље пацијента, извршена је детаљна припрема и стерилизација инструментаријума, чишћење и припрема радног места, припрема лекара и радног поља. Контролном Петријевом шољом доказано је одсуство микроорганизама у ваздуху, 15 минута пре почетка брушења зуба, с обзиром да су све шоље биле стерилне.

Добијени резултати показују велики број колонија аеробних и факултативно анаеробних микроорганизама на Петријевим шољама постављеним на различитој удаљености од усне дупље пацијента. Највећи број микроорганизама лоциран је на 20 cm од радног поља, где се обављала препарација зуба, са статистички високо значајним смањењем броја формираних колонија са повећањем удаљености у обе испитиване групе.

Број аеробних колонија у Петријевој шољи (CFU/Петријева шоља) на 20 cm је статистички значајно виши од броја колонија у остале две шоље, у Г1  $214,50 \pm 265,66$ , односно Г2  $213,47 \pm 236,89$ , такође број колонија формиран на 40 cm удаљености, у Г1  $49,90 \pm 69,71$  и Г2  $34,40 \pm 34,40$ , статистички значајно виши у односу на шољу удаљености 60 cm, Г1  $17,07 \pm 18,01$  и Г2  $12,33 \pm 12,57$ , са изузетно високим нивоима значајности ( $p < 0,001$ ).

Такође, утврђене су значајне разлике у количини колонија факултативно анаеробних микроорганизама са веома великим утицајем растојања од места препарације зуба на промену броја формираних колонија, а ефекат је виши у Г2 ( $p < 0,001$ ) но у Г1 ( $p < 0,01$ ).

У Г1 и у Г2 је статистички знатно већи број факултативно анаеробних колонија (CFU/Петријева шоља) утврђен на удаљености од 20 cm (Г1  $73,40 \pm 148,82$ , и Г2  $109,33 \pm 175,91$ ), у односу на шољу удаљену 40 cm (Г1  $39,87 \pm 108,32$ , Г2  $15,07 \pm 54,38$ ), како и на шољу на 60 cm удаљености (Г1  $24,20 \pm 91,92$ , односно Г2  $5,33 \pm 18,14$ ).

Квалитативна заступљеност колонија аеробних микроорганизама на Петријевим шољама детектованим на различитој удаљености од усне дупље пацијента процентуално у Г1 је била са највећом заступљеношћу *Staphylococcus epidermidis*-а, чије је присуство релативно константно на свим локацијама Петријевих шоља, затим *Neisseria spp.* чије се присуство процентуално смањује са удаљеношћу, и *Streptococcus intermedius* чије је присуство релативно константно без обзира на локацију Петријевих шоља.

У Г2 у односу на број узорака процентуално су најзаступљенији налази *Neisseria spp.* са присутним опадањем броја колонија са порастом удаљености Петријевих шоља, и

*Staphylococcus epidermidis* и *Streptococcus oralis* чије је присуство релативно константно на свим удаљеностима.

Док је у односу на број узорака у обе испитиване групе процентуално најзаступљенија факултативно анаеробна бактеријска колонија *Haemophilus parainflanzae*, чије је присуство релативно константно на свим удаљеностима, након које по заступљености следи *Streptococcus sanguinis*.

У односу на укупан број колонија на одстојањима 20, 40 и 60 cm, заступљеност аеробних колонија микроорганизама у Петријевим шољама (CFU/Петријева шоља) у Г2 на свим удаљеностима најзаступљеније су колоније *Streptococcus oralis-a*, следе *Neisseria spp.* и *Streptococcus intermedius*, односно, у Г1 су најзаступљеније *Neisseria spp.*, и колоније *Staphylococcus epidermidis-a* који је у овом смислу најзаступљенији на 60 cm удаљености од места препарације зуба.

Што се тиче факултативних анаероба, у односу на укупан број колонија у Г1 процентуално су најзаступљеније колоније *Haemophilus parainflanzae*, са смањењем броја колонија пропорционално расту удаљености од радног поља, а иза њих следе колоније *Streptococcus sanguinis*, са тенденцијом опадања броја колонија са порастом удаљености.

У Г2 апсолутно највећи број (CFU/Петријева шоља) чиниле су колоније *Haemophilus parainflanzae* у односу на укупан број колонија факултативно анаеробних бактерија на удаљености од 40 и 60 cm, међутим, најближе извору радног поља (20 cm) била је највећа заступљеност *Streptococcus sanguinis-a* и *Aerococcus urinae*.

Квантитативно и квалитативно праћење микроорганизама вршено је и узимањем брисева пода усне дупље у четири опсервациона интервала, пре брушења, након 15 минута, 24 h и 72 h од брушења. На овај начин доказано је да су сви микроорганизми развијени на Петријевим шољама пореклом из усне дупље пацијента, чиме је искључена могућност присуства микроорганизама из других извора, који би могли да утичу на резултате истраживања.

У испитиваним брисевима пода усне дупље утврђени број аеробних колонија (CFU/Петријева шоља) 15 минута након брушења зуба је нижи у обе испитиване групе у односу на број колонија из контролног бриса, са порастом броја колонија након 24 h од почетка препарације у обе групе. Након 72 h од брушења број аеробних колонија битно расте и већи је и у односу на контролни брис у Г1, док у Г2 долази до пада броја колонија и он је релативно близак броју колонија из контролног бриса пре брушења зуба. Док је утврђени број факултативно анаеробних колонија (CFU/Петријева шоља) у обе групе 15

минута након брушења нижи у односу на број колонија из контролног бриса и још мањи након 24 h од брушења.

Високотуражне турбине и ултразвучни скалери користе воду као расхладни систем уобичајеног протока 10 до 40 mL по минути (481), док је брзина протока пљувачке током истог временског периода 0,4-0,5 mL (482).

На овај начин водени расхладни системи турбина доводе до брзог испирања усне дупље пацијента током брушења зуба и испирања присутних микроорганизама који се у њој налазе. Из тих разлога, број колонија аеробних микроорганизама изолованих из брисева усне дупље пацијентата 15 минута након брушења је мањи у односу на контролне брисеве пре брушења зуба. Након 24 h долази до пораста броја колонија у усној дупљи, а након 72 h број колонија је већи или сличан броју колонија у узорцима пре брушења зуба.

Инфламаторни потенцијал брушења зуба огледа се порастом броја колонија након брушења, у односу на стање пре, поготово у групи са субгингивалном позицијом демаркације препарације, где је број колонија процентуално већи након три дана од брушења зуба. Са друге стране, присутан је опадајући тренд позитивних налаза факултативно анаеробних колонија кроз опсервациони период, што се може објаснити променама у условима средине. Такође, постојање бактеријског синергизма и антагонизма може бити узрок смањења појединих, односно раста других бактеријских култура (165, 179).

Позитивни налази аеробних микроорганизама у контролном и студијским брисевима у односу на број узорака показују процентуално највећу заступљеност *Neisseria spp.* са релативно константним присуством кроз опсервациони период и у контролном и студијским брисевима, након чега следи заступљеност *Streptococcus intermedius* у Г1. Такође, највећа заступљеност *Neisseria spp.* прати и Г2 у брисевима пода усне дупље пацијентата, након које по заступљености, додуше мање, чине колоније *Streptococcus oralis*-а и *Streptococcus intermedius*-а са стабилним присуством кроз опсервациони период.

Што се тиче позитивних налаза факултативно анаеробних бактерија у обе групе у односу на број узорака процентуално су најзаступљенији позитивни налази колонија *Haemophilus parainflanzae*, затим следе налази *Streptococcus sanguinis*-а у контролном и студијским брисевима током опсервационог периода.

У односу на укупан број колонија такође су најзаступљеније аеробне колоније бактерија *Neisseria spp.* и *Streptococcus intermedius*-а у Г1 у контролним и студијским брисевима у опсервационим интервалима. Слична процентуална заступљеност микроорганизама је и у Г2 – *Streptococcus oralis*, *Streptococcus intermedius* и *Neisseria spp.* док је најзаступљенија факултативно анаеробна колонија *Haemophilus parainflanzae* у обе групе.

У бројним истраживањима других аутора, најчешће изоловане бактеријске врсте из денталних биоаеросола биле су *Staphylococcus aureus*, бета хемолитички *Streptococci*, *Escherichia coli*, спорогене бактерије, гљивице рода *Cladosporium* and *Penicillium*, и *Micrococcus* (483, 484). Singh и сар. доказују присуство *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, и *Streptococci* у највећем проценту у биоаеросолима током стоматолошког третмана (484). Међутим, поред коменсалних микроорганизама, различити иницирајући фактори могу допринети колонизацији патогених микроорганизама у усној дупљи.

Бројне студије су доказале велики утицај високотуражних турбина и ултразвучних скалера на стварање и дистрибуцију биоаеросола током рутинских стоматолошких третмана (485, 486). Clarkson и сар. наводе да се највећа количина аеросола, чак 56% свих стоматолошких интервенција, ствара током рада са високотуражним турбинама, које се свакодневно користе у стоматолошкој протетици (487).

Инфективне честице у ваздуху пореклом из биоаеросола могу бити главни фактори ризика преношења инфективних болести, јер су и стоматолог и пацијент изложени великом броју микроорганизама (484). Vasu и сар. у истраживању су показали да је код стоматолошких хигијеничара присутна већа учесталост симптома упорног кашља, иритације носне слузокоже, цурења носа и свраба, као и сувоће коже у односу на остало болничко особље (488).

Биоаеросоли који настају током стоматолошких третмана осим бактерија, могу бити носиоци и респираторних вируса, и пут преношења вируса *SARS-CoV-2*. Дужи опстанак биоаеросола у ваздуху може угрозити особље присутно у стоматолошкој ординацији. Недавно је доказано да вирус *SARS-CoV-2* може знатно дуже опстати у ваздуху у виду биоаеросола од изазивача осталих респираторних инфективних микроорганизама (489), док резултати другог истраживања наводе чак 9 дана периода опстанка коронавируса на површинама (490).

Различити стоматолошки захвати, лоша орална хигијена, присуство оралних запаљенских реакција могу утицати на развој фокалних инфекција, узроковане микроорганизмима пореклом из усне дупље, уношењем у крвни или лимфни систем (491). Фокалне инфекције могу настати као последица оштећења насталих повредом ткива, транслокацијом бактерија или као последица инфламације због компромитованог имунитета (492).

Орални микробиом садржи опортунистичке патогене, који услед оштећења гингиве или оралне слузокоже могу доспети у крвоток (493). Због тога је потребно додатно усмерити пажњу приликом лечења пацијената који су на имunosупресивној или продуженој антибиотској или кортико терапији, с обзиром да је доказано да су код таквих пацијената

чешће инфекције изазване микроорганизмима за које се сматра да нису патогене код здравих људи (484).

Примена ултразвучних скалера, вађење зуба, хируршке интервенције и други третмани могу утицати на настанак бактеријемije, а ризик за њихов настанак је већи код пацијената са хроничним пародонтитисом због продора бактерија у субмукозно везивно ткиво (491, 494, 495).

Бактеријемije изазване стоматолошким захватима су углавном привремене и реверзибилног карактера. Процењено је да је продор колонија микроорганизма у крвоток 1–10 по *mL*, са постепеним опадањем бактерија у периоду од 10 минута (496). Међутим, код особа са имунокомпромитованим имуним системом, као што је последица леукемије, повећава се ризик за настанак системских обољења и развоја фокалних оралних инфекција (491).

Доказано је да одређене врсте стафилокока, стрептокока и ентерокока под утицајем бактеријемije могу колонизовати претходно оштећен ендокард срчаног мишића и изазвати инфективни ендокардитис, док инфекције изазване оралним стрептококама групе вириданс, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, узрокују чак 20% свих инфективних ендокардитиса (497, 498).

Током стоматолошких процедура, као што су вађење зуба, оралнохируршке интервенције, лечење субгингивалног каријеса или брушење зуба, може доћи до јатрогених оштећења ткива гингиве или слузокоже, која код ризичних пацијената могу изазвати пролазну бактеријемiju и инфективни ендокардитис (498, 499).

Sunha и сар. у свом истраживању приказују пацијента са инфективним ендокардититисом и компликацијама у виду церебралног васкуларног инфаркта и тромбоемболијом доњег екстремитета, узрокованим бактеријом *Streptococcus intermedius*, а као последица стоматолошког третмана (500).

У ретроспективној студији Drangsholt, доказано је да је 7,5% свих инфективних ендокардитиса повезано са стоматолошким процедурама (501).

Такође, бактерија *Streptococcus sanguinis* која је нормални становник усне дупље, продором у крвоток потенцијално може изазвати агрегацију тромбоцита у *in vitro* условима и последично утицати на настанак коронарне тромбозе и следственог инфаркта миокарда (502).

Присуство инфекција пародонталног ткива и периодонтопатогених микроорганизма могу бити фактори ризика за развој коронарних обољења (503). Pallasch T.J и сар. у својој студији истичу да је код 7% можданих апсцеса потенцијални узрок стоматолошки

захват и последична бактеријемија, а укупна инциденца оралним микробиомом износи 0,09-0,84 случајева годишње на милион становника (504).

Код потенцијалног апсцеса оралног порекла најчешћи изолати биле су анаеробне бактерије, Грам-позитивне коке и штапићи и Грам негативни штапићи (505). У једном истраживању приказан је случај менингитиса изазваног *Streptococcus oralis* током стоматолошког третмана вађења зуба (506).

Микроорганизми *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* могу бити присутни у оралном микробиому пацијената са болесним пародонтом, који су у истраживању Slots и сар. представљени као потенцијални респираторни патогени (507). Док су оралне бактерије које су најчешће потврђене код пнеумонија биле *Streptococcus intermedius*, *Actinomyces spp.*, *A. actinomycetemcomitans* и *Campylobacter rectus* (491). Орална колонизација респираторним патогенима као што су *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* код имунодефицијентних особа повећава ризик за настанак обољења плућа (508, 509). Бактерија која је једна од најдоминантнијих у оралној микробној флори – *Streptococcus viridans*, често се сматра изазивачем инфекција као што су сепса, менингитис и инфективни ендокардитис (510, 511). Такође, *Streptococcus mutans* се доводи у везу са бројним системским обољењима, због улоге ове бактерије у инвазији крвних судова, оштећењу ендотелних ћелија и утицају на експресију MMP-9 (512).

