

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Evelina Alkimavičienė

**PERIODONTITO GYDYMO
OPTIMIZAVIMAS
PROANTOCIANIDINAIŠ:
POVEIKIS UŽDEGIMINIAMS
PERIODONTO AUDINIAMS**

Daktaro disertacija
Medicinos ir sveikatos mokslai,
odontologija (M 002)

Kaunas, 2026

Disertacija rengta 2020–2025 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Odontologijos fakulteto Dantų ir burnos ligų klinikoje.

Mokslinė vadovė

prof. dr. Nomeda Basevičienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija – M 002).

Konsultantės:

prof. dr. Rasa Banienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

prof. dr. Nijolė Savickienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Odontologijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas

prof. dr. Arūnas Vasiliauskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija – M 002).

Nariai:

prof. dr. Vilma Jūratė Balčiūnienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Alina Pūrienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija – M 002);

doc. dr. Eglė Zasčiurinskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija – M 002);

dr. Giulia Brunello (Duseldorfo universitetas (Vokietija), medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija – M 002).

Disertacija bus ginama viešajame Odontologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2026 m. rugpjūčio 21 d. 12 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Naujausių farmacijos ir sveikatos technologijų centro A-202 auditorijoje.

Disertacijos gynimo vietos adresas: Sukilėlių pr. 13, LT-50162 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

Evelina Alkimavičienė

**OPTIMIZING PERIODONTITIS
TREATMENT USING
PROANTHOCYANIDINS:
IMPACT ON INFLAMED
PERIODONTAL TISSUES**

Doctoral Dissertation
Medical and Health Sciences,
Odontology (M 002)

Kaunas, 2026

Dissertation has been prepared at the Department of Dental and Oral Pathology, Faculty of Odontology of the Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2020–2025.

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Nomeda Basevičienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Odontology – M 002).

Consultants:

Prof. Dr. Rasa Baniienė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010);

Prof. Dr. Nijolė Savickienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003).

Dissertation is defended at the Odontology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences:

Chairperson

Prof. Dr. Arūnas Vasiliauskas (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Odontology – M 002).

Members:

Prof. Dr. Vilma Jūratė Balčiūnienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Dr. Alina Pūrienė (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Odontology – M 002);

Assoc. Prof. Dr. Eglė Zasčiurinskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Odontology – M 002);

Dr. Giulia Brunello (University of Düsseldorf (Germany), Medical and Health Sciences, Odontology – M 002).

Dissertation will be defended at the open session of the Odontology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences at 12:00 on the 21st of August 2026 in the auditorium A-202 of the Centre for the Advances Pharmaceutical and Health Technologies of the Lithuanian University of Health Sciences.

Address: Sukilėlių 13, LT-50162 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

IVADAS.....	9
Darbo tikslas ir uždaviniai	11
Darbo mokslinis naujumas.....	12
Klinikinis reikšmingumas	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	14
1.1. Periodontitas	14
1.1.1. Periodontito samprata, epidemiologija, rizikos veiksniai	14
1.1.2. Periodontito patogenezė	14
1.1.3. Periodontito klasifikacija	15
1.1.4. Periodontito vertinimo kriterijai.....	18
1.1.5. Periodontito biocheminiai vertinimo kriterijai.....	19
1.2. Periodontito gydymas	20
1.2.1. Burnos higienos svarba	20
1.2.2. Periodontito gydymo strategija	21
1.2.3. Papildomų preparatų panaudojimas periodontito gydymo metu.....	21
1.3. Proantocianidinai	22
1.3.1. Proantocianidinų kilmė	22
1.3.2. Proantocianidinų cheminė sandara.....	22
1.3.3. Proantocianidinų veikimo mechanizmas.....	23
1.3.4. Proantocianidinų biologinis aktyvumas	25
1.3.5. Proantocianidinų panaudojimas periodontito gydymui: ikiklinikinės studijos <i>in vitro</i>	27
1.3.6. Proantocianidinų panaudojimas periodontito gydymui: ikiklinikinės studijos <i>in vivo</i>	28
1.3.7. Proantocianidinų nauda periodontito gydymui: klinikinės studijos...	28
1.3.8. Proantocianidinų saugumas.....	29
2. METODAI	30
2.1. Tyrimai.....	30
2.1.1. Ikiklinikiniai tyrimai	30
2.1.1.1. Proantocianidinų išskyrimas	31
2.1.1.2. Bakterijų padermės, auginimo metodika.....	32
2.1.1.3. Pelių dantenų fibroblastai.....	33
2.1.1.4. Žmogaus dantenų fibroblastų linija, auginimo metodika.....	33
2.1.1.5. Žmogaus periodonto raiščio fibroblastų linija, auginimo metodika.....	34
2.1.1.6. Žmogaus periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės.....	34
2.1.1.7. Proantocianidinų citotoksiškumo vertinimas	35
2.1.1.8. Proantocianidinų antibakterinio poveikio analizė	36
2.1.1.9. Proantocianidinų poveikis pelių dantenų fibroblastų metabolizmui, esant bakterinei infekcijai: fluorescencinės analizės tyrimas.....	36

