

# Wpływ jednorazowej higienizacji jamy ustnej na prozapalną odpowiedź cytokinową u pacjentów z przewlekłym umiarkowanym zapaleniem przyzębia

## Effect of single oral cavity hygienization procedure on proinflammatory cytokine response in patients with chronic moderate periodontitis

ANNA K. SZKARADKIEWICZ

Katedra i Klinika Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii, Uniwersytet im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

**Wstęp.** Prozapalna odpowiedź cytokinowa odgrywa znaczącą rolę w patogenezie przewlekłego zapalenia przyzębia.

**Cel pracy.** Dokonanie oceny prozapalnej odpowiedzi cytokinowej (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17), po jednorazowej higienizacji jamy ustnej (scaling i root planing) u pacjentów z przewlekłym umiarkowanym zapaleniem przyzębia.

**Materiał i metody.** Diagnostyka kliniczna obejmowała badanie podmiotowe oraz stomatologiczne badanie przedmiotowe. Materiał badawczy stanowiły próbki zbiorcze płynu dziąsłowego. Oznaczenie cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17) wykonano metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

**Wyniki.** W I terminie badania, tj. przed zabiegiem higienizacyjnym (scaling, root planing) w grupie badanej (grupa 1) średnie wartości wskaźników klinicznych wynosiły: PI.I=2,11 $\pm$ 0,26, GI=1,61 $\pm$ 0,27, SBI=1,89 $\pm$ 0,33, PPD=3,54 $\pm$ 0,35, CAL=3,31 $\pm$ 0,32, natomiast poziomy cytokin były następujące: TNF- $\alpha$ =6,0 $\pm$ 0,98 pg/ml, IL-1 $\beta$ =21,1 $\pm$ 2,5 pg/ml oraz IL-17=18,88 $\pm$ 3,37 pg/ml. W II terminie badania, po dwóch tygodniach od przeprowadzenia zabiegów higienizacyjnych u 16 (46%) osób (podgrupa 1A) stwierdzono istotne statystycznie obniżenie średnich wartości wskaźników klinicznych (PI.I, GI, SBI, PPD, CAL) oraz obniżenie średnich wartości poziomów cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17). Natomiast, u 19 (54%) osób (podgrupa 1B) stwierdzono istotne zmniejszenie średnich wartości wskaźników PI.I oraz GI. Natomiast nie wykazano różnic w średnich wartościach wskaźników SBI, PPD i CAL w porównaniu z I terminem badania. Jednocześnie, w podgrupie 1B nie stwierdzono statystycznych zmian w poziomach cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17) w płynie dziąsłowym.

**Wnioski.** W umiarkowanym przewlekłym zapaleniu przyzębia u ponad połowy chorych (54%) jednorazowy zabieg higienizacyjny nie jest wystarczająco skuteczny dla poprawy parametrów klinicznych (w zakresie wskaźników SBI, PPD, CAL) i jednocześnie nie prowadzi do zmniejszenia poziomu cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17).

**Słowa kluczowe:** przewlekłe zapalenie przyzębia, higienizacja, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17

**Introduction.** Proinflammatory cytokine response plays a significant role in the pathogenesis of chronic periodontitis.

**Aim.** Evaluation of proinflammatory cytokine response (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17), following a single procedure of oral cavity hygienization (scaling and root planing) in patients with chronic moderate periodontitis.

**Material & methods.** Clinical diagnosis included anamnesis and dental physical examination. The study material included pooled samples of gingival fluid. The estimation of proinflammatory cytokine levels (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17) was conducted using the immunoenzymatic techniques (ELISA).

**Results.** At the first stage of studies, before the hygienization procedure (scaling, root planing) mean values of clinical indices in the examined group (group 1) amounted to the following: PI.I=2.11 $\pm$ 0.26, GI=1.61 $\pm$ 0.27, SBI=1.89 $\pm$ 0.33, PPD=3.54 $\pm$ 0.35, CAL=3.31 $\pm$ 0.32, and the following levels of cytokines were noted: TNF- $\alpha$ =6.0 $\pm$ 0.98 pg/ml, IL-1 $\beta$ =21.1 $\pm$ 2.5 pg/ml and IL-17=18.88 $\pm$ 3.37 pg/ml. Two weeks following the hygienization procedures in 16 (46%) persons (subgroup 1A) a significant decrease in mean values of clinical indices was detected (PI.I, GI, SBI, PPD, CAL) and a decrease in mean cytokine levels (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17). On the other hand, in 19 (54%) individuals (subgroup 1B) the significant decrease in mean values of the PI.I and GI indices was not accompanied by alterations in mean values of the SBI, PPD and CAL indices. In parallel, in the subgroup 1B no significant alterations were noted in the content of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17) in gingival fluid.