У развоју и прогресији оралних карцинома доказано је да може бити укључено присуство различитих врста микроорганизама усне дупље (513). Присуство анаеробних врста бактерија *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Veillonella* и *Clostridium*, и појединих аероба рода *Haemophilus*, *Enterobacteriaceae* и *Streptococcus* чешће се јавља код тешких обољења као што су орални карциноми у поређењу са здравом слузокожом усне дупље (514). Такође, у таквим стањима је доказано присуство оралних бактерија у цервикалним лимфним нодусима и метастатским лимфним чворовима, у поређењу са здравим (515, 516).

Брушење зуба свакако представља ризик за настанак инфекције терапута, помоћног стоматолошког особља и особа које се налазе у стоматолошкој ординацији. Контрола ширења инфекција и употреба заштитне опреме представља императив за спречавање могућих заразних обољења изазваних микробима присутним у усној дупљи пацијената. Познавање састава оралне флоре, као и дистрибуције биоаеросола битна је ставка у превенцији јатрогених оштећења изазваних коришћењем високотуражних машина у стоматолошком третману.



## 7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу постављених циљева истраживања и добијених резултата, може се закључити следеће:

1. Брушење зуба довело је до статистички значајног повећања вредности гингивалног индекса и индекса крварења гингиве у обе експерименталне групе, са највећим добијеним вредностима непосредно након брушења и нижим вредностима у осталим опсервационим интервалима након брушења зуба. Статистички значајно веће вредности гингивалног индекса и индекса крварења гингиве добијене су у случају субгингивалне позиције демаркације препарације зуба у поређењу са еквигингивалном.
2. Вредности концентрација *IL-1 $\beta$*  и *VEGF* значајно расту непосредно након брушења зуба, раст се наставља и након 24 h. Веће вредности уочене су у случају субгингивално позициониране демаркације препарације. Вредности концентрација испитиваних параметара опадале су са временом, те су се приближиле почетним након 72 h, што указује на реверзибилност инфламаторних промена у обе експерименталне групе.
3. Вредност концентрације *MMP-9* непосредно након брушења зуба мања је у односу на контролне вредности пре брушења, а затим расте у интервалима након брушења зуба, са већом значајношћу у групи са субгингивалном позицијом демаркације. Пораст концентрације *MMP-9* у гингивалној течности 24 h након брушења зуба указује да брушење може да утиче на инфламацију гингиве. Са друге стране, пад истих након три дана указује на реверзибилност насталих промена.
4. Површина и заобљеност једра смањиле су се непосредно након брушења зуба код оба типа демаркације препарације, уз примећен пораст вредности током времена опсервације. Промена циркуларности једра примећена је и у групи са субгингивалном и еквигингивалном демаркацијом препарације у виду благог пораста, са постепеним опадањем кроз опсервациони период. Вредности *Feret* и *MinFeret* смањиле су се у обе испитиване групе непосредно након периода брушења зуба, са статистичком значајношћу у групи са субгингивалном позицијом демаркације, и благим порастом током времена. У групи испитаника са субгингивалном позицијом демар-

- кације дошло је до статистички значајног пораста вредности оптичке густине што указује на битан ефекат субгингивалне позиције демаркације зуба на испитивани параметар.
5. Заступљеност периодонтопатогена (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*) статистички је значајно виша у интервалима након брушења зуба, у односу на заступљености пре, са порастом након 15 минута и 24 h од брушења зуба и смањењем заступљености бактерија након 72 h или враћањем на почетне вредности пре брушења зуба. Присуство периодонтопатогених бактерија је статистички значајно веће у групи са субгингивалном позицијом демаркације препарације у односу на еквигингивалну током целог периода испитивања.
  6. Вредности концентрација параметара *IL-1 $\beta$* , *VEGF* и *MMP-9* у гингивалној течности су више при позитивном *PCR* налазу периодонтопатогена (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*) што указује на повезаност присуства испитиваних бактерија и вредности концентрација биохемијских маркера инфламације у гингивалној течности.
  7. Порастом растојања од радног поља (усне дупље пацијента) сразмерно се смањило број бактеријских колонија на Петријевим шољама у обе испитиване групе. Квантитативна заступљеност колонија аеробних и факултативно анаеробних микроорганизама на Петријевим шољама на растојању 20 cm од радног поља је статистички значајно виша од броја колонија на шољама на растојањима од 40 и 60 cm са изузетно високим нивоима статистичке значајности.
  8. Квалитативно најзаступљеније аеробне колоније на Петријевим шољама при испитивању дистрибуције биоаеросола су *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria spp*, *Streptococcus intermedius*, док су најзаступљеније факултативно анаеробне бактеријске колоније *Haemophilus parainflanzae* и *Streptococcus sanguinis* у обе испитиване групе са варијацијама у броју колонија.
  9. Квалитативни микробиолошки састав брисева пода усне дупље је у корелацији са заступљеношћу колонија на Петријевим шољама при испитивању дистрибуције биоаеросола, са најзаступљенијим позитивним налазима истих аеробних и факултативно анаеробних микроорганизама.

10. Квантитативна заступљеност аеробних микроорганизама у испитиваним брисевима пода усне дупље непосредено након брушења зуба је нижа у обе испитиване групе у односу на број колонија из контролних брисева. Након тога, у случају субгингивалне демаркације препарације долази до пораста броја колонија, док код еквигингивалне препарације уочавамо пад броја колонија. Тиме се доказује инфламаторни ефекат брушења зуба, који је израженији у групи са субгингивалном позицијом демаркације препарације зуба. Број утврђених колонија факултативно анаеробних бактерија после брушења зуба је нижи у односу на број колонија контролних брисева и опада кроз опсервационе интервале.
11. Резултати истраживања указују на реверзibilну инфламацију ткива гингиве изазвану брушењем зуба са већим интензитетом промена код субгингивалне позиције демаркације препарације. Реверзibilност насталих промена указује на малу вероватноћу трајнијих оштећења пародонталног ткива изазваних свакодневним протетским третманом. Правилним избором клиничке процедуре превенира се развој пародонталних болести, смањује се могућност настанка јатрогених оштећења која могу угрозити терапијски ефекат и обезбеђује се дуготрајност фиксних протетских надокнада.

## 8. ЛИТЕРАТУРА

1. Brunton PA, Ratnayake J, Loch C, Veerasamy A, Cathro P, Lee R. Indirect Restorations and Fixed Prosthodontics: Materials and Techniques Used by General Dentists of New Zealand. *Int J Dent*. 2019;2019:5210162.
2. Paniz G, Nart J, Gobbato L, Mazzocco F, Stellini E, De Simone G, et al. Clinical Periodontal Response to Anterior All-Ceramic Crowns with Either Chamfer or Feather-edge Subgingival Tooth Preparations: Six-Month Results and Patient Perception. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2017;37(1):61-8.
3. Paniz G, Nart J, Gobbato L, Chierico A, Lops D, Michalakis K. Periodontal response to two different subgingival restorative margin designs: a 12-month randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2016;20(6):1243-52.
4. Amine M, Wahid HO, Fahi S, Lehmouddi S, Hamza M, Elarabi S. Assessment of Convergence Angle of Tooth Preparations for Complete Crowns Among Dental Students: Typodont vs Simulator. *Int J Dent*. 2022;2022:7615892.
5. Tiu J, Al-Amleh B, Waddell JN, Duncan WJ. Clinical tooth preparations and associated measuring methods: a systematic review. *J Prosthet Dent*. 2015;113(3):175-84.
6. Ercoli C, Tarnow D, Poggio CE, Tsigarida A, Ferrari M, Caton JG, et al. The Relationships Between Tooth-Supported Fixed Dental Prostheses and Restorations and the Periodontium. *J Prosthodont*. 2021;30(4):305-17.
7. Srimaneepong V, Heboyan A, Zafar MS, Khurshid Z, Marya A, Fernandes GVO, et al. Fixed Prosthetic Restorations and Periodontal Health: A Narrative Review. *J Funct Biomater*. 2022;13(1):15.
8. Sawamoto Y, Sugano N, Tanaka H, Ito K. Detection of periodontopathic bacteria and an oxidative stress marker in saliva from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20(4):216-20.
9. Heboyan A, Manrikyan M, Zafar MS, Rokaya D, Nushikyan R, Vardanyan I, et al. Bacteriological Evaluation of Gingival Crevicular Fluid in Teeth Restored Using Fixed Dental Prostheses: An In Vivo Study. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):5436.
10. Kobza J, Pastuszka JS, Bragoszewska E. Do exposures to aerosols pose a risk to dental professionals? *Occup Med (Lond)*. 2018;68(7):454-8.

11. Baudet A, Guillaso M, Grimmer L, Mediqai Study G, Regad M, Florentin A. Microbiological Contamination of the Office Environment in Dental and Medical Practice. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(11):1375.
12. Bertoldi C, Monari E, Cortellini P, Generali L, Lucchi A, Spinato S, et al. Clinical and histological reaction of periodontal tissues to subgingival resin composite restorations. *Clin Oral Investig*. 2020;24(2):1001-11.
13. Amiri-Jezeh M, Rateitschak E, Weiger R, Walter C. [The impact of the margin of restorations on periodontal health--a review]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2006;116(6):606-13.
14. Trifunović D, Vujošević Lj, Radlović-Pantelić S. *Stomatološka protetika fiksne nadoknade*. Beograd: Evropski centar za mir i razvoj; 1998.
15. Velasquez-Plata D, Andres CJ. The art of crown preparation: a review of principles. *J Indiana Dent Assoc*. 1996;75(3):6-12.
16. Loi I, Di Felice A. Biologically oriented preparation technique (BOPT): a new approach for prosthetic restoration of periodontically healthy teeth. *Eur J Esthet Dent*. 2013;8(1):10-23.
17. Yu H, Chen YH, Cheng H, Sawase T. Finish-line designs for ceramic crowns: A systematic review and meta-analysis. *J Prosthet Dent*. 2019;122(1):22-30.e5.
18. Rangarajan. V, Padmanabhan TV. *Textbook of Prosthodontics- E Book: Elsevier Health Sciences*; 2017.
19. Schmidt JC, Sahrman P, Weiger R, Schmidlin PR, Walter C. Biologic width dimensions--a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2013;40(5):493-504.
20. Matthews DC, Tabesh M. Detection of localized tooth-related factors that predispose to periodontal infections. *Periodontol 2000*. 2004;34:136-50.
21. Redzepagić S. [Indications for supragingival preparation of teeth for placement of fixed prostheses]. *Med Arh*. 1998;52(2):101-5.
22. Nugala B, Kumar BS, Sahitya S, Krishna PM. Biologic width and its importance in periodontal and restorative dentistry. *J Conserv Dent*. 2012;15(1):12-7.
23. Kosyfaki P, del Pilar Pinilla Martín M, Strub JR. Relationship between crowns and the periodontium: a literature update. *Quintessence Int*. 2010;41(2):109-26.
24. Goodacre CJ, Campagni WV, Aquilino SA. Tooth preparations for complete crowns: an art form based on scientific principles. *J Prosthet Dent*. 2001;85(4):363-76.
25. Shenoy A, Shenoy N, Babannavar R. Periodontal considerations determining the design and location of margins in restorative dentistry. *J Interdiscip Dentistry*. 2012;2(1):3-10.

26. John P, Ambooken M, Kuriakose A, Mathew JJ. The perio-restorative interrelationship-expanding the horizons in esthetic dentistry. *J Interdiscip Dentistry*. 2015;5(1):46-53.
27. Al-Sinaidi A, Preethanath RS. The effect of fixed partial dentures on periodontal status of abutment teeth. *Saudi J Dent Res*. 2014;5(2):104-8.
28. Agustín-Panadero R, Serra-Pastor B, Loi I, Suárez MJ, Pelaez J, Solá-Ruíz F. Clinical behavior of posterior fixed partial dentures with a biologically oriented preparation technique: A 5-year randomized controlled clinical trial. *J Prosthet Dent*. 2021;125(6):870-6.
29. Agustín-Panadero R, Solá-Ruíz MF, Chust C, Ferreiroa A. Fixed dental prostheses with vertical tooth preparations without finish lines: A report of two patients. *J Prosthet Dent*. 2016;115(5):520-6.
30. Agustín-Panadero R, Solá-Ruíz MF. Vertical preparation for fixed prosthesis rehabilitation in the anterior sector. *J Prosthet Dent*. 2015;114(4):474-8.
31. Igić M, Kesić Lj. Parodontalna oboljenja kod dece i odraslih. Niš: Galaksija; 2015.
32. Newman M TH, Klokkevold P, Carranza F. Newman and Carranza's Clinical Periodontology. 13th ed. Philadelphia: Elsevier; 2019.
33. Joseph PF, Panagiota GS. Anatomy of the Periodontium. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA, editors. Carranza's Clinical Periodontology. 12th ed. St. Louis (MO): Elsevier; 2015. p. 9-39.
34. Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol 2000*. 2000;24:28-55.
35. Page RC. Gingivitis. *J Clin Periodontol*. 1986;13(5):345-59.
36. Schroeder HE, Attström R. Effect of mechanical plaque control on development of subgingival plaque and initial gingivitis in neutropenic dogs. *Scand J Dent Res*. 1979;87(4):279-87.
37. Kojović D, Pejčić A, Obradović R, Marjanović D. Parodontologija. Niš: Galaksija; 2015.
38. Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1098:216-29.
39. Barros SP, Williams R, Offenbacher S, Morelli T. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontol 2000*. 2016;70(1):53-64.
40. Bostanci N, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid and its immune mediators in the proteomic era. *Periodontol 2000*. 2018;76(1):68-84.