2.1.1.10.	Proantocianidinų poveikis žmogaus dantenų fibroblastų metabolizmui, esant bakterinei infekcijai: „lenktynių dėl paviršiaus“ modelis	37
2.1.1.11.	Proantocianidinų poveikis ląstelių apoptozės mechanizmo kaskadoje, esant bakterinei infekcijai: kaspazės-3 ir kaspazės-8 kiekio vertinimas	37
2.1.1.12.	Uždegiminio atsako reguliavimas, naudojant proantocianidinus, esant bakterinei infekcijai: citokinų matavimo tyrimas	38
2.1.1.13.	Proantocianidinų ir chlorheksidino digliukonato poveikio dantenų fibroblastams lyginamoji analizė	38
2.1.1.14.	Proantocianidinų proliferacinio poveikio žmogaus dantenų ir periodonto raiščio fibroblastams vertinimas: TGF-β1 ELISA tyrimas.....	39
2.1.2.	Klinikinis tyrimas.....	39
2.1.2.1.	Proantocianidinų plėvelės	40
2.1.2.2.	Tyrimo dizainas.....	40
2.1.2.3.	Bioetikos leidimas	40
2.1.2.4.	Tyrimo dalyviai, įtraukimo bei atmetimo kriterijai.....	41
2.1.2.5.	Imties dydžio matavimas.....	41
2.1.2.6.	Atsitiktinė atranka, paskirstymas	41
2.1.2.7.	Tyrimo profilis	42
2.1.2.8.	Taikyta intervencija, periodontologinis gydymas	42
2.1.2.9.	Klinikiniai ir imunologiniai rodikliai, kalibracija	44
2.1.2.10.	Imunologinis vertinimas.....	45
2.1.3.	Statistinė analizė.....	45
3.	REZULTATAI.....	47
3.1.	Laboratorinių tyrimų rezultatai	47
3.1.1.	Proantocianidinų citotoksiškumo vertinimo rezultatai.....	47
3.1.2.	Proantocianidinų antibakterinio poveikio analizės rezultatai.....	47
3.1.3.	Proantocianidinų poveikio pelių dantenų fibroblastų metabolizmui, esant bakterinei infekcijai, fluorescencinės analizės tyrimo rezultatai	49
3.1.4.	Proantocianidinų poveikio žmogaus dantenų fibroblastų metabolizmui, esant bakterinei infekcijai: „lenktynių dėl paviršiaus“ tyrimo rezultatai	51
3.1.5.	Proantocianidinų poveikis ląstelių apoptozei, bakterinės infekcijos metu: kaspazės-3 ir kaspazės-8 kiekio vertinimo rezultatai.....	53
3.1.6.	Uždegiminio atsako reguliavimas, naudojant proantocianidinus, esant bakterinei infekcijai: citokinų matavimo tyrimų rezultatai	54
3.1.7.	Proantocianidinų ir chlorheksidino digliukonato poveikio dantenų fibroblastams lyginamosios analizės rezultatai	57
3.1.8.	Proantocianidinų proliferacinio potencialo žmogaus dantenų ir periodonto raiščio fibroblastams analizės (TGF-β1 ELISA tyrimo) rezultatai	58

3.2. Klinikinio tyrimo rezultatai	59
3.2.1. Klinikinio tyrimo dalyviai	59
3.2.2. Klinikinių parametų pokyčiai	60
3.2.3. Biocheminių parametų pokyčiai	65
3.2.4. Šalutinis poveikis	66
3.2.5. Ekonominiai svertai	66
4. REZULTATŲ APTARIMAS	67
4.1. Proantocianidinų poveikis periodonto audiniams	67
4.2. Proantocianidinų klinikinis poveikis	71
IŠVADOS	74
SUMMARY	75
BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS.....	116
PRIEDAI.....	133
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS DISERTACIJOS TEMATIKA	134
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS NE DISERTACIJOS TEMATIKA	135
CURRICULUM VITAE	136
PADĖKA	137

SANTRUMPOS

PSRE	–	<i>Pelargonium sidoides</i> šaknų sausasis ekstraktas (angl. <i>Pelargonium sidoides root extract</i>)
PACN	–	proantocianidina
BOP	–	kraujavimas po zondavimo (angl. <i>bleeding on probing</i>)
CAL	–	klinikinis audinių prisitvirtinimo lygis (angl. <i>clinical attachment level</i>)
CEJ	–	cemento-emalio jungtis
PD	–	periodontologinės kišenės zondavimo gylis (angl. <i>periodontal pocket probing depth</i>)
CHX	–	chlorheksidino digliukonatas (angl. <i>chlorhexidine digluconate</i>)
HGF-1	–	žmogaus dantenų fibroblastai (angl. <i>human gingival fibroblasts</i>)
TGF-β1	–	transformuojantis augimo faktorius- beta1 (angl. <i>transforming growth factor- beta 1</i>)
HPDLF	–	žmogaus periodonto raiščio fibroblastai (angl. <i>human periodontal ligament fibroblasts</i>)
ELISA	–	su fermentais susijęs imunosorbentų tyrimas (angl. <i>enzyme- linked immunosorbent assay</i>)
SE	–	standartinė paklaida (angl. <i>standard error</i>)
NF-κB	–	branduolio faktoriaus kappa-B (angl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
IC50	–	pusinė maksimali slopinamoji koncentracija (angl. <i>half maximal inhibitory concentration</i>)
PI	–	propidžio jodidas (angl. <i>propidium iodide</i>)
MAPK	–	mitogeno aktyvuota baltymo kinazė (angl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
PI3K/Akt/mTOR	–	fosfoinozido 3-kinazė / baltymų kinazė B / žinduolių rapamicino taikiny (angl. <i>phosphoinositide 3-kinase / protein kinase B / mechanistic target of rapamycin</i>)
MINST	–	minimaliai invazyvus nechirurginis periodontito gydymas (angl. <i>minimally invasive non-surgical therapy</i>)
MINST+PACN	–	minimaliai invazyvus nechirurginis periodontito gydymas, panaudojant proantocianidinus (angl. <i>minimally invasive non-surgical therapy with proanthocyanidins</i>)