**Conclusions.** In moderate chronic periodontitis in over half of the patients (54%) a single hygienization procedure is not sufficiently effective to improve clinical parameters (in the form of SBI, PPD, CAL indices) and it is not accompanied by a decrease in levels of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17).

**Key words:** chronic periodontitis, hygienization, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17

## Wstęp i cel pracy

Przewlekłe zapalenie przyzębia (ang. chronic periodontitis) jest chorobą zapalną prowadzącą do destrukcji dziąseł, cementu korzeniowego, ozębnej oraz wyrostka zębodołowego kości. W etiopatogenezie periodontitis podstawową rolę odgrywają bakterie patogenne określane jako periodontopatogeny: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* oraz *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Choroba ta występuje najczęściej u osób dorosłych i charakteryzuje się umiarkowanym lub ciężkim przebiegiem klinicznym [1-3]. Badania wykazały, że periodopatogeny mogą oddziaływać na komórki układu immunologicznego, pobudzając je do wytworzenia mediatorów reakcji zapalnych [4, 5].

W patogenezie przewlekłego zapalenia przyzębia znaczącą rolę odgrywa również pro-zapalna odpowiedź cytokinowa. Intensywność tej odpowiedzi, wyrażona przez wysoki poziom TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-17 w kieszonkach przyzębnych, może determinować postać kliniczną choroby [6, 7]. Obecnie w leczeniu periodontitis stosuje się metody niechirurgiczne, chirurgiczne oraz wspomagające leczenie farmakologiczne. Pomimo rozwoju metod leczniczych, złotym standardem w leczeniu zapaleń przyzębia są zabiegi higienizacyjne polegające na usunięciu płytki i kamienia nazębnego (scaling) oraz wygładzeniu powierzchni korzeni zębów (root planing) [8].

Biorąc pod uwagę powyższe, celem niniejszej pracy było dokonanie oceny prozapalnej odpowiedzi cytokinowej (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17), po jednorazowej higienizacji jamy ustnej (scaling i root planing) u pacjentów z przewlekłym umiarkowanym zapaleniem przyzębia.

## Materiał i Metody

Badaniami objęto 35 dorosłych osób (18 kobiet i 17 mężczyzn) wyłonionych spośród pacjentów Kliniki Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Do badań zostali zakwalifikowani pacjenci ogólnie zdrowi, nie podający w wywiadzie występowania chorób ogólnych, nie otrzymujący leków przeciwbakteryjnych w ostatnich 3 tygodniach oraz niepalący papierosów. Pacjenci nie byli leczeni periodontologicznie w ciągu roku poprzedzającego badania, a także nie stosowali dodatkowych środków higieny jamy ustnej (nitka dentystyczna, płyny antyseptyczne, irygatory). Grupę badawczą stanowiły osoby z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia w wieku 31-46 lat. Średni czas trwania choroby wynosił  $19.4 \pm 2.8$  miesięcy (18-27 miesięcy).

U wszystkich badanych osób (grupa 1), podczas wizyty stomatologicznej, pobrano materiał do badań laboratoryjnych – płyn dziąsłowy z wszystkich kieszonek przyzębnych (I termin badania). Następnie u pacjentów wykonano profesjonalne oczyszczenie zębów (scaling) wraz z wygładzeniem powierzchni korzeni (root planing) oraz instruktaż higieny jamy ustnej. Po 2 tygodniach od przeprowadzonych zabiegów higienizacyjnych ponownie pobrano płyn dziąsłowy do badań laboratoryjnych (II termin badania).

Badania były przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej, przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

## Diagnostyka kliniczna

Diagnostyka kliniczna obejmowała badanie podmiotowe oraz stomatologiczne badanie przedmiotowe. Badanie podmiotowe dotyczyło występowania chorób układowych oraz stosowania leków przeciwbakteryjnych w ostatnich 3 tygodniach i palenia papierosów przez pacjentów. U każdego pacjenta oceniano higienę jamy ustnej, stan dziąseł, głębokość kieszonek przyzębnych oraz utratę przyczepu łącznotkankowego.