41. Fatima T, Khurshid Z, Rehman A, Imran E, Srivastava KC, Shrivastava D. Gingival Crevicular Fluid (GCF): A Diagnostic Tool for the Detection of Periodontal Health and Diseases. *Molecules*. 2021;26(5):1208.
42. Loos BG, Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontol 2000*. 2005;39:53-72.
43. Oswal S, Dwarakanath CD. Relevance of gingival crevice fluid components in assessment of periodontal disease - A critical analysis. *J Indian Soc Periodontol*. 2010;14(4):282-6.
44. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*. 1976;34(3):235-49.
45. Champagne CM, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2003;31:167-80.
46. Khurshid Z, Mali M, Naseem M, Najeeb S, Zafar MS. Human Gingival Crevicular Fluids (GCF) Proteomics: An Overview. *Dent J (Basel)*. 2017;5(1):12.
47. Trombelli L, Tatakis DN, Scapoli C, Bottega S, Orlandini E, Tosi M. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. II. Identification of "high-responder" and "low-responder" subjects. *J Clin Periodontol*. 2004;31(4):239-52.
48. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S17-s27.
49. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol*. 2018;45 Suppl 20:S44-s67.
50. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontol 2000*. 2013;62(1):203-17.
51. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S9-S16.
52. Darveau RP, Hajishengallis G, Curtis MA. *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. *J Dent Res*. 2012;91(9):816-20.
53. Preethanath RS, Ibraheem WI, Anil A. Pathogenesis of Gingivitis [Internet]. *Oral Diseases*. IntechOpen; 2020. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.91614>
54. Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR, Silva JS. Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes Infect*. 2005;7(4):738-47.
55. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000*. 1997;13:91-120.

56. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):57-80.
57. Rasmussen L, Hänström L, Lerner UH. Characterization of bone resorbing activity in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000;27(1):41-52.
58. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003;74(3):391-401.
59. Johannsen A, Susin C, Gustafsson A. Smoking and inflammation: evidence for a synergistic role in chronic disease. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):111-26.
60. Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008;79(8 Suppl):1601-8.
61. Kinane DF, Lappin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand*. 2001;59(3):154-60.
62. Muddugangadhar BC, Siddhi T, Suchismita D. Protho-Perio-Restorative Interrelationship: A Major Junction. *J Adv Oral Res*. 2011;2(1):7-12.
63. Mojon P, Rentsch A, Budtz-Jørgensen E. Relationship between prosthodontic status, caries, and periodontal disease in a geriatric population. *Int J Prosthodont*. 1995;8(6):564-71.
64. Hsu Y-T, Huang N-C, Wang H-L. Relationship between periodontics and prosthodontics: The two-way street. *J Prosthodont Implantol*. 2015;4(1):4-11.
65. Heboyan A. Marginal and internal fit of fixed prosthodontic constructions: A literature review. *Int J Dent Res Rev*. 2019;2:19.
66. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ, Jr., et al. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(4):2837-48.
67. Pihlstrom BL. Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontol 2000*. 2001;25:37-58.
68. Walton TR. An up to 15-year longitudinal study of 515 metal-ceramic FPDs: Part 1. Outcome. *Int J Prosthodont*. 2002;15(5):439-45.
69. Walton TR. An up to 15-year longitudinal study of 515 metal-ceramic FPDs: Part 2. Modes of failure and influence of various clinical characteristics. *Int J Prosthodont*. 2003;16(2):177-82.
70. Aw G. Dimensions and relations of the dentogingival junction in humans. *J Periodontol*. 1961;32:261-7.



71. Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res*. 2005;84(1):9-20.
72. Samartzi TK, Papalexopoulos D, Ntovas P, Rahiotis C, Blatz MB. Deep Margin Elevation: A Literature Review. *Dent J (Basel)*. 2022;10(3):48.
73. Valderhaug J. Periodontal conditions and carious lesions following the insertion of fixed prostheses: a 10-year follow-up study. *Int Dent J*. 1980;30(4):296-304.
74. Igic M, Kostic M, Basic J, Krunic N, Pejicic A, Gligorijevic N, et al. Bleeding Index and Monocyte Chemoattractant Protein 1 as Gingival Inflammation Parameters after Chemical-Mechanical Retraction Procedure. *Med Princ Pract*. 2020;29(5):492-8.
75. Memari Y, Mohajerfar M, Armin A, Kamalian F, Rezayani V, Beyabanaki E. Marginal Adaptation of CAD/CAM All-Ceramic Crowns Made by Different Impression Methods: A Literature Review. *J Prosthodont*. 2019;28(2):e536-e44.
76. Tao J, Wu Y, Chen J, Su J. A follow-up study of up to 5 years of metal-ceramic crowns in maxillary central incisors for different gingival biotypes. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2014;34(5):e85-92.
77. Yin J, Liu D, Huang Y, Wu L, Tang X. CAD/CAM techniques help in the rebuilding of ideal marginal gingiva contours of anterior maxillary teeth: A case report. *J Am Dent Assoc*. 2017;148(11):834-9.e8.
78. Avetisyan A, Markaryan M, Rokaya D, Tovani-Palone MR, Zafar MS, Khurshid Z, et al. Characteristics of Periodontal Tissues in Prosthetic Treatment with Fixed Dental Prostheses. *Molecules*. 2021;26(5):1331.
79. Newman MG, Takei HT, Klokkevold PR, Carranza FA. *Carranza's Clinical Periodontology*. 10th ed. St. Louis (MO): Saunder Elsevier; 2006.
80. Schätzle M, Land NP, Anerud A, Boysen H, Bürgin W, Løe H. The influence of margins of restorations of the periodontal tissues over 26 years. *J Clin Periodontol*. 2001;28(1):57-64.
81. Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. i. prevalence and severity. *Acta Odontol Scand*. 1963;21:533-51.
82. Greenstein G. The role of bleeding upon probing in the diagnosis of periodontal disease. A literature review. *J Periodontol*. 1984;55(12):684-8.
83. Preshaw PM. Detection and diagnosis of periodontal conditions amenable to prevention. *BMC Oral Health*. 2015;15 Suppl 1(Suppl 1):S5.
84. Almas K, Bulman JS, Newman HN. Assessment of periodontal status with CPITN and conventional periodontal indices. *J Clin Periodontol*. 1991;18(9):654-9.

85. Belstrøm D, Damgaard C, Könönen E, Gürsoy M, Holmstrup P, Gürsoy UK. Salivary cytokine levels in early gingival inflammation. *J Oral Microbiol.* 2017;9(1):1364101.
86. Kinney JS, Ramseier CA, Giannobile WV. Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1098:230-51.
87. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet.* 2005;366(9499):1809-20.
88. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med.* 2013;15:e7.
89. Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, et al. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med.* 2010;4(1):171-89.
90. Perozini C, Chibebe PC, Leao MV, Queiroz Cda S, Pallos D. Gingival crevicular fluid biochemical markers in periodontal disease: a cross-sectional study. *Quintessence Int.* 2010;41(10):877-83.
91. Huynh AH, Veith PD, McGregor NR, Adams GG, Chen D, Reynolds EC, et al. Gingival crevicular fluid proteomes in health, gingivitis and chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2015;50(5):637-49.
92. Sari A, Dogan S, Nibali L, Koseoglu S. Evaluation of IL-23p19/Ebi3 (IL-39) gingival crevicular fluid levels in periodontal health, gingivitis, and periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2022;26(12):7209-18.
93. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3):701-21.e1-70.
94. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018;281(1):8-27.
95. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity.* 2019;50(4):778-95.
96. Yazdi AS, Ghoreschi K. The interleukin-1 family. Regulation of cytokine gene expression in immunity and diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2016;941:21-9.
97. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol.* 2011;38 Suppl 11:60-84.
98. Ulker AE, Tulunoglu O, Ozmeric N, Can M, Demirtas S. The evaluation of cystatin C, IL-1beta, and TNF-alpha levels in total saliva and gingival crevicular fluid from 11- to 16-year-old children. *J Periodontol.* 2008;79(5):854-60.

99. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):10-22.
100. Van Den Eeckhout B, Tavernier J, Gerlo S. Interleukin-1 as Innate Mediator of T Cell Immunity. *Front Immunol.* 2020;11:621931.
101. Boraschi D, Italiani P, Weil S, Martin MU. The family of the interleukin-1 receptors. *Immunol Rev.* 2018;281(1):197-232.
102. Murakami T, Takahata Y, Hata K, Nishimura R. Role of interleukin-1 and inflammasomes in oral disease. *J Oral Biosci.* 2020;62(3):242-8.
103. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(4):189-95.
104. Ohshima M, Otsuka K, Suzuki K. Interleukin-1 beta stimulates collagenase production by cultured human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res.* 1994;29(6):421-9.
105. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519-50.
106. Goldbach-Mansky R, Dailey NJ, Canna SW, Gelabert A, Jones J, Rubin BI, et al. Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *N Engl J Med.* 2006;355(6):581-92.
107. Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, Hsu LC, Goode J, Miething C, et al. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell.* 2007;130(5):918-31.
108. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell.* 1993;4(12):1317-26.
109. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell.* 2019;176(6):1248-64.
110. Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(6):385-403.
111. Loesche WJ, Gusberti F, Mettraux G, Higgins T, Syed S. Relationship between oxygen tension and subgingival bacterial flora in untreated human periodontal pockets. *Infect Immun.* 1983;42(2):659-67.
112. Mettraux GR, Gusberti FA, Graf H. Oxygen tension (pO<sub>2</sub>) in untreated human periodontal pockets. *J Periodontol.* 1984;55(9):516-21.
113. Tanaka M, Hanioka T, Takaya K, Shizukuishi S. Association of oxygen tension in human periodontal pockets with gingival inflammation. *J Periodontol.* 1998;69(10):1127-30.

114. Karhausen J, Haase VH, Colgan SP. Inflammatory hypoxia: role of hypoxia-inducible factor. *Cell Cycle*. 2005;4(2):256-8.
115. Ng KT, Li JP, Ng KM, Tipoe GL, Leung WK, Fung ML. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in human periodontal tissue. *J Periodontol*. 2011;82(1):136-41.
116. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) $\alpha$ : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*. 2004;36(1):1-12.
117. Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med*. 2011;365(6):537-47.
118. Taskan MM, Karatas O, Balci Yuce H, Isiker Kara G, Gevrek F, Ucan Yarkac F. Hypoxia and collagen crosslinking in the healthy and affected sites of periodontitis patients. *Acta Odontol Scand*. 2019;77(8):600-7.
119. Gonzalez FJ, Xie C, Jiang C. The role of hypoxia-inducible factors in metabolic diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;15(1):21-32.
120. Unlü F, Güneri PG, Hekimgil M, Yeşilbek B, Boyacioğlu H. Expression of vascular endothelial growth factor in human periodontal tissues: comparison of healthy and diabetic patients. *J Periodontol*. 2003;74(2):181-7.
121. Suthin K, Matsushita K, Machigashira M, Tatsuyama S, Imamura T, Torii M, et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2003;38(1):90-6.
122. Pradeep AR, Prapulla DV, Sharma A, Sujatha PB. Gingival crevicular fluid and serum vascular endothelial growth factor: their relationship in periodontal health, disease and after treatment. *Cytokine*. 2011;54(2):200-4.
123. Prapulla DV, Sujatha PB, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease. *J Periodontol*. 2007;78(9):1783-7.
124. Lester SR, Bain JL, Serio FG, Harrelson BD, Johnson RB. Relationship between gingival angiopoietin-1 concentrations and depth of the adjacent gingival sulcus. *J Periodontol*. 2009;80(9):1447-53.
125. Romano F, Del Buono W, Bianco L, Arena M, Mariani GM, Di Scipio F, et al. Gingival Crevicular Fluid Cytokines in Moderate and Deep Sites of Stage III Periodontitis Patients in Different Rates of Clinical Progression. *Biomedicines*. 2020;8(11):515.
126. Andonovska B, Dimova C, Panov S. Matrix metalloproteinases (MMP-1,-8,-13) in chronic periapical lesions. *Vojnosanit Pregl*. 2008;65(12):882-6.

127. Beertsen W, Holmbeck K, Niehof A, Bianco P, Chrysovergis K, Birkedal-Hansen H, et al. On the role of MT1-MMP, a matrix metalloproteinase essential to collagen remodeling, in murine molar eruption and root growth. *Eur J Oral Sci.* 2002;110(6):445-51.
128. Zhang Z, Yang X, Zhang H, Liu X, Pan S, Li C. The role of extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation in regulating matrix metalloproteinases in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2018;53(3):391-402.
129. Sorsa T, Ding YL, Ingman T, Salo T, Westerlund U, Haapasalo M, et al. Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. *J Clin Periodontol.* 1995;22(9):709-17.
130. Yakob M, Meurman JH, Sorsa T, Söder B. *Treponema denticola* associates with increased levels of MMP-8 and MMP-9 in gingival crevicular fluid. *Oral Dis.* 2013;19(7):694-701.
131. Mohd Dom TN, Ayob R, Abd Muttalib K, Aljunid SM. National economic burden associated with management of periodontitis in Malaysia. *Int J Dent.* 2016;2016:1891074.
132. Gonzalez-Avila G, Sommer B, Mendoza-Posada DA, Ramos C, Garcia-Hernandez AA, Falfan-Valencia R. Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2019;137:57-83.
133. Checchi V, Maravic T, Bellini P, Generali L, Consolo U, Breschi L, et al. The Role of Matrix Metalloproteinases in Periodontal Disease. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(14):4923.
134. Sapna G, Gokul S, Bagri-Manjrekar K. Matrix metalloproteinases and periodontal diseases. *Oral Dis.* 2014;20(6):538-50.
135. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007;65(1):1-13.
136. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *ScientificWorldJournal.* 2020;2020:2146160.
137. Luchian I, Goriuc A, Sandu D, Covasa M. The Role of Matrix Metalloproteinases (MMP-8, MMP-9, MMP-13) in Periodontal and Peri-Implant Pathological Processes. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1806.
138. Luchian I, Moscalu M, Goriuc A, Nucci L, Tatarciuc M, Martu I, et al. Using Salivary MMP-9 to Successfully Quantify Periodontal Inflammation during Orthodontic Treatment. *J Clin Med.* 2021;10(3):379.

139. Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res.* 1988;23(6):386-93.
140. Uitto VJ, Suomalainen K, Sorsa T. Salivary collagenase. Origin, characteristics and relationship to periodontal health. *J Periodontal Res.* 1990;25(3):135-42.
141. Gangbar S, Overall CM, McCulloch CA, Sodek J. Identification of polymorphonuclear leukocyte collagenase and gelatinase activities in mouthrinse samples: correlation with periodontal disease activity in adult and juvenile periodontitis. *J Periodontal Res.* 1990;25(5):257-67.
142. Golub LM, Lee HM, Greenwald RA, Ryan ME, Sorsa T, Salo T, et al. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflamm Res.* 1997;46(8):310-9.
143. Buduneli N, Kinane DF. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2011;38 Suppl 11:85-105.
144. Gonçalves PF, Huang H, McAninley S, Alfant B, Harrison P, Aukhil I, et al. Periodontal treatment reduces matrix metalloproteinase levels in localized aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2013;84(12):1801-8.
145. Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med.* 2006;38(5):306-21.
146. Collin HL, Sorsa T, Meurman JH, Niskanen L, Salo T, Rönkä H, et al. Salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) levels and gelatinase (MMP-9) activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontal Res.* 2000;35(5):259-65.
147. Kinney JS, Morelli T, Oh M, Braun TM, Ramseier CA, Sugai JV, et al. Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression. *J Clin Periodontol.* 2014;41(2):113-20.
148. Mäntylä P, Stenman M, Kinane DF, Tikanoja S, Luoto H, Salo T, et al. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J Periodontal Res.* 2003;38(4):436-9.
149. Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, de Sousa TS, Taba M, Jr., Teofilo JM, et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2010;37(2):180-90.

150. Yang S, Gu B, Zhao L, Shi Q, Xu J, Wen N. Meta-analysis of the association between serum and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-9 and periodontitis. *J Am Dent Assoc.* 2019;150(1):34-41.
151. Jotwani R, Eswaran SV, Moonga S, Cutler CW. MMP-9/TIMP-1 imbalance induced in human dendritic cells by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010;58(3):314-21.
152. Ii M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006;231(1):20-7.
153. Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Weis B, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix-clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. *Gynecol Oncol.* 1999;72(3):380-6.
154. Kurzepa J, Mądro A, Czechowska G, Kurzepa J, Celiński K, Kazmierak W, et al. Role of MMP-2 and MMP-9 and their natural inhibitors in liver fibrosis, chronic pancreatitis and non-specific inflammatory bowel diseases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2014;13(6):570-9.
155. Amălinei C, Căruntu ID, Giușcă SE, Bălan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol.* 2010;51(2):215-28.
156. Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019;23(1):122-8.
157. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):30-44.
158. Otašević M, Stanković-Đorđević D, Dinić M, Tasić S, Miljković-Selimović B, Mitić N. *Oralna mikrobiologija.* Niš: Prosveta; 2002.
159. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* 2009;28(8):405-11.
160. McLean JS. Advancements toward a systems level understanding of the human oral microbiome. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:98.
161. Marsh PD. Role of the oral microflora in health. *Microb Ecol Health Dis.* 2000;12(3):130-7.
162. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* 2005;13(12):589-95.
163. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000.* 2006;42(1):80-7.

164. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721-32.
165. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz Ö. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* 2009;28(8):405-11.
166. Hashim NT. Oral microbiology in periodontal health and disease. *Oral Microbiol Periodontitis.* 2018;1.
167. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 2004;38(3):204-11.
168. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011;2(5):435-44.
169. Jakubovics NS, Goodman SD, Mashburn-Warren L, Stafford GP, Cieplik F. The dental plaque biofilm matrix. *Periodontol 2000.* 2021;86(1):32-56.
170. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* 2002;28:12-55.
171. Sakanaka A, Kuboniwa M, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A. Distinct signatures of dental plaque metabolic byproducts dictated by periodontal inflammatory status. *Sci Rep.* 2017;7:42818.
172. Abdulkareem AA, Al-Taweel FB, Al-Sharqi AJB, Gul SS, Sha A, Chapple ILC. Current concepts in the pathogenesis of periodontitis: from symbiosis to dysbiosis. *J Oral Microbiol.* 2023;15(1):2197779.
173. Mostajo MFy. Growth and treatment of oral biofilms [dissertation]. Amsterdam: University of Amsterdam; 2017.
174. Borisy GG, Valm AM. Spatial scale in analysis of the dental plaque microbiome. *Periodontol 2000.* 2021;86(1):97-112.
175. Eren AM, Borisy GG, Huse SM, Mark Welch JL. Oligotyping analysis of the human oral microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(28):E2875-84.
176. Escapa IF, Chen T, Huang Y, Gajare P, Dewhirst FE, Lemon KP. New Insights into Human Nostril Microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a Resource for the Microbiome of the Human Aerodigestive Tract. *mSystems.* 2018;3(6):e00187-18.
177. Mark Welch JL, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(6): E791-800.



178. Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J.* 2012;6(6):1176-85.
179. Irie Y, Parsek MR. Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;322:67-84.
180. Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immun.* 1998;66(10):4729-32.
181. Tan KH, Seers CA, Dashper SG, Mitchell HL, Pyke JS, Meuric V, et al. *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* exhibit metabolic symbioses. *PLoS Pathog.* 2014; 10(3):e1003955.
182. Popova C, Dosseva-Panova V, Panov V. Microbiology of periodontal diseases. A review. *Biotechnol Biotech Equip.* 2013;27(3):3754-9.
183. Leung NM, Chen R, Rudney JD. Oral bacteria in plaque and invading buccal cells of young orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;130(6):698.e11-8.
184. Marsh PD, Devine DA. How is the development of dental biofilms influenced by the host? *J Clin Periodontol.* 2011;38 Suppl 11:28-35.
185. Duran-Pinedo AE, Chen T, Teles R, Starr JR, Wang X, Krishnan K, et al. Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis. *ISME J.* 2014;8(8):1659-72.
186. Hanna S, Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiencies. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1250:50-5.
187. Zhou X, Li Y. *Atlas of oral microbiology: From healthy microflora to disease.* Singapore: Springer; 2021.
188. Ruby J, Barbeau J. The buccale puzzle: The symbiotic nature of endogenous infections of the oral cavity. *Can J Infect Dis.* 2002;13(1):34-41.
189. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134-44.
190. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol.* 1991;18(10):766-75.
191. Dosseva B, Popova H. Microbiological monitoring in periodontal diseases. Overview. *Dental Examination.* 2008;1:47-56. [Bulgarian]
192. Listgarten MA, Loomer PM. Microbial identification in the management of periodontal diseases. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003;8(1):182-92.

193. Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, 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):1421-32.
194. Dosseva-Panova VT, Popova CL, Panov VE. Subgingival microbial profile and production of proinflammatory cytokines in chronic periodontitis. *Folia Med (Plovdiv).* 2014;56(3):152-60.
195. Johansson A, Buhlin K, Sorsa T, Pussinen PJ. Systemic *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leukotoxin-Neutralizing Antibodies in Periodontitis. *J Periodontol.* 2017;88(1):122-9.
196. Ohara M, Miyauchi M, Tsuruda K, Takata T, Sugai M. Topical application of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest in the rat gingival epithelium in vivo. *J Periodontal Res.* 2011;46(3):389-95.
197. Kang J, de Brito Bezerra B, Pacios S, Andriankaja O, Li Y, Tsiagbe V, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection enhances apoptosis in vivo through a caspase-3-dependent mechanism in experimental periodontitis. *Infect Immun.* 2012;80(6):2247-56.
198. Timmerman MF, Van der Weijden GA, Arief EM, Armand S, Abbas F, Winkel EG, et al. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Subgingival microbiota in relation to experienced progression of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001;28(7):617-27.
199. Lang NP, Lindhe J. *Klinička parodontologija i dentalna implantologija.* Zagreb: Nakladni zavod Globus; 2010.
200. Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A\* periodontopathogen? *Periodontol 2000.* 2010;54(1):78-105.
201. Bodet C, Chandad F, Grenier D. [Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis]. *Pathol Biol (Paris).* 2007;55(3-4):154-62.
202. Lally ET, Hill RB, Kieba IR, Korostoff J. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol.* 1999;7(9):356-61.
203. Caimano MJ, Bourell KW, Bannister TD, Cox DL, Radolf JD. The *Treponema denticola* major sheath protein is predominantly periplasmic and has only limited surface exposure. *Infect Immun.* 1999;67(8):4072-83.
204. Listgarten M, Hellden L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J Clin Periodontol.* 1978;5(2):115-32.

205. Dashper SG, Seers CA, Tan KH, Reynolds EC. Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. *J Dent Res*. 2011;90(6):691-703.
206. Dorn BR, Leung KL, Progulske-Fox A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect Immun*. 1998;66(12):6054-7.
207. Fukushima H, Yamamoto K, Hirohata K, Sagawa H, Leung KP, Walker CB. Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. *J Endod*. 1990;16(11):534-8.
208. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod*. 1999;25(6):413-5.
209. Raber-Durlacher J, Van Steenberghe T, Van der Velden U, De Graaff J, Abraham-Inpijn L. Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: clinical, endocrinological, and microbiological aspects. *J Clin Periodontol*. 1994;21(8):549-58.
210. Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, Stoll J. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol*. 1982;53(4):223-30.
211. Iyer D, Anaya-Bergman C, Jones K, Yanamandra S, Sengupta D, Miyazaki H, et al. AdpC is a *Prevotella intermedia* 17 leucine-rich repeat internalin-like protein. *Infect Immun*. 2010;78(6):2385-96.
212. Sengupta D, Kang D-J, Anaya-Bergman C, Wyant T, Ghosh AK, Miyazaki H, et al. Interaction of *Prevotella intermedia* strain 17 leucine-rich repeat domain protein AdpF with eukaryotic cells promotes bacterial internalization. *Infect Immun*. 2014;82(6):2637-48.
213. Mallorquí-Fernández N, Manandhar SP, Mallorqui-Fernandez G, Uson I, Wawrzonek K, Kantyka T, et al. A new autocatalytic activation mechanism for cysteine proteases revealed by *Prevotella intermedia* interpain A. *J Biol Chem*. 2008;283(5):2871-82.
214. Hashimoto M, Asai Y, Tamai R, Jinno T, Umatani K, Ogawa T. Chemical structure and immunobiological activity of lipid A from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 lipopolysaccharide. *FEBS Lett*. 2003;543(1-3):98-102.
215. Mark Welch JL, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(6):E791-800.
216. Kriebel K, Hieke C, Müller-Hilke B, Nakata M, Kreikemeyer B. Oral biofilms from symbiotic to pathogenic interactions and associated disease—connection of periodontitis and rheumatic arthritis by peptidylarginine deiminase. *Front Microbiol*. 2018;9:53.

217. Scannapieco FA, Dongari-Bagtzoglou A. Dysbiosis revisited: Understanding the role of the oral microbiome in the pathogenesis of gingivitis and periodontitis: A critical assessment. *J Periodontol.* 2021;92(8):1071-8.
218. Patil S, Rao RS, Sanketh D, Amrutha N. Microbial flora in oral diseases. *J Contemp Dent Pract.* 2013;14(6):1202-8.
219. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community—implications for health and disease. *BMC Oral Health.* 2006;6 Suppl 1(Suppl 1):S14.
220. Shi M, Wei Y, Hu W, Nie Y, Wu X, Lu R. The subgingival microbiome of periodontal pockets with different probing depths in chronic and aggressive periodontitis: a pilot study. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:124.
221. Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J.* 2012;6(6):1176-85.
222. Van Dyke TE, Bartold PM, Reynolds EC. The nexus between periodontal inflammation and dysbiosis. *Front Immunol.* 2020;11:511.
223. Kirst ME, Li EC, Alfant B, Chi Y-Y, Walker C, Magnusson I, et al. Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(2):783-93.
224. Ikeda E, Shiba T, Ikeda Y, Suda W, Nakasato A, Takeuchi Y, et al. Japanese subgingival microbiota in health vs disease and their roles in predicted functions associated with periodontitis. *Odontology.* 2020;108:280-91.
225. Harrel SK, Molinari J. Aerosols and splatter in dentistry: a brief review of the literature and infection control implications. *J Am Dent Assoc.* 2004;135(4):429-37.
226. Taira M, Sasaki M, Kimura S, Araki Y. Characterization of aerosols and fine particles produced in dentistry and their health risk assessments. *Nano Biomedicine.* 2009;1(1):9-15.
227. Zemouri C, de Soet H, Crielaard W, Laheij A. A scoping review on bio-aerosols in healthcare and the dental environment. *PloS One.* 2017;12(5):e0178007.
228. Dutil S, Mériaux A, de Latrémoille M-C, Lazure L, Barbeau J, Duchaine C. Measurement of airborne bacteria and endotoxin generated during dental cleaning. *J Occup Environ Hyg.* 2008;6(2):121-30.
229. Simu M, Borzan C, Mesaros M, Chiriac M, Radu T. Complex characterization of dental office aerosols reveals important loads of risk elements for the human health. *Dig J Nanomater Biostruct.* 2014;9(49):1429-38.