IVADAS

Periodontitas yra lėtinė uždegiminė liga, kuri nulemia aplink dantis esančių audinių (periodonto) destruktiją. Sunkia periodontito forma serga daugiau nei 1 milijardas žmonių, ligos paplitimas siekia 12,5 proc. [1]. Mokslinėje literatūroje prognozuojama, kad iki 2050 m. daugiau nei 1,5 milijardo žmonių (+44,32 proc.) sirgs sunkaus laipsnio periodontitu, ir ši liga taps viena dažniausių ligų visame pasaulyje [1]. Periodonto ligos yra ne tik dažniausia dantų netekimo priežastis, bet yra didelė visuomenės sveikatos problema, sukurianti ne tik socialinę, bet ir ekonominę poveikį [2–3].

Pagrindinis šios ligos gydymo metodas yra konservatyvus periodontito gydymas [4]. Konservatyvaus gydymo metu gali būti panaudojami vietinio poveikio preparatai, siekiant papildomai pagerinti klinikinius rodiklius, išvengti galimo chirurginio gydymo poreikio ateityje bei palaikyti periodonto audinių sveikatą. Papildomam gydymo efektui pasiekti gali būti skiriami vietiniai preparatai, tokie kaip vietiniai antiseptikai ar antibiotikai [4]. Dažniausiai skiriamos stiprų cheminių poveikį turinčios medžiagos (pvz. chlorheksidino digliukonato tirpalo) naudojimas gydymo metu turi būti svarstytinas, nes gali turėti neigiamos įtakos ilgalaikėje perspektyvoje dėl nustatyto citotoksinio poveikio burnos ertmės ląstelėms [5–7]. Antibiotikų panaudojimas periodontito gydymui yra kontraversiškai vertinamas, siūlomas naudoti tik išskirtiniais atvejais [4, 8]. Be tikėtino teigiamo antibiotikų poveikio, taip pat yra stebimas neigiamas šalutinis reiškinys: augantis bakterijų atsparumas antibiotikams [9]. Ilgalaikė bei pasikartojanti sisteminė ar vietinė antibiotikoterapija ne tik neužtikrina tvarios ligos remisijos, bet ir didina ligos recidyvo bei progresavimo riziką. Nekontroliuojamas antimikrobinių preparatų spaudimas skatina kryptingą periodonto patogenų rezistentiškumo evoliuciją. Mikroorganizmuose aktyvuojami įvairūs molekuliniai atsparumo mechanizmai: tikslinių struktūrų (taikinių) modifikacija, vaistines medžiagas inaktyvuojančių fermentų sintezė, sumažėjęs išorinės ląstelės sienelės bei membraną laidumas ir aktyvi ksenobiotikų ekskrecija per efliukso (išmetimo) siurblius [10–11]. Kita kritinė šio gydymo metodo pasekmė – neselektyvus poveikis burnos mikrobiomui. Komensalinės bakterijų padermės atlieka esminį vaidmenį palaikant burnos ertmės gleivinės homeostazę bei kolonizacinį atsparumą [12]. Tradicinių plataus spektro antibiotikų vartojimas sukelia gilią mikrobinę disbiozę, kurios metu sunaikinama apsauginė autochtoninė mikroflora, taip paradoksaliai sudarant palankias sąlygas oportunistinių patogenų rekolonizacijai.

Šiuolaikinės antibakterinės medžiagos, naudojamos periodontito gydymui, turėtų veikti bakterijas kitokiu mechanizmu nei veikia antibiotikai, ir

turėtų veikti selektyviai – specifiskai paveikti tik periodontitą sukeliančias bakterijas, tuo pačiu saugant komensalines bakterijas ir burnos ertmės ląsteles. Šiomis savybėmis pasižymi augalinės kilmės multikomponentė medžiaga- proantocianidinai.

Literatūroje randama skirtingų natūralios kilmės PACN šaltinių, tokių kaip vynuogių sėklos, spanguolės, mėlynės [13], tačiau šiame tyrime daugiausiai dėmesio skirta *Pelargonium sidoides* šaknų sausajam ekstraktui (PSRE), kuriame PACN yra pagrindiniai komponentai, atsakingi už ekstrakto poveikį [14]. *Pelargonium sidoides* DC – tai snaputinių (*Geraniaceae*) šeimos daugiametis žolinis augalas, kilęs iš Pietų Afrikos. *Pelargonium sidoides* DC sausasis šaknų ekstraktas yra sudėtingas natūralių cheminių junginių mišinys, kurį sudaro pirminiai (angliavandeniai, aminorūgštys, peptidai ir mineralai) ir antriniai (daugiausia proantocianidinai) metabolitai [14, 15]. Apie 40 proc. sausojo PSRE ekstrakto galima priskirti proantocianidinų šeimos oligomerams, daugiausia sudarytiems iš galokatechino ir epigalokatechino darinių [14].