Do oceny stanu higieny jamy ustnej zastosowano wskaźnik płytki nazębnej – Plaque Index (PI) według Silness i Loe [9]. Do oceny stanu dziąseł zastosowano wskaźnik dziąsłowy – Gingival Index (GI) według Loe i Silness [10, 11] oraz wskaźnik krwawienia ze szczeliny dziąsłowej – Sulcus Bleeding Index (SBI) według Mühlemanna i Sona [12]. Utratę tkanek przyzębia, w następstwie choroby przyzębia, określono na podstawie pomiaru głębokości kieszonek (Periodontal Probing Depth – PPD) oraz pomiaru położenia przyczepu łącznotkankowego – CAL (Clinical Attachment Level). Pomiaru PPD i CAL dokonywano na 6 powierzchniach przy wszystkich obecnych w jamie ustnej zębach z zastosowaniem skalowanej sondy periodontologicznej WHO 621 Hu-Friedy (skala do 11,5).

Wyniki badania przedmiotowego stanowiły podstawę do rozpoznania choroby przyzębia. Przyjęto kryteria uproszczonej klasyfikacji chorób dziąseł i przyzębia, która uwzględnia stopień zaawansowania przewlekłego zapalenia przyzębia [13]. Przewlekłe zapalenie przyzębia umiarkowane rozpoznawano w przypadkach, gdy:

- Gingival Index GI > 0
- Sulcus Bleeding Index SBI > 0
- Clinical Attachment Level: 3-4 mm
- 2 zęby z kieszonkami o głębokości > 4 mm [14, 15].

## Pobieranie próbek płynu dziąsłowego

Materiał badawczy stanowiły próbki zbiorcze płynu dziąsłowego. Płyn ten pobierano strzykawką

Hamilton 25 µl (Hamilton, USA) z cienką igłą endodontyczną (średnica 0,3 mm, długość 25 mm) z wszystkich kieszonek przyzębnych po izolacji od dostępu śliny. Przed pobieraniem próbek, pacjentów nie poddawano żadnym zabiegom higienizacyjnym. Igłę wprowadzano do kieszonek przyzębnych, ostrożnie aspirując materiał. Następnie pobrany płyn dziąsłowy umieszczano w jałowych probówkach typu Eppendorf opisując numerami odpowiadającymi numerom kart pacjentów [16, 17].

### Oznaczanie cytokin

#### Oznaczanie TNF-α w płynie dziąsłowym

Oznaczanie TNF-α wykonano w płynie dziąsłowym metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu zestawu wysokiej czułości – Quantikine HS ELISA Human TNF-α (R&D Systems), charakteryzujący się średnią minimalną wykrywalnością (MDD) wynoszącą 0,106 pg/ml. Wartość absorbancji odczytywano przy długości fali A=490 nm za pomocą czytnika Reader 250 (bioMerieux). Wyniki obliczano z wyznaczeniem krzywej standardowej.

#### Oznaczanie IL-1β w płynie dziąsłowym

Oznaczanie IL-1β wykonano w płynie dziąsłowym metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu zestawu wysokiej czułości – Quantikine HS ELISA Human IL-1β/IL-1F2 (R&D Systems), charakteryzujący się średnią minimalną wykrywalnością (MDD) wynoszącą 0,057 pg/ml. Wartość absorbancji odczytywano przy długości fali A=490 nm za pomocą czytnika Reader 250 (bioMerieux). Wyniki obliczano z wyznaczonej krzywej standardowej.

#### Oznaczanie IL-17 w płynie dziąsłowym

Oznaczanie IL-6 wykonano w płynie dziąsłowym metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu zestawu Human IL-17 Platinum ELISA (eBioscience), charakteryzujący się średnią minimalną wykrywalnością (MDD) wynoszącą 0,5 pg/ml. Wartość absorbancji odczytywano przy długości fali A=450 nm za pomocą czytnika Reader 250 (bioMerieux). Wyniki odczytywano po wyznaczeniu krzywej standardowej.