230. Jovanović MG. Bioaerosol in dental prosthodontics. *Acta Stomatologica Naissi*. 2020; 36(82):2106-16.
231. Harrel SK, Barnes JB, Rivera-Hidalgo F. Aerosol and splatter contamination from the operative site during ultrasonic scaling. *J Am Dent Assoc*. 1998;129(9):1241-9.
232. Scharfman B, Techet A, Bush J, Bourouiba L. Visualization of sneeze ejecta: steps of fluid fragmentation leading to respiratory droplets. *Experiments in Fluids*. 2016;57:1-9.
233. Biofilms W. Waterborne biofilms and dentistry: the changing face of infection control. *J Can Dent Assoc*. 2000;66:539-41.
234. Coleman D, O'Donnell M, Shore A, Russell R. Biofilm problems in dental unit water systems and its practical control. *J Appl Microbiol*. 2009;106(5):1424-37.
235. Barbot V, Robert A, Rodier M-H, Imbert C. Update on infectious risks associated with dental unit waterlines. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;65(2):196-204.
236. Sivakumar I, Arunachalam KS, Solomon E. Occupational health hazards in a prosthodontic practice: review of risk factors and management strategies. *J Adv Prosthodont*. 2012;4(4): 259-65.
237. Hallier C, Williams DW, Potts AJC, Lewis MA. A pilot study of bioaerosol reduction using an air cleaning system during dental procedures. *Br Dent J*. 2010;209(8):E14.
238. Zemouri C, Volgenant C, Buijs M, Crielaard W, Rosema N, Brandt B, et al. Dental aerosols: microbial composition and spatial distribution. *J Oral Microbiol*. 2020;12(1):1762040.
239. Kobza J, Pastuszka J, Bągoszewska E. Do exposures to aerosols pose a risk to dental professionals? *Occup Med (Lond)*. 2018;68(7):454-8.
240. Volgenant C, De Soet J. Cross-transmission in the dental office: does this make you ill? *Curr Oral Health Rep*. 2018;5(4):221-8.
241. Liu M-H, Tung T-H, Chung F-F, Chuang L-C, Wan G-H. High total volatile organic compounds pollution in a hospital dental department. *Environ Monit Assess*. 2017; 189(11):1-8.
242. Egusa H, Watamoto T, Abe K, Kobayashi M, Kaneda Y, Ashida S, et al. An analysis of the persistent presence of opportunistic pathogens on patient-derived dental impressions and gypsum casts. *Int J Prosthodont*. 2008;21(1):62-8.
243. Ricci ML, Fontana S, Pinci F, Fiumana E, Pedna MF, Farolfi P, et al. Pneumonia associated with a dental unit waterline. *Lancet*. 2012;379(9816):684.
244. Atlas RM, Williams JF, Huntington MK. Legionella contamination of dental-unit waters. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(4):1208-13.

245. Kadaifciler DG, Cotuk A. Microbial contamination of dental unit waterlines and effect on quality of indoor air. *Environ Monit Assess.* 2014;186(6):3431-44.
246. Polednik B. Exposure of staff to aerosols and bioaerosols in a dental office. *Build Environ.* 2021;187(4):107388.
247. Rautemaa R, Nordberg A, Wuolijoki-Saaristo K, Meurman JH. Bacterial aerosols in dental practice - a potential hospital infection problem? *J Hosp Infect.* 2006;64(1):76-81.
248. Pasquarella C, Veronesi L, Napoli C, Castiglia P, Liguori G, Rizzetto R, et al. Microbial environmental contamination in Italian dental clinics: A multicenter study yielding recommendations for standardized sampling methods and threshold values. *Sci Total Environ.* 2012;420:289-99.
249. Kimmerle H, Wiedmann-Al-Ahmad M, Pelz K, Wittmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A. Airborne microbes in different dental environments in comparison to a public area. *Arch Oral Biol.* 2012;57(6):689-96.
250. Al Maghlouth A, Al Yousef Y, Al Bagieh N. Qualitative and quantitative analysis of bacterial aerosols. *J Contemp Dent Pract.* 2004;5(4):91-100.
251. Miller RL. Characteristics of blood-containing aerosols generated by common powered dental instruments. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1995;56(7):670-6.
252. Nejatidanesh F, Khosravi Z, Goroohi H, Badrian H, Savabi O. Risk of contamination of different areas of dentist's face during dental practices. *Int J Prev Med.* 2013;4(5):611-5.
253. Prospero E, Savini S, Annino I. Microbial aerosol contamination of dental healthcare workers' faces and other surfaces in dental practice. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24(2):139-41.
254. Manarte-Monteiro P, Carvalho A, Pina C, Oliveira H, Manso MC. Air quality assessment during dental practice: Aerosols bacterial counts in an university clinic. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.* 2013;54(1):2-7.
255. Barker J, Jones M. The potential spread of infection caused by aerosol contamination of surfaces after flushing a domestic toilet. *J Appl Microbiol.* 2005;99(2):339-47.
256. Singh T, Mabe O. Occupational exposure to endotoxin from contaminated dental unit waterlines. *SADJ.* 2009;64(1):8-14.
257. Bennett A, Fulford M, Walker J, Bradshaw D, Martin M, Marsh P. Microbial aerosols in general dental practice. *Br Dent J.* 2000;189(12):664-7.
258. Dutil S, Veillette M, Mériaux A, Lazure L, Barbeau J, Duchaine C. Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment: low exposure despite dental unit contamination. *Environ Microbiol.* 2007;9(11):2836-43.

259. Szymanska J. Occupational hazards of dentistry. *Ann Agric Environ Med.* 1999;6(1):13-9.
260. Volgenant CM, Persoon IF, de Ruijter RA, de Soet J. Infection control in dental health care during and after the SARS-CoV-2 outbreak. *Oral Dis.* 2021; 27 Suppl 3(Suppl 3): 674-83.
261. Rautemaa R, Nordberg A, Wuolijoki-Saaristo K, Meurman JH. Bacterial aerosols in dental practice—a potential hospital infection problem? *J Hosp Infect.* 2006;64(1):76-81.
262. Douwes J, Thorne P, Pearce N, Heederik D. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann Occup Hyg.* 2003;47(3):187-200.
263. Polednik B. Aerosol and bioaerosol particles in a dental office. *Environ Res.* 2014;134: 405-9.
264. Szymańska J, Sitkowska J. Bacterial contamination of dental unit waterlines. *Environ Monit Assess.* 2013;185(5):3603-11.
265. Gu M, Hao L, Wang Y, Li X, Chen Y, Li W, et al. The selective heavy metal ions adsorption of zinc oxide nanoparticles from dental wastewater. *Chem Phys.* 2020;534:110750.
266. Schmalz G, Hickel R, van Landuyt KL, Reichl F-X. Scientific update on nanoparticles in dentistry. *Int Dent J.* 2018;68(5):299-305.
267. Yu H, Chen Y-h, Cheng H, Sawase T. Finish-line designs for ceramic crowns: a systematic review and meta-analysis. *J Prosthet Dent.* 2019;122(1):22-30. e5.
268. Frasheri I, Aumer K, Keßler A, Miosge N, Folwaczny M. Effects of resin materials dedicated for additive manufacturing of temporary dental restorations on human gingival keratinocytes. *J Esthet Restor Dent.* 2022;34(7):1105-12.
269. Igić M, Kostić M, Basic J, Krunic N, Pejčić A, Gligorićević N, et al. Bleeding index and monocyte chemoattractant protein 1 as gingival inflammation parameters after chemical-mechanical retraction procedure. *Med Princ Pract.* 2020;29(5):492-8.
270. Đajić D, Đukanović D. *Parodontologija i tzv. "fokalna infekcija"*. Beograd: Draslar partner; 2006.
271. Løe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol.* 1967;38(6): Suppl:610-6.
272. Mühlemann H, Son S. Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta.* 1971;15(2):107-13.
273. Milićević R, Brajović G, Nikolić-Jakoba N, Popović B, Pavlica D, Leković V, et al. Identification of periodontopathogen microorganisms by PCR technique. *Srp Arh Celok Lek.* 2008;136(9-10):476-80.

274. Kannosh I, Staletovic D, Toljic B, Radunovic M, Pucar A, Petrovic SM, et al. The presence of periopathogenic bacteria in subgingival and atherosclerotic plaques—An age related comparative analysis. *J Infect Dev Ctries*. 2018;12(12):1088-95.
275. Hickel R, Peschke A, Tyas M, Mjör I, Bayne S, Peters M, et al. FDI World Dental Federation: clinical criteria for the evaluation of direct and indirect restorations—update and clinical examples. *Clin Oral Investig*. 2010;14(4):349-66.
276. Manhart J, Chen H, Hamm G, Hickel R. Buonocore Memorial Lecture. Review of the clinical survival of direct and indirect restorations in posterior teeth of the permanent dentition. *Oper Dent*. 2004;29(5):481-508.
277. Broadbent JM, Williams KB, Thomson WM, Williams SM. Dental restorations: a risk factor for periodontal attachment loss? *J Clin Periodontol*. 2006;33(11):803-10.
278. Rinaldi T, Santamaría-Laorden A, Orejas Pérez J, Godoy Ruíz L, Serrano Granger C, Gómez Cogolludo P, editors. Periodontal Healing with Fixed Restorations Using the Biologically Oriented Preparation Technique Combined with a Full Digital Workflow: A Clinical Case Report. *Healthcare*. 2023;11(8):1144.
279. Carvalho BAS, Duarte CAB, Silva JF, Batista WWdS, Douglas-de-Oliveira DW, de Oliveira ES, et al. Clinical and radiographic evaluation of the Periodontium with biologic width invasion. *BMC Oral Health*. 2020;20:116.
280. Bertoldi C, Monari E, Cortellini P, Generali L, Lucchi A, Spinato S, et al. Clinical and histological reaction of periodontal tissues to subgingival resin composite restorations. *Clin Oral Investig*. 2020;24:1001-11.
281. Aldakheel M, Aldosary K, Alnafissah S, Alaamer R, Alqahtani A, Almuhtab N. Deep Margin Elevation: Current Concepts and Clinical Considerations: A Review. *Medicina (Kaunas)*. 2022;58(10):1482.
282. Marcum JS. The effect of crown marginal depth upon gingival tissue. *J Prosthet Dent*. 1967;17(5):479-87.
283. Newcomb GM. The relationship between the location of subgingival crown margins and gingival inflammation. *J Periodontol*. 1974;45(3):151-4.
284. Silness J. Periodontal conditions in patients treated with dental bridges. 2. The influence of full and partial crowns on plaque accumulation, development of gingivitis and pocket formation. *J Periodontal Res*. 1970;5(3):219-24.
285. Hatch CL, Chernow B, Terezhalmay GT, Van Ness M, Hall-Boyer K, Lake CR. Plasma catecholamine and hemodynamic responses to the placement of epinephrine-impregnated gingival retraction cord. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1984;58(5):540-4.



286. Felpel LP. A review of pharmacotherapeutics for prosthetic dentistry: Part I. *J Prosthet Dent.* 1997;77(3):285-92.
287. Paniz G, Nart J, Gobbato L, Mazzocco F, Stellini E, De Simone G, et al. Clinical Periodontal Response to Anterior All-Ceramic Crowns with Either Chamfer or Feather-edge Subgingival Tooth Preparations: Six-Month Results and Patient Perception. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2017;37(1):61-8.
288. Schätzle M, Lang NP, Ånerud Å, Boysen H, Bürgin W, Loe H. The influence of margins of restorations on the periodontal tissues over 26 years. *J Clin Periodontol.* 2001;28(1):57-64.
289. Valderhaug J, Ellingsen J, Jokstad A. Oral hygiene, periodontal conditions and carious lesions in patients treated with dental bridges: a 15-year clinical and radiographic follow-up study. *J Clin Periodontol.* 1993;20(7):482-9.
290. Kopač I, Cvetko E, Marion L. Gingival inflammatory response induced by chemical retraction agents in beagle dogs. *Int J Prosthodont.* 2002;15(1):14-9.
291. Kostić I, Mihailović D, Najman S, Stojanović S, Kostić M. The rabbit gingival tissue response to retraction liquids and tetrahydrozoline. *Vojnosanitet Pregl.* 2014;71(1):46-51.
292. Akca EA, Yildirim E, Dalkiz M, Yavuziyilmaz H, Beydemir B. Effects of different retraction medicaments on gingival tissue. *Quintessence Int.* 2006;37(1):53-9.
293. Ahmadzadeh A, Majd NE, Chasteen J, Kaviani A, Kavooosi MA. Inflammatory response of canine gingiva to a chemical retraction agent placed at different time intervals. *Dent Res J (Isfahan).* 2014;11(1):81-6.
294. Igić M. Ispitivanje inflamatornog efekta hemijsko-mehaničke metode retrakcije gingive pri izradi fiksnih protetičkih nadoknada [doktorska disertacija]. Niš: Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet; 2020.
295. Patel PV, Kumar S, Kumar V, Vidya G. Quantitative cytomorphometric analysis of exfoliated normal gingival cells. *J Cytol.* 2011;28(2):66-72.
296. Bertalanffy FD. Cytodiagnosis of cancer by acridine orange fluorescence microscopy. *Triangle.* 1961;5:152-6.
297. Rajput DV, Tupkari JV. Early detection of oral cancer: PAP and AgNOR staining in brush biopsies. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2010;14(2):52-8.
298. Mahmood DK, Ibraheem BF, Mohammad DN, Garib BT, Hamied MA-S. Cytomorphometric Analysis of Oral Buccal Mucosa of Dental Colleges' Students in Sulaimani City. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(2):234.