Proantocianidinai (PACN), augalinės kilmės flavonoidų grupės junginiai, yra gerai žinomi dėl daugybės naudingų biologinių savybių, įskaitant periodonto ir aplink implantą esančių audinių sveikatos palaikymą [16, 17]. PACN randami skirtingose augalinėse žaliavose: vaisiuose, lapuose, šaknyse ar sėklose. PACN cheminė struktūra priklauso nuo augalo rūšies, naudojamose šios frakcijos išskyrimui [18]. PACN struktūros skirtumai gali turėti didelės įtakos gebėjimui prisijungti prie specifinių receptorių, o tai savo ruožtu daro įtaką jų aktyvumui ląstelėse ir audiniuose bei bendram veiksmingumui. Apskritai, specifinis PACN fitocheminis profilis tiesiogiai veikia biologinį aktyvumą (antioksidacinį, priešuždegiminį poveikį). Todėl šių detalių svarbos supratimas yra labai svarbus terapiniam pritaikymui. PACN priešuždegiminės [19, 20], antibakterinės [21], antioksidacinės savybės [22–24] yra gerai ištirtos. Tyrimai parodė, kad PACN gali sumažinti alveolinio kaulo retėjimą [17, 25, 26], slopina kolageno irimą [27, 28], skatina kaulo regeneraciją [29–31], skatina dantų implantų oseintegraciją [32]. Šie gebėjimai yra labai svarbūs norint pagerinti gijimo procesą ir skatinti naujų periodonto audinių formavimąsi, siekiant sėkmingos periodonto ir periimplantinio audinių regeneracijos.

Nors pastarojo meto literatūros šaltiniuose daugėja duomenų apie proantocianidinų terapinį potencialą odontologijoje, mokslinėje erdvėje vis dar trūksta sistemingų laboratorinių ir validuotų atsitiktinių imčių kontroliuojamų klinikinių tyrimų, leidžiančių vienareikšmiškai pagrįsti standartizuotų *Pelargonium sidoides* proantocianidinų frakcijų biocheminį ir klinikinį efektyvumą. Tyrėjų išvados išlieka fragmentiškos dėl proantocianidinų cheminio

heterogeniškumo, o tai riboja moksliskai pagrįstų, lokalaus poveikio fitopreparatų integraciją į kasdienes periodontito gydymo protokolus. Nuspręsta atlikti proantocianidinų, bakterijų bei dantenų ląstelių tarpusavio sąveikavimo mechanizmo analizę, norint išsiaiškinti biocheminį poveikį periodonto audiniams, panaudojant *Pelargonium sidoides* DC sausąjį šaknų ekstraktą. Taip pat atliktas dvigubai aklas atsitiktinių imčių kontroliuojamas klinikinis tyrimas, panaudojant proantocianidinus konservatyvaus periodontito gydymo metu, kuris yra būtinas, norint išsiaiškinti fitoterapinės medžiagos klinikinį poveikį.

Šiame darbe tiriamas proantocianidinų (iš *Pelargonium sidoides* DC šaknų sausojo ekstrakto) selektyvus antibakterinis poveikis prieš periodonto patologinę mikroflorą, teigiamas citoprotekcinis bei proliferacinis poveikis dantenų ląstelėms. Iki šiol pirmasis atsitiktinės imties kontroliuojamas klinikinis tyrimas, vertinantis proantocianidinų (iš *Pelargonium sidoides* DC šaknų sausojo ekstrakto) poveikį, parodė teigiamą klinikinį efektą konservatyvaus periodontito gydymo metu. Apibendrinant, proantocianidinų turinčių preparatų įtraukimas į periodontito gydymą yra naudingas, siekiant užkirsti kelią ligos progresavimui pradinėse stadijose, sumažinant tolimesnio chirurginio gydymo poreikį, gydymo kaštus bei padedant išsaugoti periodonto sveikatą palaikomojo gydymo metu.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas

Ištirti proantocianidinų (išgautų iš *Pelargonium sidoides* DC šaknų sausojo ekstrakto) panaudojimo galimybes periodontito ligos atvejais.

Darbo uždaviniai

1. Įvertinti proantocianidinų antibakterinį poveikį skirtingoms bakterijų padermėms;
2. Įvertinti proantocianidinų poveikį ląstelių metabolizmui, esant bakterinei infekcijai;
3. Palyginti proantocianidinų ir chlorheksidino digliukonato poveikį periodonto sveikatai;
4. Įvertinti proantocianidinų proliferacinį potencialą periodonto audiniuose;
5. Nustatyti, ar papildomas proantocianidinų panaudojimas konservatyvaus periodontito gydymo metu padeda pasiekti papildomą klinikinį rodiklių pagerėjimą, palyginus su konservatyviu periodontito gydymu;

6. Nustatyti, ar papildomas proantocianidinų panaudojimas konservatyvaus periodontito gydymo metu padeda pasiekti papildomą biocheminių parametrų pagerėjimą, palyginus su konservatyviu periodontito gydymu.