### Metody statystyczne

Uzyskane w badaniach wyniki analizowano przy użyciu programu komputerowego STATISTICA 8 dla systemu operacyjnego Windows. W analizie wskaźników klinicznych (PI.I, GI, SBI, PPD, CAL) zastosowano test nieparametryczny Mann-Whitney'a oraz test Kruskal-Wallis'a. W analizie porównawczej poziomów cytokin w badanych grupach zastosowano test nieparametryczny Kruskala-Wallisa z testem Dunn'a. Różnicę uznawano za istotną statystycznie jeśli  $p < 0,05$ .

### Wyniki

W I terminie badania, przed zabiegiem higienizacyjnym (skaling, root planing) w grupie badanej (grupa 1) średnie wartości wskaźników klinicznych wynosiły: PI.I=2,11±0,26, GI=1,61±0,27, SBI=1,89±0,33, PPD=3,54±0,35, CAL=3,31±0,32; natomiast poziomy cytokin były następujące: TNF-α=6,0±0,98 pg/ml, IL-1β=21,1±2,5 pg/ml oraz IL-17=18,88±3,37 pg/ml. W analizowanej grupie pacjentów (grupa 1) w II terminie badania – po dwóch tygodniach od przeprowadzonych zabiegów higienizacyjnych (skaling, root planing), na podstawie oceny klinicznej, wyodrębniono dwie podgrupy pacjentów: podgrupę 1A obejmującą 16 (46%) osób oraz podgrupę 1B liczącą 19 (54%) osób. W podgrupie 1A stwierdzono istotne statystycznie obniżenie średnich wartości wszystkich wskaźników klinicznych (PI.I, GI, SBI, PPD, CAL) oraz obniżenie średnich wartości poziomów cytokin (TNF-α, IL-1β oraz IL-17) względem wyników uzyskanych w terminie I. Natomiast, w podgrupie 1B stwierdzono istotne zmniejszenie średnich wartości wskaźników PI.I oraz GI w II terminie badania, podczas, gdy średnie wartości wskaźników SBI, PPD i CAL nie różniły się od wartości z terminu I. Jednocześnie, w podgrupie 1B nie stwierdzono statystycznych zmian w poziomach cytokin (TNF-α, IL-1β oraz IL-17) w płynie dziąsłowym. Uzyskane średnie wartości badanych wskaźników klinicznych zestawiono w tabeli I. Wyniki poziomów TNF-α, IL-1β oraz IL-17 w płynie dziąsłowym pacjentów przedstawiono w tabeli II.

Tabela I. Wartości wskaźników klinicznych (średnia±SD) u pacjentów z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia w I i II terminie badania  
Table I. Values of clinical indices (mean±SD) in patients with moderate chronic periodontitis in 1st and 2nd term of study

Wskaźniki kliniczne	Termin badania		
	Termin I	Termin II	
	Pacjenci grupy 1 n=35	Podgrupa 1A n=16	Podgrupa 1B n=19
PII	2,11±0,26	1,35±0,31*	1,56±0,26*
GI	1,61±0,27	1,21±0,31*	1,31±0,32*
SBI	1,89±0,33	1,28±0,34*	1,66±0,36
PPD	3,54±0,35	3,09±0,44*	3,23±0,28
CAL	3,31±0,32	2,89±0,35*	3,05±0,24

\* różnica istotna statystycznie względem uzyskanych wyników w terminie I.

Tabela II. Poziomy TNF-α, IL-1β i IL-17 (pg/ml) w płynie dziąsłowym u pacjentów w I i II terminie badania  
Table II. Levels of TNF-α, IL-1β and IL-17 (pg/ml) in gingival fluid of patients in 1st and 2nd term of study

Termin badania	Grupy pacjentów	TNF-α (pg/ml)	IL-1β (pg/ml)	IL-17 (pg/ml)
Termin I	Grupa 1 n=35	6,0±0,98	21,1±2,5	18,88±3,37
Termin II	Grupa 1 n=35	4,12±0,72*	11,5±2,21*	12,3±2,17*
	Podgrupa 1A n=16	5,48±0,96	20,6±2,67	17,63±3,27
	Podgrupa 1B n=19			

\* różnica istotna statystycznie względem uzyskanych wyników w terminie I.