299. Chen SY, Squier CA. The ultrastructure of the oral epithelium. In: Meyer J, Squier CA, Gerson SJ, editors. *The Structure and Function of Oral Mucosa*. Oxford: Pergamon Press; 1984. p. 7-10.
300. Reddy SV, Kumar SV, Vezhavendhan N, Priya S. Cytomorphometric analysis of normal exfoliative cells from buccal mucosa in different age groups. *Int J Clin Dent Sci*. 2011;2(3):53-56.
301. Jovanovic M, Zivkovic N, Gligorijevic N, Igc M, Petrovic M, Bojovic M, et al. Cytomorphometric and Clinical Changes in Gingival Tissue after Subgingival Tooth Preparation—A Pilot Study. *Healthcare (Basel)*. 2023;11(3):414.
302. Sukegawa S, Ono S, Nakano K, Takabatake K, Kawai H, Nagatsuka H, et al. Clinical study on primary screening of oral cancer and precancerous lesions by oral cytology. *Diagn Pathol*. 2020;15(1):107.
303. Sivapathasundharam B, Kalasagar M. Yet another article on exfoliative cytology. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2004;8(2):54-7.
304. Igc M, Mihailovic D, Kesic Lj, Milasin J, Apostolovic M, Kostadinovic Lj, et al. Cytomorphometric and clinical investigation of the gingiva before and after low-level laser therapy of gingivitis in children. *Lasers Med Sci*. 2012;27:843-8.
305. Cançado RP, Yurgel LS, Filho MSA. Comparative Analyses Between the Smoking Habit Frequency and the Nucleolar Organizer Region Associated Proteins in Exfoliative Cytology of Smokers' Normal Buccal Mucosa. *Tob Induc Dis*. 2004;2(1):1-7.
306. Seifi S, Feizi F, Mehdizadeh M, Khafri S, Ahmadi B. Evaluation of cytological alterations of oral mucosa in smokers and waterpipe users. *Cell J*. 2014;15(4):302-9.
307. Milica P. Komparativno ispitivanje efikasnosti bazične, lasero- i fitoterapije kod pacijenata sa hroničnom parodontopatijom [doktorska disertacija]. Niš: Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet; 2018.
308. Göregen M, Akgül HM, Gündoğdu C. The cytomorphological analysis of buccal mucosa cells in smokers. *Turk J Med Sci*. 2011;41(2):205-10.
309. Hashemipour MA, Aghababaie M, Mirshekari TR, Asadi-Shekaari M, Tahmasbi-Arashlow M, Tahmasbi-Arashlow F, et al. Exfoliative cytology of oral mucosa among smokers, opium addicts and non-smokers: a cytomorphometric study. *Arch Iran Med*. 2013;16(12):725-30.
310. Buch AC, Patel SS, Chandanwale SS, Kumar H, Patel KM, Bamanikar SA. Study of oral exfoliative cytology in tobacco chewers of western India. *Int J Pharma Bio Sci*. 2014;4(1): 138-43.

311. Dagli AF, Sahin N, Bozdog Z, Ucer O, Akatli AN, Artas G, et al. Cytological and cytomorphometric characteristics of buccal mucosa cells from smokeless tobacco users. *Diagn Cytopathol.* 2017;45(11):976-82.
312. Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO. Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1998;27(2):83-6.
313. Nivia M, Sunil SN, Rathy R, Anilkumar TV. Comparative cytomorphometric analysis of oral mucosal cells in normal, tobacco users, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *J Cytol.* 2015;32(4):253-60.
314. Kumar S, Vezhavendhan N, Priya S. Role of oral exfoliative cytology in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *Int J Clin Dent Sci.* 2011;2(1):93-7.
315. Weigum SE, Floriano PN, Redding SW, Yeh C-K, Westbrook SD, McGuff HS, et al. Nano-Bio-Chip Sensor Platform for Examination of Oral Exfoliative Cytology Nano-Bio-Chip Sensor for Oral Exfoliative Cytology. *Cancer Prev Res (Phila).* 2010;3(4):518-28.
316. Ahmed HG, Alqufeye MA, Alsulaiman GA, Alenezi LL, Almuslumani RK, Alhussain GM, et al. Patterns of oral inflammatory cells infiltrate associated with cigarette smoking. *Med Sci.* 2020;24(105):2817-25.
317. Shetty R, Mukherjee S, Dutta N, Bhagat DK, Sushma K, Pandey V. Cytomorphometric analysis of oral squames tobacco smoker's using oral brush biopsy: An exfoliative cytological study. *IAIM.* 2016;3(5):14-9.
318. Coates P. Markers of senescence? *J Pathol.* 2002.;196:371–3.
319. Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Wang HL. Influence of sex hormones on the periodontium. *J Clin Periodontol.* 2003;30(8):671-81.
320. Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol.* 2008;79 (8 Suppl):1592-600.
321. Kinane D, Mombelli A. Periodontal disease. Foreword. *Front Oral Biol.* 2012;15:v-ix.
322. Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med.* 2006;38(5):306-21.
323. Yang S, Gu B, Zhao L, Shi Q, Xu J, Wen N. Meta-analysis of the association between serum and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-9 and periodontitis. *J Am Dent Assoc.* 2019;150(1):34-41.
324. Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Clin Periodontol.* 2013;40:S113-34.

325. Palm F, Lahdentausta L, Sorsa T, Tervahartiala T, Gokel P, Buggle F, et al. Biomarkers of periodontitis and inflammation in ischemic stroke: A case-control study. *Innate Immun.* 2014;20(5):511-8.
326. Pejcic A, Kostic M, Marko I, Obradovic R, Minic I, Bradic-Vasic M, et al. Tooth loss and periodontal status in patients with cardiovascular disease in the Serbian population: A randomized prospective study. *Int J Dent Hyg.* 2023;21(2):317-27.
327. Lazăr L, Loghin A, Bud E-S, Cerghizan D, Horváth E, Nagy EE. Cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 expressions correlate with tissue inflammation degree in periodontal disease. *Rom J Morphol Embryol.* 2015;56(4):1441-6.
328. Mendiola AS, Cardona AE. The IL-1 $\beta$  phenomena in neuroinflammatory diseases. *J Neural Transm (Vienna).* 2018;125(5):781-95.
329. Faizuddin M, Bharathi S, Rohini N. Estimation of interleukin-1 $\beta$  levels in the gingival crevicular fluid in health and in inflammatory periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2003;38(2):111-4.
330. Abo-Elmagd AAA, Sabry D, Mohammed E. Interleukin-1 $\beta$  activity in gingival crevicular fluid of abutment teeth with temporary fixed restorations versus final fixed restorations: Prospective observational study. *Saudi Dent J.* 2021;33(6):322-7.
331. Moretti L, Barros R, Costa PP, Oliveira FS, Ribeiro FJ, Novaes Jr AB, et al. The influence of restorations and prosthetic crowns finishing lines on inflammatory levels after non-surgical periodontal therapy. *J Int Acad Periodontol.* 2011;13(3):65-72.
332. Gonzales J, Herrmann J, Boedeker R, Francz P, Biesalski H, Meyle J. Concentration of interleukin-1 $\beta$  and neutrophil elastase activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol.* 2001;28(6):544-9.
333. Relvas M, Silvestre R, Gonçalves M, Cabral C, Mendes-Frias A, Monteiro L, et al. Analysis of Salivary Levels of IL-1 $\beta$ , IL17A, OPG and RANK-L in Periodontitis Using the 2017 Classification of Periodontal Diseases—An Exploratory Observational Study. *J Clin Med.* 2023;12(3):1003.
334. Miller CS, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: A cross-sectional study. *J Am Dent Assoc.* 2006;137(3):322-9.
335. Cheng R, Wu Z, Li M, Shao M, Hu T. Interleukin-1 $\beta$  is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review. *Int J Oral Sci.* 2020;12(1):2.
336. Rangbulla V, Nirola A, Gupta M, Batra P, Gupta M. Salivary IgA, Interleukin-1 $\beta$  and MMP-8 as Salivary Biomarkers in Chronic Periodontitis Patients. *Chin J Dent Res.* 2017;20(1):43-51.

337. Syrjäläinen S, Gursoy UK, Gursoy M, Pussinen P, Pietiäinen M, Jula A, et al. Salivary Cytokine Biomarker Concentrations in Relation to Obesity and Periodontitis. *J Clin Med*. 2019;8(12).
338. Arias-Bujanda N, Regueira-Iglesias A, Balsa-Castro C, Nibali L, Donos N, Tomás I. Accuracy of single molecular biomarkers in saliva for the diagnosis of periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2020;47(1):2-18.
339. Lerner UH, Modéer T, Krekmanova L, Claesson R, Rasmussen L. Gingival crevicular fluid from patients with periodontitis contains bone resorbing activity. *Eur J Oral Sci*. 1998;106(3):778-87.
340. Hussain A, Ghafory Ali B. Evaluation of Interleukin 1 $\beta$  Levels in Gingival Crevicular Fluid and Serum of Patients with Gingivitis and Chronic Periodontitis. *IOSR J Dent Med Sci*. 2014;13:70-5.
341. Herrmann JM, Gonzáles JR, Boedeker RH, Vonholdt J, Meyle J. Microassay for the detection of elastase activity in the gingival crevice. *J Clin Periodontol*. 2001;28(1):31-7.
342. Shaker ZF, Hashem BH. Study the role of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in Iraqi chronic periodontitis patients. *J Bagh Col Dent*. 2012;24(1):164-9.
343. Bloemen V, Schoenmaker T, de Vries TJ, Everts V. IL-1 $\beta$  favors osteoclastogenesis via supporting human periodontal ligament fibroblasts. *J Cell Biochem*. 2011;112(7):1890-7.
344. Zheng J, Yang K. Clinical research: low-level laser therapy in accelerating orthodontic tooth movement. *BMC Oral Health*. 2021;21(1):324.
345. Motyl S, Manfredini D, Oruba Z, Bugajska J, Sztefko K, Stós W, et al. Evaluation of interleukin-1 beta and the ratio of interleukin-1 beta to interleukin-1 receptor antagonist in gingival crevicular fluid during orthodontic canine retraction. *Dent Med Probl*. 2021;58(1):47-54.
346. Lee KJ, Park YC, Yu HS, Choi SH, Yoo YJ. Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin-1beta and prostaglandin E2 production in gingival crevicular fluid. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2004;125(2):168-77.
347. Stadler AF, Angst PD, Arce RM, Gomes SC, Oppermann RV, Susin C. Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: a meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2016;43(9):727-45.
348. Sánchez GA, Miozza VA, Delgado A, Busch L. Salivary IL-1 $\beta$  and PGE2 as biomarkers of periodontal status, before and after periodontal treatment. *J Clin Periodontol*. 2013;40(12):1112-7.

349. Syndergaard B, Al-Sabbagh M, Kryscio RJ, Xi J, Ding X, Ebersole JL, et al. Salivary biomarkers associated with gingivitis and response to therapy. *J Periodontol.* 2014;85(8): e295-303.
350. Prakasam S, Srinivasan M. Evaluation of salivary biomarker profiles following non-surgical management of chronic periodontitis. *Oral Dis.* 2014;20(2):171-7.
351. Rathnayake N, Akerman S, Klinge B, Lundegren N, Jansson H, Tryselius Y, et al. Salivary biomarkers of oral health: a cross-sectional study. *J Clin Periodontol.* 2013;40(2):140-7.
352. Melguizo-Rodríguez L, Costela-Ruiz VJ, Manzano-Moreno FJ, Ruiz C, Illescas-Montes R. Salivary Biomarkers and Their Application in the Diagnosis and Monitoring of the Most Common Oral Pathologies. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):5173.
353. Chang KC, Wheeler MA, Cabanilla Jacobs L, Litonjua LA. Interleukins in gingival crevicular fluid in patients with definitive full-coverage restorations. *Compend Contin Educ Dent.* 2014;35(4):e18-24.
354. Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(10):611-25.
355. Cetinkaya BO, Keles GC, Ayas B, Sakallioglu EE, Acikgoz G. The expression of vascular endothelial growth factor in a rat model at destruction and healing stages of periodontal disease. *J Periodontol.* 2007;78(6):1129-35.
356. Vasconcelos RC, Costa Ade L, Freitas Rde A, Bezerra BA, Santos BR, Pinto LP, et al. Immunoexpression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in Periodontal Disease and Healthy Gingival Tissues. *Braz Dent J.* 2016;27(2):117-22.
357. Afacan B, Öztürk V, Paşalı Ç, Bozkurt E, Köse T, Emingil G. Gingival crevicular fluid and salivary HIF-1 $\alpha$ , VEGF, and TNF- $\alpha$  levels in periodontal health and disease. *J Periodontol.* 2019;90(7):788-97.
358. Borges CD, Ricoldi MS, Messoria MR, Palioto DB, Souza SLS, Novaes Júnior AB, et al. Clinical attachment loss and molecular profile of inflamed sites before treatment. *J Appl Oral Sci.* 2019;27:e20180671.
359. Afacan B, Keleş Yücel ZP, Paşalı Ç, Atmaca İlhan H, Köse T, Emingil G. Effect of non-surgical periodontal treatment on gingival crevicular fluid hypoxia inducible factor-1 alpha, vascular endothelial growth factor and tumor necrosis factor-alpha levels in generalized aggressive periodontitis patients. *J Periodontol.* 2020;91(11):1495-502.
360. Mierzwinska-Nastalska E, Lomzynski L, Jaworska-Zaremba M, Kostrzewa-Janicka J. Vascular endothelial growth factor in gingival crevicular fluid around dental implants. *Eur J Med Res.* 2010;15 Suppl 2(Suppl 2):88-91.