Darbo mokslinis naujumas

Mokslinėje literatūroje vis dar trūksta duomenų apie proantocianidinų, išgautų iš afrikinių pelargonijų (*Pelargonium sidoides* DC.) šaknų sausojo ekstrakto, pritaikymą periodontitui gydyti.

Atlikti ikiklinikinių laboratorinių tyrimų rezultatai parodė, kad proantocianidiniai (iš *Pelargonium sidoides* DC šaknų sausojo ekstrakto) pasižymi selektyviu antibakteriniu poveikiu: antibakteriškai veikia periodonto patogeninę mikroflorą (*A. actinomycetemcomitans*) tuo pačiu saugant komensalinę mikroflorą. Šie rezultatai gali pakeisti požiūrį į iki šiol dažnai naudojamus antibiotikus bakterinių ligų (įskaitant ir periodontitą) gydyme.

Ikiklinikiniai tyrimai parodė, kad proantocianidiniai geba išsaugoti ląstelių gyvybingumą, esant bakterinei infekcijai, kuri stebima ir periodontito atvejais. Tyrimai patvirtino, kad proantocianidiniai mažina uždegiminių mediatorių sekreciją, geba slopinti ląstelių apoptozę, esant bakterinei infekcijai, tokiu būdu išreiškdami priešuždegiminį poveikį. Tai gali būti naudinga palaikomojo periodontito gydymo metu pasiektų rezultatų išsaugojimui.

Taip pat ikiklinikinių tyrimų rezultatai atskleidė, kad santykinai mažos koncentracijos proantocianidiniai skatino žmogaus dantenų ir periodonto plyšio fibroblastų proliferaciją, priešingai nei chlorheksidino digliukonatas, kuris pasižymėjo citotoksiniu poveikiu. Ši ypatybė gali būti itin naudinga klinikinėje praktikoje, siekiant ne tik užtikrinti antibakterinį poveikį periodonto audiniams, bet ir sudaryti sąlygas jų regeneracijai.

Iki šiol nebuvo atliktas nei vienas atsitiktinės imties kontroliuojamas klinikinis tyrimas, tiriantis proantocianidinų, išgautų iš *Pelargonium sidoides* DC. šaknų sausojo ekstrakto, klinikinį poveikį konservatyvaus periodontito gydyme. Atlikto tyrimo rezultatai parodė, jog taikant nechirurginį periodontito gydymą ir vietiskai panaudojant proantocianidinus galima statistiškai reikšmingai pasiekti geresnius klinikinius rodiklius (PD, CAL), lyginant su atliktu „aukso standarto“ gydymu – podanteniniu instrumentavimu be papildomų medžiagų įtraukimo. Papildomas klinikinių rodiklių pagerėjimas gali nulemti chirurginių procedūrų poreikio sumažėjimą ateityje. Papildomas proantocianidinų vartojimas kartu su podanteniniu instrumentavimu skatino papildomą teigiamą poveikį ne tik klinikiniams, bet ir imunologiniams parametrams. Biocheminių rodiklių analizė patvirtino, kad MMP-3 kiekis seilėse

yra reikšmingas žymuo, susijęs su lėtinės periodonto infekcijos sunkumu, ir gali atspindėti periodonto audinių būklę.

Dėl priešūždegiminio, ląstelių gyvybingumą apsaugančio bei proliferacinį poveikį turinčio aktyvumo proantocianidinai yra inovatyvi priemonė periodonto ligoms gydyti. Šie junginiai pasižymi unikaliu antibakteriniu gebėjimu selektyviai veikti gramneigiamas periodonto ir periimplantinių audinių patogenines bakterijas, kartu išsaugant burnos ertmės mikrobiotos komensalinius organizmus. Šis atradimas yra perspektyvus vystant personalizuotos medicinos kryptį.

Klinikinis reikšmingumas

Taikant nechirurginį periodontito gydymą ir panaudojant proantocianidinus galima statistiškai reikšmingai pagerinti klinikinius rodiklius (PD, BOP, CAL vertes), lyginant su atliekamu podanteniniu instrumentavimu be papildomų medžiagų įtraukimo. Papildomas klinikinių rodiklių pagerėjimas gali padėti išvengti chirurginių procedūrų ilgalaikio palaikomojo gydymo metu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Periodontitas

1.1.1. Periodontito samprata, epidemiologija, rizikos veiksniai

Periodontitas – tai lėtinė uždegiminė liga, kuri nulemia aplink dantis esančių audinių (periodonto) destruktiją. Pagrindinė šios ligos klinikinė išraiška yra dantenų uždegimas, klinikinio dantenų prisitvirtinimo lygio sumažėjimas, alveolinio kaulo rezorbcija, dantų netekimas [33]. Periodontitas yra klasifikuojamas pagal stadijas, laipsnį, remiantis tarptautiniu Europos periodontologų federacijos ir Amerikos Periodontologijos akademijos sutarimu [34].

Epidemiologinių tyrimų rezultatai nežymiai varijuoja, tačiau periodontito paplitimo pasireiškimas išlieka aukštas: lengvo laipsnio periodontito stadijos nustatomos beveik 50 proc. žmonių, sunkaus laipsnio stadijos – 7,4–11,2 proc. žmonių [35, 36]. Epidemiologiniai tyrimai rodo, kad periodonto ligos yra susijusios su amžiumi ir lytimi: dažniausiai pasireiškia 50–54 metų amžiaus vyrams [37]. Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis sunkios formos periodonto patologiją turi beveik kas penktas Lietuvos gyventojas (21,3 proc. virš 15 metų amžiaus asmenų) [38].