## Dyskusja

Zabiegi higienizacyjne (scaling i root planing) są tradycyjnym, niechirurgicznym sposobem leczenia przewlekłego zapalenia przyzębia. Zabiegi te prowadzą do usunięcia kamienia nazębnego, zmniejszenia ilości płytki nazębnej oraz zmniejszenia ogólnej liczby drobnoustrojów w kieszonkach przyzębnych [18]. Ponadto, prowadzą do powstania długiego przyczepu nabłonkowego oraz ponownego przyczepu łącznotkankowego. W związku z tym, tkanki gospodarza skuteczniej chronią przed mikroorganizmami, co prowadzi do ograniczenia zmian zapalnych tkanek miękkich i redukcji głębokości kieszeni dziąsłowych [19]. Zabiegi higienizacyjne wpływają również na zmniejszenie odczynu zapalnego w obrębie przyzębia. Wilson i wsp. [20] wykazali, że po 6 miesiącach od wykonania scalingu i root planingu dochodzi do zaniku histologicznych wykładników przewlekłego zapalenia w tkankach przyzębia oraz do naprawy kości wyrostka zębodołowego. Stwierdzane w przewlekłym zapaleniu przyzębia znaczne zwiększenie prozapalnej odpowiedzi cytokinowej wydaje się być efektem zaburzeń jej regulacji wewnątrzkomórkowej lub silnej ekspresji genów docelowych w następstwie aktywacji ich transkrypcji przez periopatogeny [21, 22].

W przedstawionej pracy wykazano, że po 2 tygodniach od zastosowania zabiegów higienizacyjnych u 46% pacjentów (podgrupa 1A) dochodzi do istotnego statystycznie obniżenia średnich wartości wszystkich badanych wskaźników klinicznych (PI.I, GI, SBI, PPD, CAL) oraz obniżenia średnich wartości poziomów cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17) w płynie dziąsłowym. Natomiast u 54% pacjentów (podgrupa 1B) zabiegi higienizacyjne powodują redukcję wartości wskaźników PI.I i GI. Jednak zmianom nie ulegają wartości wskaźników klinicznych (SBI, PPD, CAL) oraz poziomy cytokin prozapalnych w płynie dziąsłowym.

Wpływ niechirurgicznego leczenia na poziomy IL-1 $\beta$ , były badane przez różne zespoły badawcze, które wykazały, że scaling i root planing powodują zmniejszenie wartości IL-1 $\beta$  w płynie dziąsłowym [23-25].

Sexton i wsp. [26] stwierdzili, że po 16 tygodniach od scalingu i root planingu dochodzi do istotnego zmniejszenia poziomu IL-1 $\beta$  w ślinie. Engebretson i wsp. [24] wykazali silną korelację pomiędzy poziomem IL-1 $\beta$  a wartościami wskaźników PPD i CAL. Zmniejszenie wartości poziomów IL-1 $\beta$  w płynie dziąsłowym oraz poprawę kliniczną w zakresie wskaźników dziąsłowych, z wyjątkiem CAL, po 4 tygodniach od zabiegu higienizacyjnego wykazali Konopka i wsp. [27]. Duarte i wsp. [28] wykazali natomiast po 6 miesiącach od zabiegów higienizacyjnych poprawę kliniczną oraz spadek poziomów TNF- $\alpha$  i IL-17 w płynie dziąsłowym u pacjentów z przewlekłym, jak i agresywnym zapaleniem przyzębia. Z kolei Dag i wsp. [29] stwierdzili zmniejszenie wartości wskaźników klinicznych oraz redukcję poziomu TNF- $\alpha$  w surowicy po 3 miesiącach od zastosowania niechirurgicznego leczenia zapalenia przyzębia.

Dobrze już udokumentowano, że cytokinowa odpowiedź prozapalna może odgrywać ważną rolę w reakcji odpornościowej wobec patogenów bakteryjnych i grzybów [30]. Ponadto, intensywność cytokinowej odpowiedzi prozapalnej wydaje się determinować umiarkowaną i ciężką postać kliniczną przewlekłego zapalenia przyzębia. Zmniejszone, zatem poziomy cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17) mogą zapobiegać progresji przewlekłego zapalenia przyzębia [6, 7, 31].

## Wniosek

W umiarkowanym przewlekłym zapaleniu przyzębia u ponad połowy chorych (54%) jednorazowy zabieg higienizacyjny nie jest wystarczająco skuteczny dla poprawy parametrów klinicznych (w zakresie wskaźników SBI, PPD, CAL) i jednocześnie nie prowadzi do zmniejszenia poziomu cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17).