361. Matarese G, Isola G, Anastasi GP, Favaloro A, Milardi D, Vermiglio G, et al. Immunohistochemical analysis of TGF- $\beta$ 1 and VEGF in gingival and periodontal tissues: a role of these biomarkers in the pathogenesis of scleroderma and periodontal disease. *Int J Mol Med*. 2012;30(3):502-8.
362. R P, Sreedhara A, P I, Sarkar I, Kumar CS. Vascular endothelial growth factor levels in gingival crevicular fluid before and after periodontal therapy. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(11):ZC75-9.
363. Türer ÇC, Durmuş D, Ballı U, Güven B. Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment on Gingival Crevicular Fluid and Serum Endocan, Vascular Endothelial Growth Factor-A, and Tumor Necrosis Factor-Alpha Levels. *J Periodontol*. 2017;88(5):493-501.
364. Sorsa T, Gursoy UK, Nwhator S, Hernandez M, Tervahartiala T, Leppilähti J, et al. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2016;70(1):142-63.
365. Butler GS, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of signaling molecules to regulate inflammation. *Periodontol 2000*. 2013;63(1):123-48.
366. Hernández M, Dutzan N, García-Sesnich J, Abusleme L, Dezerega A, Silva N, et al. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *J Dent Res*. 2011;90(10):1164-70.
367. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis*. 2004;10(6):311-8.
368. Salazar MG, Jehmlich N, Murr A, Dhople VM, Holtfreter B, Hammer E, et al. Identification of periodontitis associated changes in the proteome of whole human saliva by mass spectrometric analysis. *J Clin Periodontol*. 2013;40(9):825-32.
369. Hernández M, Gamonal J, Salo T, Tervahartiala T, Hukkanen M, Tjäderhane L, et al. Reduced expression of lipopolysaccharide-induced CXC chemokine in *Porphyromonas gingivalis*-induced experimental periodontitis in matrix metalloproteinase-8 null mice. *J Periodontol Res*. 2011;46(1):58-66.
370. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*. 2000;14(17):2123-33.
371. Wahlgren J, Salo T, Teronen O, Luoto H, Sorsa T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. *Int Endod J*. 2002;35(11):897-904.
372. Söder B, Airila Månsson S, Söder PÖ, Kari K, Meurman J. Levels of matrix metalloproteinases-8 and-9 with simultaneous presence of periodontal pathogens in

- gingival crevicular fluid as well as matrix metalloproteinase-9 and cholesterol in blood. *J Periodontal Res.* 2006;41(5):411-7.
373. Franco C, Patricia HR, Timo S, Claudia B, Marcela H. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2):440.
374. Verstappen J, Von den Hoff JW. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res.* 2006;85(12):1074-84.
375. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1996;23(12):1127-32.
376. Li W, Zhu Y, Singh P, Ajmera DH, Song J, Ji P. Association of Common Variants in MMPs with Periodontitis Risk. *Dis Markers.* 2016;2016:1545974.
377. Lazăr L, Loghin A, Bud ES, Cerghizan D, Horváth E, Nagy EE. Cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 expressions correlate with tissue inflammation degree in periodontal disease. *Rom J Morphol Embryol.* 2015;56(4):1441-6.
378. Loo WT, Wang M, Jin LJ, Cheung MN, Li GR. Association of matrix metalloproteinase (MMP-1, MMP-3 and MMP-9) and cyclooxygenase-2 gene polymorphisms and their proteins with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2011;56(10):1081-90.
379. Zhang F, Engebretson SP, Morton RS, Cavanaugh PF, Jr., Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. The overexpression of cyclo-oxygenase-2 in chronic periodontitis. *J Am Dent Assoc.* 2003;134(7):861-7.
380. Ebersole JL, Schuster JL, Stevens J, Dawson D, 3rd, Kryscio RJ, Lin Y, et al. Patterns of salivary analytes provide diagnostic capacity for distinguishing chronic adult periodontitis from health. *J Clin Immunol.* 2013;33(1):271-9.
381. Hernández M, Martínez B, Tejerina JM, Valenzuela MA, Gamonal J. MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2007;34(9):729-35.
382. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):197-212.
383. Sexton WM, Lin Y, Kryscio RJ, Dawson DR, 3rd, Ebersole JL, Miller CS. Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. *J Clin Periodontol.* 2011;38(5):434-41.
384. Miller CS, King Jr CP, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc.* 2006;137(3):322-9.



385. Sorsa T, Alassiri S, Grigoriadis A, Räisänen IT, Pärnänen P, Nwhator SO, et al. Active MMP-8 (aMMP-8) as a Grading and Staging Biomarker in the Periodontitis Classification. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(2):61.
386. Kraft-Neumärker M, Lorenz K, Koch R, Hoffmann T, Mäntylä P, Sorsa T, et al. Full-mouth profile of active MMP-8 in periodontitis patients. *J Periodontal Res*. 2012;47(1):121-8.
387. Hernández Ríos M, Sorsa T, Obregón F, Tervahartiala T, Valenzuela MA, Pozo P, et al. Proteolytic roles of matrix metalloproteinase (MMP)-13 during progression of chronic periodontitis: initial evidence for MMP-13/MMP-9 activation cascade. *J Clin Periodontol*. 2009;36(12):1011-7.
388. Rathnayake N, Gieselmann DR, Heikkinen AM, Tervahartiala T, Sorsa T. Salivary Diagnostics-Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. *Diagnostics (Basel)*. 2017;7(1):7.
389. Hill PA, Murphy G, Docherty AJ, Hembry RM, Millican TA, Reynolds JJ, et al. The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. *J Cell Sci*. 1994;107 (Pt 11):3055-64.
390. Smith PC, Muñoz VC, Collados L, Oyarzún AD. In situ detection of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gingival epithelium in human periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2004;39(2):87-92.
391. Uitto VJ, Tryggvason K, Sorsa T. Collagenolytic enzymes in periodontal diseases. *Proc Finn Dent Soc*. 1987;83(3):119-30.
392. Westerlund U, Ingman T, Lukinmaa PL, Salo T, Kjeldsen L, Borregaard N, et al. Human neutrophil gelatinase and associated lipocalin in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res*. 1996;75(8):1553-63.
393. Wick PA, Mombelli A, Pagano S, Moren X, Giannopoulou C, Mach F, et al. Anti-apolipoprotein A-1 autoantibodies as biomarker for atherosclerosis burden in patients with periodontitis. *J Periodontal Res*. 2013;48(3):350-6.
394. Leppilahti JM, Hernández-Ríos PA, Gamonal JA, Tervahartiala T, Brignardello-Petersen R, Mantyla P, et al. Matrix metalloproteinases and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid provide site-specific diagnostic value for chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014;41(4):348-56.
395. Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne CA, et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol*. 2009;80(3):436-46.

396. Söder PO, Meurman JH, Jogestrand T, Nowak J, Söder B. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in blood as markers for early atherosclerosis in subjects with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2009;44(4):452-8.
397. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda).* 2013;28(6):391-403.
398. Gursoy UK, Könönen E, Huuonen S, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Suominen AL, et al. Salivary type I collagen degradation end-products and related matrix metalloproteinases in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2013;40(1):18-25.
399. Díaz CM, Bullon B, Ruiz-Salmerón RJ, Fernández-Riejos P, Fernández-Palacín A, Battino M, et al. Molecular inflammation and oxidative stress are shared mechanisms involved in both myocardial infarction and periodontitis. *J Periodontal Res.* 2020;55(4):519-28.
400. Sorsa T, Mäntylä P, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Gamonal J, Hernandez M. MMP activation in diagnostics of periodontitis and systemic inflammation. *J Clin Periodontol.* 2011;38(9):817-9.
401. Tervahartiala T, Pirilä E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, et al. The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2,-8,-13, and-14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res.* 2000;79(12):1969-77.
402. Hamodat HF, Taha MY. Estimation of salivary MMP-8, MMP-9, MMP-13 and TIMP-1 in chronic periodontitis in Mosul. *Int J Dent Sci Res.* 2020;8:22-6.
403. Ajmera DH, Singh P, Zhu Y, Li W, Song J. A meta-analysis of MMP-9 promoter -1562 C/T polymorphism on susceptibility of chronic periodontitis. *Springerplus.* 2016;5:526.
404. Kim H-N. Changes in salivary matrix metalloproteinase-3,-8, and-9 concentrations after 6 weeks of non-surgical periodontal therapy. *BMC Oral Health.* 2022;22(1):1-10.
405. Isaza-Guzmán DM, Arias-Osorio C, Martínez-Pabón MC, Tobón-Arroyave SI. Salivary levels of matrix metalloproteinase (MMP)-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1: a pilot study about the relationship with periodontal status and MMP-9(-1562C/T) gene promoter polymorphism. *Arch Oral Biol.* 2011;56(4):401-11.
406. Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J, Mongodin EF, et al. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J.* 2010;4(8):962-74.
407. Liu B, Faller LL, Klitgord N, Mazumdar V, Ghodsi M, Sommer DD, et al. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PLoS One.* 2012;7(6):e37919.

408. Marsh PD, Lewis MA, Williams DW, Martin MV. Oral microbiology e-book. 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2009, 2010, 2013.
409. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
410. Bhaumik D, Manikandan D, Foxman B. Cariogenic and oral health taxa in the oral cavity among children and adults: A scoping review. *Arch Oral Biol*. 2021;129:105204.
411. Qudeimat MA, Alyahya A, Karched M, Behbehani J, Salako NO. Dental plaque microbiota profiles of children with caries-free and caries-active dentition. *J Dent*. 2021;104:103539.
412. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(9):623-33.
413. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54(1):49-79.
414. Kuboniwa M, Lamont RJ. Subgingival biofilm formation. *Periodontol 2000*. 2010;52(1):38-52.
415. Listgarten MA. The structure of dental plaque. *Periodontol 2000*. 1994;5(1):52-65.
416. Zijng V, Ammann T, Thurnheer T, Gmür R. Subgingival biofilm structure. *Front Oral Biol*. 2012;15:1-16.
417. Wolff L, Dahlén G, Aepli D. Bacteria as risk markers for periodontitis. *J Periodontol*. 1994;65:498-510.
418. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1979;6(5):351-82.
419. Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009;73(2):310-47.
420. Szkaradkiewicz AK, Karpiński TM. Microbiology of chronic periodontitis. *J Biol Earth Sci*. 2013;3(1):14-20.
421. Koh SL. A special theory of microelasticity. *IJonEST*. 1970;8(7):583-93.
422. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal infections. In: Lindhe J, Lan NP, Karring P. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 5th edition. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. p. 207-267.
423. Jain A, Batista Jr EL, Serhan C, Stahl GL, Van Dyke TE. Role for periodontitis in the progression of lipid deposition in an animal model. *Infect Immun*. 2003;71(10):6012-8.
424. Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol 2000*. 2006;40(1):50-76.
425. Su J LL, Mao YL, Li N, Pan LF, Wen XJ. Establishment of experimental animal model of periodontitis in SD rats. *Chin J Cons Dent*. 2006;11:004.

426. Feres M, Figueiredo LC, Soares GMS, Faveri M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2015;67(1):131-86.
427. Ardila C, Granada M, Guzmán I. Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res*. 2010;45(4):557-63.
428. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol*. 2004;31(12):1034-47.
429. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994;5(1):78-111.
430. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2005;38:72-122.
431. Sharma N, Bhatia S, Sodhi AS, Batra N. Oral microbiome and health. *AIMS Microbiol*. 2018;4(1):42-66.
432. Huang S, Li R, Zeng X, He T, Zhao H, Chang A, et al. Predictive modeling of gingivitis severity and susceptibility via oral microbiota. *ISME J*. 2014;8:1768-80.
433. Nowicki EM, Shroff R, Singleton JA, Renaud DE, Wallace D, Drury J, et al. Microbiota and Metatranscriptome Changes Accompanying the Onset of Gingivitis. *mBio*. 2018; 9(2):e00575-18.
434. Joseph S, Curtis MA. Microbial transitions from health to disease. *Periodontol 2000*. 2021;86(1):201-9.
435. Watson MR, Lopatin DE, Bretz WA, Ertel IJ, Loesche WJ. Detection of two anaerobic periodontopathogens in children by means of the BANA and ELISA assays. *J Dent Res*. 1991;70(7):1052-6.
436. da Cruz GA, de Toledo S, Sallum EA, Sallum AW, Ambrosano GM, de Cássia Orlandi Sardi J, et al. Clinical and laboratory evaluations of non-surgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Periodontol*. 2008;79(7):1150-7.
437. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*. 2004;31(12):1061-9.

438. Milićević R, Brajović G, Nikolić-Jakoba N, Popović B, Pavlica D, Leković V, et al. Identification of periodontopathogen microorganisms by PCR technique. *Srp Arh Celok Lek.* 2008;136(9-10):476-80.
439. Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL, Jr., et al. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol.* 1998;25(5):346-53.
440. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2005;38:72-122.
441. Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontol 2000.* 2010;52(1):218-37.
442. Abusleme L, Hoare A, Hong BY, Diaz PI. Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontol 2000.* 2021;86(1):57-78.
443. Meuric V, Le Gall-David S, Boyer E, Acuña-Amador L, Martin B, Fong SB, et al. Signature of Microbial Dysbiosis in Periodontitis. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(14):e00462-17.
444. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol.* 2004;31(12):1034-47.
445. Yang HW, Huang YF, Chou MY. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol.* 2004;75(8):1077-83.
446. Levy D, Csima A, Birek P, Ellen RP, McCulloch CA. Impact of microbiological consultation on clinical decision making: a case-control study of clinical management of recurrent periodontitis. *J Periodontol.* 1993;64(11):1029-39.
447. Fujise O, Miura M, Hamachi T, Maeda K. Risk of *Porphyromonas gingivalis* recolonization during the early period of periodontal maintenance in initially severe periodontitis sites. *J Periodontol.* 2006;77(8):1333-9.
448. Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol. 2000.* 2004;34:49-56.
449. Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcoforado G, Hujuel P. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for

- ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol.* 1992;30(2):427-33.
450. Hr P, Mlachkova A, Kicheva M. Tag Man RT-PCR method for detecting the levels of IL-1B in the gingiva and PGE2 in patients with chronic periodontitis. *Problems of Dentistry.* 2009;25(Part II):8-15.
451. Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontol.* 2000. 2010;52(1):218-37.
452. Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, et al. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2009;44(1):21-7.
453. Gursoy UK, Könönen E, Uitto VJ. Stimulation of epithelial cell matrix metalloproteinase (MMP-2,-9,-13) and interleukin-8 secretion by fusobacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(5):432-4.
454. Mans JJ, Hendrickson EL, Hackett M, Lamont RJ. Cellular and bacterial profiles associated with oral epithelium-microbiota interactions. *Periodontol.* 2000. 2010;52(1):207-217.
455. Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol.* 2010;81(1):89-98.
456. Dahlen G. Role of suspected periodontopathogens in microbiological monitoring of periodontitis. *Adv Dent Res.* 1993;7(2):163-74.
457. Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1 $\beta$  profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2002;29(1):48-53.
458. Rescala B, Rosalem Jr W, Teles RP, Fischer RG, Haffajee AD, Socransky SS, et al. Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects. *J Periodontol.* 2010;81(9):1308-16.
459. Baqui AA, Meiller TF, Chon JJ, Turng BF, Falkler WA Jr. Interleukin-6 production by human monocytes treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the presence of lipopolysaccharide of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol.* 1998; 13(3):173-80.
460. Roberts E, McCaffery K, Michalek S. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. *J Dent Res.* 1997;76(12):1833-9.
461. Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne CA, et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol.* 2009;80(3):436-46.