Pagrindinės periodontito išsivystymo priežastys yra burnos mikrobiotos disbalansas ir iškreiptas organizmo imuninis atsakas į mikrobiotos pokyčius. Esant normaliai burnos ertmės mikrobiotai, užtikrinama periodonto audinių sveikata, vyrauja normali sąveika tarp mikroorganizmų ir imuninės sistemos. Periodontito išsivystymui turi reikšmės rizikos veiksniai (genetiniai veiksniai, rūkymas, sisteminės ligos). Reikšmingiausių rizikos veiksnių, tokių kaip rūkymas (> 10 cigarečių per dieną) ar nekontroliuojamas diabetas ($HbA1c \geq 7,0$ proc.) gali nulemti agresyvaus, greitai progresuojančio periodontito pasireiškimą [39]. Periodontito pasireiškimui įtakos gali turėti ir kitos sisteminės ligos ar būklės: metabolinis sindromas, osteoporozė, viršsvoris, vitamino D ar kalcio trūkumas [40]. Nepakankama asmens individuali burnos priežiūra, geros burnos higienos įpročių neturėjimas, supratimo stoka, motyvacijos nebuvimas, socio-ekonominis statusas, bendri mitybos įpročiai, fizinio aktyvumo stoka, alkoholio vartojimas bei stresas išlieka reikšmingais aspektais periodontito pasireiškimui ir vystymuisi [41].

1.1.2. Periodontito patogenezė

Fiziologinėmis sąlygomis periodonto homeostazę ir audinių vientisumą užtikrina adekvatus vietinis imuninis atsakas. Pagrindinį vaidmenį kontroliuojant oportunistinės mikrofloros patogeniškumą atlieka morfologiškai bei

funkcionaliai diferencijuotas jungties epitelis, veikiantis kaip selektyvus anatomicinis barjeras. Šioje zonoje inicijuojama nuolatinė imunokompetentinių ląstelių (daugiausia polimorfonuklearinių leukocitų) chemotaksė bei prouždegiminių makromolekulių transudacija iš dantenų vagelės skysčio, o tai deaktyvuoja bakterinius toksinus ir užkerta kelią biofilmo invazijai į gilesnius periodonto struktūrinius sluoksnius [42].

Periodontito atveju esant periodonto jungties epitelio struktūriniam pažeidimui, vyksta tarpląstelinio kontakto netekimas, jungties epitelio atsiskyrimas nuo danties paviršiaus, dėl ko palaipsniui vyksta periodontologinės kišenės formavimasis, o kartu ir organizmo gynybinės sistemos barjero išbalansavimas. Esant periodonto jungties epitelio išplonėjimui ir išopėjimui, didėja mikroorganizmų penetracija ir jų išskiriamų toksinų išskyrimas į jungiamuosius audinius, kas nulemia periodonto ligos progresavimą [42].

Esant rizikos veiksniams, nepakankamai individualiai burnos higienai ir susiformavus bakteriniam apnašui dantenų vagelėje, mikrobiota keičiasi, vyksta iškreiptas uždegiminis destruktinis imuninės sistemos atsakas [43]. Dantenų vagelėje persistuojantys gram neigiami anaerobiniai mikroorganizmai, raudonojo komplekso bakterijos (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bakterijos ir jų išskiriami toksinai stimuliuoja organizmo ląsteles (makrofagus, monocitus, fibroblastus, osteocitus, keratinocitus), didėja prouždegiminių citokinų (IL-1 β , IL-18, TNF- α , IL-6, IL-8, PGE-2) sekrecija [44–46]. Padidėję prouždegiminių citokinų kiekiai stimuliuoja MMP (MMP-8, MMP-9, MMP-12) sekreciją, dėl ko prasideda ekstraląstelinio matrikso degradacija, jungiamojo audinio prisitvirtinimo netekimas, periodonto raiščio kolageno skaidulų destruktija [47–49]. Šis procesas taip pat skatina RANKL raišką, todėl inicijuojamas osteoklastų susiformavimas ir prasideda alveolinio kaulo destruktija [47, 50]. Vykstant periodonto raiščio kolageno skaidulų, alveolinio kaulo destruktijai stebimas periodontito vystymasis, klinikinių rodiklių pablogėjimas (periodontologinių kišenių zondavimo gylio didėjimas, kraujavimo po zondavimo atsiradimas, klinikinio dantenų prisitvirtinimo lygio pokyčiai). Konservatyvaus periodontito gydymo metu šalinamos bakterinės apnašos, granuliaciniai audiniai, dėl ko stebimas klinikinių rodiklių pagerėjimas: periodontologinių kišenių zondavimo gylio sumažėjimas, nestebimas kraujavimas po zondavimo.

1.1.3. Periodontito klasifikacija

Periodontitas yra klasifikuojamas, remiantis tarptautiniu Europos periodontologų federacijos ir Amerikos Periodontologijos akademijos sutarimu [34]. Periodontitas gali būti skirstomas į stadijas (1–4), laipsnį (A–C) pagal ligos sudėtingumą (1.1.3.1 ir 1.1.3.2 lentelės).