*Badania były finansowane z uczelnianego projektu badawczego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr 502-14-02209324-08456).*

## Piśmiennictwo / References

1. Kim YC, Ko Y, Hong SD, et al. Presence of Porphyromonas gingivalis and plasma cell dominance in gingival tissues with periodontitis. Oral Dis 2010, 16: 375-381.
2. Kerschull M, Papapanou PN. Periodontal microbial complexes associated with specific cell and tissue responses. J Clin Periodontol 2011, 38(Suppl.11): 17-27.
3. Szkaradkiewicz AK, Karpiński. Microbiology of chronic periodontitis. J Biol Earth Sci 2013, 3(1): M14-M20.
4. Stathopoulou PG, Benakanakere MR, Galicia JC, et al. Epithelial cell pro-inflammatory cytokine response differs across dental plaque bacterial species. J Clin Periodontol 2010, 37(1): 24-29.
5. Teles R, Sakellari D, Teles F, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. J Periodontol 2010, 81: 89-98.

6. Santos VR, Ribeiro FV, Lima JA, et al. Cytokine levels in sites of chronic periodontitis of poorly controlled and well-controlled type 2 diabetic subjects. *J Clin Periodontol* 2010, 37(12): 1049-1058.
7. Szkaradkiewicz AK, Karpiński TM, Zeidler A, et al. Protective effect of oral lactobacilli in pathogenesis of chronic periodontitis. *J Physiol Pharmacol* 2011, 62: 685-689.
8. Sanz I, Alonso B, Carasol M, et al. Nonsurgical treatment of periodontitis. *J Evid Based Dent Pract* 2012, 12(3 Suppl): 76-86.
9. Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964, 22(1): 121-135.
10. Løe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1963, 22: 121-134.
11. Løe H. The gingival index, the plaque index and the retention index system. *J Periodontol* 1967, 38: 610-616.
12. Mühlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odont Acta* 1971, 15: 107-113.
13. Górka R. Nowe wytyczne Amerykańskiej Akademii Periodontologii. *Dent Med Probl* 2012, 49(1): 47-51.
14. Oral Health Surveys: basic methods. 4th ed. WHO, Geneva 1997: 26-39.
15. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999, 4: 1-6.
16. Champagne CME, Buchanan W, Reddy MS, et al. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontol* 2000 2003, 31: 167-180.
17. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000 2003, 31: 32-42.
18. Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, et al. Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol* 2000 2004, 36: 98-120.
19. Adriaens PA, Adriaens LM. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontol* 2000 2004, 36: 121-145.
20. Wilson TG Jr, Carnio J, Schenk R, Myers G. Absence of histologic signs of chronic inflammation following closed subgingival scaling and root planing using the dental endoscope: human biopsies – a pilot study. *J Periodontol* 2008, 79(11): 2036-2041.
21. Sandros J, Karlsson C, Lappin DF, et al. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Dent Res* 2000, 79(10): 1808-1814.
22. Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol* 2000 2006, 40: 77-93.
23. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, et al. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol* 2000, 71(10): 1535-1545.
24. Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002, 29(1): 48-53.
25. Buduneli N, Buduneli E, Cetin EO, et al. Clinical findings and gingival crevicular fluid prostaglandin E2 and interleukin-1-beta levels following initial periodontal treatment and short-term meloxicam administration. *Expert Opin Pharmacother* 2010, 11(11): 1805-1812.
26. Sexton WM, Lin Y, Kryscio RJ, et al. Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. *J Clin Periodontol* 2011, 38(5): 434-441.
27. Konopka L, Pietrzak A, Brzezińska-Błaszczyk E. Effect of scaling and root planing on interleukin-1 $\beta$ , interleukin-8 and MMP-8 levels in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Periodontol Res* 2012, 47(6): 681-688.
28. Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, et al. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J Periodontol* 2010, 81(7): 1056-1063.
29. Dag A, Firat ET, Arıkan S, et al. The effect of periodontal therapy on serum TNF-alpha and HbA1c levels in type 2 diabetic patients. *Aust Dent J* 2009, 54(1): 17-22.
30. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998, 9: 248-266.
31. Passoja A, Puijola I, Knuutila M, et al. Serum levels of interleukin-10 and tumour necrosis factor- $\alpha$  in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010, 37: 881-887.