462. Gursoy UK, Könönen E, Pussinen PJ, Tervahartiala T, Hyvärinen K, Suominen AL, et al. Use of host-and bacteria-derived salivary markers in detection of periodontitis: a cumulative approach. *Dis Markers*. 2011;30(6):299-305.
463. Salminen A, Gursoy UK, Paju S, Hyvärinen K, Mäntylä P, Buhlin K, et al. Salivary biomarkers of bacterial burden, inflammatory response, and tissue destruction in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014;41(5):442-50.
464. Arno G, Kaski J, Smith D, Akiyu J, Hughes S, Baboonian C. Matrix metalloproteinase-9 expression is associated with the presence of *Chlamydia pneumoniae* in human coronary atherosclerotic plaques. *Heart*. 2005;91(4):521-5.
465. Mäntylä P, Stenman M, Paldanius M, Saikku P, Sorsa T, Meurman JH. *Chlamydia pneumoniae* together with collagenase-2 (MMP-8) in periodontal lesions. *Oral Dis*. 2004;10(1):32-5.
466. Mastragelopoulos N, Haraszthy V, Zambon J, Zafiroopoulos G. Detection of periodontal pathogenic microorganisms in atheromatous plaque. Preliminary results. *Chirurg*. 2002;73(6):585-91. [German]
467. Yakob M, Kari K, Tervahartiala T, Sorsa T, Söder PÖ, Meurman JH, et al. Associations of periodontal microorganisms with salivary proteins and MMP-8 in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*. 2012;39(3):256-63.
468. Yakob M, Meurman J, Sorsa T, Söder B. *Treponema denticola* associates with increased levels of MMP-8 and MMP-9 in gingival crevicular fluid. *Oral Dis*. 2013;19(7):694-701.
469. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Haapasalo M, Kontinen Y, Lindy O, et al. Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases. *Infection Immun*. 1992;60(11):4491-5.
470. Inaba H, Sugita H, Kuboniwa M, Iwai S, Hamada M, Noda T, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes invasion of oral squamous cell carcinoma through induction of proMMP9 and its activation. *Cell Microbiol*. 2014;16(1):131-45.
471. Yee M, Kim S, Sethi P, Düzgüneş N, Konopka K. *Porphyromonas gingivalis* stimulates IL-6 and IL-8 secretion in GSMK-K, HSC-3 and H413 oral epithelial cells. *Anaerobe*. 2014;28:62-7.
472. Proffitt E. What will be the new normal for the dental industry? *Br Dent J*. 2020;228(9):678-80.
473. Virđi MK, Durman K, Deacon S. The Debate: What Are Aerosol-Generating Procedures in Dentistry? A Rapid Review. *JDR Clin Trans Res*. 2021;6(2):115-27.

474. Rathore K, Rathore HS, Singh P, Kumar P. Redefining aerosol in dentistry during COVID-19 pandemic. *Dent Res J (Isfahan)*. 2022;19:53.
475. Kumar PS, Subramanian K. Demystifying the mist: Sources of microbial bioload in dental aerosols. *J Periodontol*. 2020;91(9):1113-22.
476. Human respiratory tract model for radiological protection. A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection. *Ann ICRP*. 1994;24(1-3):1-482.
477. Peng X, Xu X, Li Y, Cheng L, Zhou X, Ren B. Transmission routes of 2019-nCoV and controls in dental practice. *Int J Oral Sci*. 2020;12(1):9.
478. Kim YG, Yun SG, Kim MY, Park K, Cho CH, Yoon SY, et al. Comparison between Saliva and Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of Respiratory Viruses by Multiplex Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2017;55(1):226-33.
479. Mason MR, Preshaw PM, Nagaraja HN, Dabdoub SM, Rahman A, Kumar PS. The subgingival microbiome of clinically healthy current and never smokers. *ISME J*. 2015;9(1):268-72.
480. Zheng Y, Chen H, Yao M, Li X. Bacterial pathogens were detected from human exhaled breath using a novel protocol. *J Aerosol Sci*. 2018;117:224-34.
481. Lea SC, Landini G, Walmsley AD. Thermal imaging of ultrasonic scaler tips during tooth instrumentation. *J Clin Periodontol*. 2004;31(5):370-5.
482. Iorgulescu G. Saliva between normal and pathological. Important factors in determining systemic and oral health. *J Med Life*. 2009;2(3):303-7.
483. Hallier C, Williams DW, Potts AJ, Lewis MA. A pilot study of bioaerosol reduction using an air cleaning system during dental procedures. *Br Dent J*. 2010;209(8):E14.
484. Singh A, Shiva Manjunath RG, Singla D, Bhattacharya HS, Sarkar A, Chandra N. Aerosol, a health hazard during ultrasonic scaling: A clinico-microbiological study. *Indian J Dent Res*. 2016;27(2):160-2.
485. Leggat PA, Kedjarune U. Bacterial aerosols in the dental clinic: a review. *Int Dent J*. 2001;51(1):39-44.
486. Szymańska J. Dental bioaerosol as an occupational hazard in a dentist's workplace. *Ann Agric Environ Med*. 2007;14(2):203-7.
487. Clarkson J, Ramsay C, Richards D, Robertson C, Aceves-Martins M, Group CW. Aerosol generating procedures and their mitigation in international dental guidance documents-a rapid review. *Cochrane Oral Health*. 2020;72:1-69.
488. Basu MK, Browne RM, Potts AJ, Harrington JM. A survey of aerosol-related symptoms in dental hygienists. *J Soc Occup Med*. 1988;38(1-2):23-5.



489. Fears AC, Klimstra WB, Duprex P, Hartman A, Weaver SC, Plante KS, et al. Persistence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Aerosol Suspensions. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(9):2168-71.
490. Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect.* 2020;104(3):246-51.
491. Gendron R, Grenier D, Maheu-Robert L. The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. *Microbes Infect.* 2000;2(8):897-906.
492. Thoden van Velzen SK, Abraham-Inpijn L, Moorer WR. Plaque and systemic disease: a reappraisal of the focal infection concept. *J Clin Periodontol.* 1984;11(4):209-20.
493. Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, et al. Prevention of infective endocarditis: guidelines from the American Heart Association: a guideline from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation.* 2007;116(15):1736-54.
494. Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L. Systemic diseases caused by oral microorganisms. *Endod Dent Traumatol.* 1994;10(2):57-65.
495. Wahl MJ. Myths of dental-induced endocarditis. *Arch Intern Med.* 1994;154(2):137-44.
496. Mouton C, Robert J. Infections loco-régionales et métastase des infections bucco-dentaires. *Pathologies buccales d'origine bactérienne*, Masson, Paris. 1994:161-73.
497. Cahill TJ, Prendergast BD. Infective endocarditis. *Lancet.* 2016;387(10021):882-93.
498. Bumm CV, Folwaczny M. Infective endocarditis and oral health-a Narrative Review. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2021;11(6):1403-15.
499. Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, Bolger AF, Bayer A, Ferrieri P, et al. Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. *J Am Dent Assoc.* 1997;277(22):1794-801.
500. Cunha BA, D'Elia AA, Pawar N, Schoch P. Viridans streptococcal (*Streptococcus intermedius*) mitral valve subacute bacterial endocarditis (SBE) in a patient with mitral valve prolapse after a dental procedure: the importance of antibiotic prophylaxis. *Heart Lung.* 2010;39(1):64-72.
501. Drangsholt MT. A new causal model of dental diseases associated with endocarditis. *Ann Periodontol.* 1998;3(1):184-96.

502. Herzberg MC, Meyer MW. Effects of oral flora on platelets: possible consequences in cardiovascular disease. *J Periodontol*. 1996;67(10 Suppl):1138-42.
503. Deshpande RG, Khan M, Genco CA. Invasion strategies of the oral pathogen *porphyromonas gingivalis*: implications for cardiovascular disease. *Invasion Metastasis*. 1998;18(2):57-69.
504. Pallasch TJ, Slots J. Antibiotic prophylaxis and the medically compromised patient. *Periodontol 2000*. 1996;10:107-38.
505. Schuman NJ, Turner JE. Brain abscess and dentistry: a review of the literature. *Quintessence Int*. 1994;25(6):411-3.
506. Montejo M, Aguirrebengoe K. *Streptococcus oralis* meningitis after dental manipulation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(2):126-7.
507. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1988;3(2):47-52.
508. Tada A, Hanada N. Opportunistic respiratory pathogens in the oral cavity of the elderly. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010;60(1):1-17.
509. Marik PE, Kaplan D. Aspiration pneumonia and dysphagia in the elderly. *Chest*. 2003;124(1):328-36.
510. Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol*. 2003;1(3):219-30.
511. Yumoto H, Hirota K, Hirao K, Ninomiya M, Murakami K, Fujii H, et al. The Pathogenic Factors from Oral Streptococci for Systemic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4571.
512. Nakano K, Hokamura K, Taniguchi N, Wada K, Kudo C, Nomura R, et al. The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in haemorrhagic stroke. *Nat Commun*. 2011;2:485.
513. Kusama K, Inoue H, Miyazaki Y, Kikuchi K, Sakashita H, Ochiai K. Microorganisms and cancer of the oral cavity. *Integr Cancer Sci Ther*. 2016;3:510-5.
514. Nagy KN, Sonkodi I, Szöke I, Nagy E, Newman HN. The microflora associated with human oral carcinomas. *Oral Oncol*. 1998;34(4):304-8.
515. Abiko Y, Nishimura M, Kusano K, Nakashima K, Okumura K, Arakawa T, et al. Expression of MIP-3alpha/CCL20, a macrophage inflammatory protein in oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol*. 2003;48(2):171-5.
516. Sakamoto H, Sasaki J, Nord CE. Association between bacterial colonization on the tumor, bacterial translocation to the cervical lymph nodes and subsequent postoperative infection in patients with oral cancer. *Clin Microbiol Infect*. 1999;5(10):612-6.

## **БИОГРАФИЈА АУТОРА**

Марија Јовановић рођена је 30.03.1994. године у Нишу.

Основну школу „Свети Сава“ завршила је са одличним успехом. Носилац је дипломе „Вук Караџић“. Средњу школу „Др Миленко Хаџић“, одсек фармацеутски техничар, завршила је 2013. године у Нишу такође са одличним успехом. Стоматолошки одсек Медицинског факултета Универзитета у Нишу уписала је школске 2013/2014. године. Дипломски рад под називом „Аутоимуна основа дерматоза са оралном локализацијом“ из предмета Орална медицина одбранила је 10.10.2018. године. Студије је завршила у року са просечном оценом 9,72.

Добитник је признања „Најбољи студент генерације III године“ студијског програма стоматологија у школској 2015/2016. години и „Најбољи студент генерације IV године“ студијског програма стоматологија у школској 2016/2017. години.

Током 2018. године била је демонстратор за УНО Орална медицина и пародонтологија на Медицинском факултету у Нишу.

Две школске године 2015/2016. и 2016/2017. била је стипендиста града Ниша. Добитник је стипендије „Доситеја“ Министарства омладине и спорта Републике Србије за 2018. годину.

Лекарски стаж обавила је на Клиници за стоматологију у Нишу 2018/2019. године. Државни испит положила је у Београду 2019. године.

Докторске академске студије уписала је 25.10.2018. године на Медицинском факултету Универзитета у Нишу.

Запошљена је на Медицинском факултету Универзитета у Нишу на предмету Стоматолошка протетика – претклиника од 01.11.2019. године, а за асистента је изабрана 22.02.2022. године.

Специјалистичке студије из предмета Стоматолошка протетика уписала је 30.11.2020. године на Медицинском факултету Универзитета у Нишу, и тренутно се налази на трећој години студија.

У току студија учествовала је у изради и презентацији студентских радова. Учествовала је на конгресима стоматолога са међународним учешћем, симпозијумима и семинарима континуиране едукације из области стоматологије. Аутор је и коаутор бројних стручних радова.

Учесник је пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије као истраживач под називом: “Производња нових дијететских млечних производа за ризичне популације заснована на квалитативној и квантитативној анализи биохемијских маркера здравственог ризика конзумирања млека” (Бр. 31060) од 18.04.2019. године. Такође, у својству истраживача је учесник интерног пројекта Медицинског факултета у Нишу под називом “Клиничка и базична истраживања орофацијалне регије и дентоалвеоларног комплекса” (Бр. 47), 2020-2023. године.

Члан је Стоматолошке коморе Србије. Течно говори Енглески језик.

Изјава 1.

## ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

### УТИЦАЈ ПОЗИЦИЈЕ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ ЗУБА НА ИНФЛАМАЦИЈУ ГИНГИВЕ И ПРОМЕНУ САСТАВА ОРАЛНЕ МИКРОБНЕ ФЛОРЕ

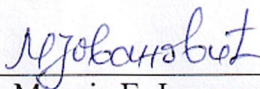
која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- 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, \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . године

Потпис аутора дисертације:

  
др Марија Г. Јовановић



Изјава 2.

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

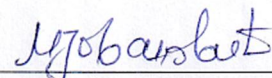
Наслов дисертације:

**УТИЦАЈ ПОЗИЦИЈЕ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ ЗУБА  
НА ИНФЛАМАЦИЈУ ГИНГИВЕ И ПРОМЕНУ САСТАВА  
ОРАЛНЕ МИКРОБНЕ ФЛОРЕ**

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

У Нишу, \_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_ године

Потпис аутора дисертације:



---

др Марија Г. Јовановић



Изјава 3.

### ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

#### УТИЦАЈ ПОЗИЦИЈЕ ДЕМАРКАЦИЈЕ ПРЕПАРАЦИЈЕ ЗУБА НА ИНФЛАМАЦИЈУ ГИНГИВЕ И ПРОМЕНУ САСТАВА ОРАЛНЕ МИКРОБНЕ ФЛОРЕ

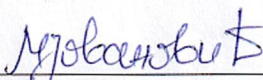
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

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, \_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_. године

Потпис аутора дисертације:

  
др Марија Г. Јовановић