1.1.3.1 lentelė. Periodontito skirstymas į stadijas pagal ligos sudėtingumą

Periodontito stadija		I stadija	II stadija	III stadija	IV stadija
Sunkumas	CAL rodiklis tarpdančiuose	1–2 mm	3–4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	Rentgenologinis kaulo netekimas	< 15 proc.	15–33 proc.	Siekia vidurinę šaknies trečdalį ir aukščiau	Siekia vidurinę šaknies trečdalį ir aukščiau
	Dantų netekimas	Nėra netekta		Netekta ≤ 4 dantų	Netekta ≥ 5 dantų
Sudėtingumas	Vietiška stebima	• PPD ≤ 4 mm • Stebimas horizontalus kaulo netekimas	• PPD ≤ 5 mm • Stebimas horizontalus kaulo netekimas	• PPD ≥ 6 mm • Vertikalus kaulo netekimas ≥ 3 mm • Furkacijų defektai II–III	• PPD ≥ 6 mm • Vertikalus kaulo netekimas ≥ 3 mm • Furkacijų defektai II–III • Sąkandžio atstatymo poreikis dėl: – kramtymo disfunkcijos; – antrinės okliuzinės traumos (dantų paslankumas ≥ 2); – sąkandžio problemos. • Likę < 20 dantų, sudaro 10 dantų porų
Apimtis, paplitimas	Papildomas rodiklis prie stadijos	• Lokalizuoti • Generalizuoti • Įtraukiantis kandžius ir krūminius dantis			

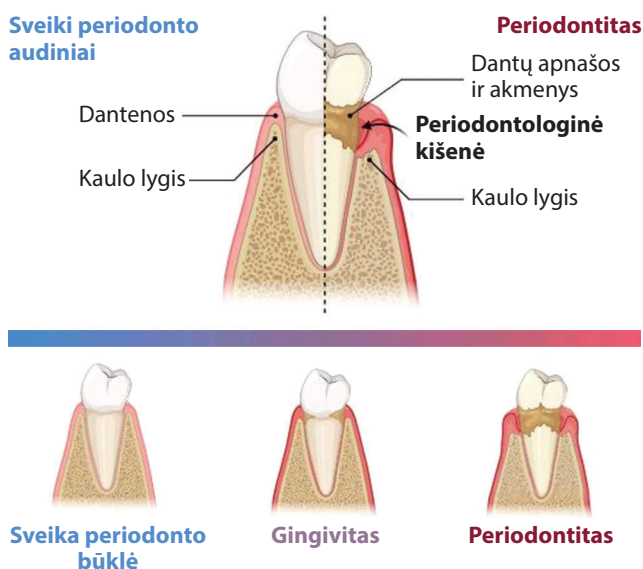
1.1.3.2 lentelė. Periodontito skirstymas į laipsnius pagal ligos sudėtingumą.

Pirminis kriterijus	Progresavimas		A laipsnis	B laipsnis	C laipsnis
	Tiesioginis progresavimo įrodymas	Radiologinis tyrimas arba CAL			
	Netiesioginis progresavimo įrodymas	Kaulo netekimas procentais/amžius	Per 5 metus nepasikeitė < 0,25	< 2 mm per 5 metus 0,25–1	≥ 2 mm per 5 metus > 1
	Rizikos faktoriai	Atvejo fenotipas	Daug apnašų, mažai audinių destruktijos	Dantų apnašų kiekis atspindi audinių destruktijos lygį	Stebima mažai dantų apnašų, bet didelė audinių destruktija
		Rūkymas	Nerūko	< 10 cigarečių per dieną	≥ 10 cigarečių per dieną
Laipsnį modifikuojantys veiksniai		Cukrinis diabetas	Nėra cukrinio diabeto	Glikozės lygis < 8,57 mmol/l su cukrinio diabeto diagnoze	Glikozės lygis ≥ 8,57 mmol/l su cukrinio diabeto diagnoze

Sveika periodonto būklė apibrėžiama atvejais, kai nėra uždegiminės būklės ($BOP < 10$ proc.) bei nestebima dantenų prisitvirtinimo netekimo ($PPD \leq 4$ mm) ar kaulo lygio netekimo [4]. Gingivitas yra apibrėžiamas atvejais, kai stebimas dantenų uždegimas ($BOP > 10$ proc.), bet nestebima dantenų prisitvirtinimo netekimo ($PPD \leq 4$ mm) ar kaulo lygio netekimo. Periodontitas yra apibrėžiamas atvejais, kai stebimas periodonto audinių uždegimas, kaulo lygio netekimas (rentgeno nuotraukose), dantenų prisitvirtinimo netekimas ($PPD > 4$ mm su BOP; $PPD \geq 6$ mm, nepaisant BOP), stebimas dantų netekimas dėl periodontito, intrakauliniai ar furkacijų defektai. Po atlikto periodontologinio gydymo stabili periodonto būklė nustatoma tada, kai stebima $BOP < 10$ proc. ir $PPD \leq 4$ mm.

1.1.4. Periodontito vertinimo kriterijai

Periodontologinės kišenės gylis. Periodontologinės kišenės gylis (PPD) yra rodiklis, žymintis atstumą nuo dantenų krašto iki dantenų vagelės dugno (1.1.4.1 pav.). Periodontito atveju pagilėjusi dantenų vagelė yra skiriamasis ženklas periodontito diagnostikoje [42]. Dantenų zondavimo gylio padidėjimas vyksta dėl epitelinės jungties praradimo: vyksta jungties epitelio proliferacija, dantenų vagelė tampa periodontologine kišene, o kliniškai yra stebimas didesnis zondavimo gylis [51]. Esant $PPD > 4$ mm su BOP arba esant $PPD \geq 6$ mm, nepaisant BOP, nustatomas periodontitas.



1.1.4.1 pav. Sveiki periodonto audiniai, gingivitas ir periodontitas

Sukurta naudojant BioRender.com.

Klinikinis dantenų prisitvirtinimo lygis. Klinikinis dantenų prisitvirtinimo lygis (CAL) yra kliniškai vertinamas rodiklis, kai matuojamas dviejų atstumų (dantenų krašto iki cemento emalio jungties atstumą ir PPD) sąryšis [52]. Klinikinio dantenų prisitvirtinimo lygio matavimui yra svarbu, kurioje pozicijoje yra dantenų kraštas (virš, po ar sulig cemento-emalio jungtimi). Taip pat svarbus ir rentgenologinis alveolinio kaulo būklės vertinimas.

Kraujavimas po zondavimo. Kraujavimas po zondavimo (BOP) yra dažniausiai naudojamas rodiklis uždegimo diagnostikai. Zondavimo metu pasirodžius kraujavimui, žymima teigiama BOP vertė, nesant kraujavimo – neigiama. BOP vertinimas yra naudingas parametras klinikiniam uždegimo vertinimui, ypač palaikomojo periodonto gydymo metu [53]. Esant sveikai periodonto būklei BOP < 10 proc., esant gingivitui, periodontitui – BOP > 10 proc.

Rentgenologinis kaulo netekimo vertinimas. Periodontito atvejais rentgenologinio tyrimo pagalba gali būti atliekama alveolinio kaulo lygio, kaulo defekto morfologijos, kaulo kokybės analizė [54]. Pirminei diagnostikai pirmo pasirinkimo tyrimas – panoraminė rentgenograma, o papildomos intraoralinės nuotraukos gali būti naudingos, esant greit progresuojančiam periodontitui (B, C laipsnis) [55].

Dantų paslankumas. Dentų paslankumas yra svarbus rodiklis ne tik pirminėje diagnostikoje, bet ir sudarant periodontologinio gydymo planą. Danties paslankumo vertinimas atliekamas nustatant danties stabilumą žandikaulio kaule. Danties stabilumui turi įtakos žandikaulio kaulo lygis aplink danties šaknį, periodonto raiščio plotis, uždegiminė fazė, dantų šaknų skaičius ir forma [56]. Dentų paslankumas gali būti vertinamas pagal Miller [57], Wasserman [58], Armitage [59], Carranza [60] klasifikaciją nuo 0 iki 3 lygmenų, kai 0 – fiziologinis dantų paslankumas, 3 – didelis paslankumas.

1.1.5. Periodontito biocheminiai vertinimo kriterijai

Periodontito diagnostikai ir gydymo efektyvumo vertinimui gali būti pasitelkiamas citokinų kiekio vertinimas. Citokinų kiekio svyravimai periodonto ligų atvejais atsispindi tiek dantenų vagelės skysčio, tiek seilių mėginiuose [61]. Skirtingų periodontito stadijų metu stebimas skirtingų citokinų padidėjimas. Ankstyvoje periodontito stadijoje stebimas PGE₂, IL-1, IL-6, TNF- α koncentracijos padidėjimas, vidurinėse periodontito stadijose stebimas MMP-8, MMP-9, MMP-12 padidėjimas, paskutinėje periodontito stadijoje randami dideli kiekiai TNF- α , IL-1 β , RANKL [62]. Specifinių citokinų kiekio padidėjimas atvaizduoja uždegiminių procesų raidą periodonto audiniuose: ankstyvose stadijose – epitelinės jungties praradimą, jungiamojo audinio irimo pradžią, vėlesnėse stadijose – osteoklastogenezę, alveolinio

kaulo rezorbciją. Vieni citokinai gali būti jautresni biožymenys periodonto ligų diagnostikai nei kiti: periodontitu sergančių pacientų dantenų vagelės skystyje rasti didesni citokinių IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, MMPs, IFN- γ , TNF- α , PGE-2 koncentracijos [19, 63]. Nors atliekama daug mokslinių tyrimų bandant išanalizuoti periodontitui jautrius ir specifiskus biocheminius rodiklius, vis tik „auksinis standartas“ periodonto ligų diagnostikoje lieka klinikiniai periodontito parametrai.

MMP ir TIMP vertinimas. Periodontito mechanizmo analizėje svarbi citokinių grupė- matriksio metaloproteinazės (angl. *matrix metalloproteinases*, MMP) ir jų inhibitoriai (TIMP) [64, 65]. Ankstyvose uždegimo stadijose citokinai didina neutrofilų, makrofagų, B-ląstelių, T-ląstelių aktyvumą, dėl ko yra skatinama uždegiminių audinių destrukcija [66]. Citokinai, veikdami fibroblastus, leukocitus, skatina MMP raišką. Normaliomis sąlygomis MMP palaiko periodonto audinių remodeliaciją, žaizdos gijimą, angiogenezę [67], o periodontito atvejais padidėjęs MMP kiekis rodo periodonto audinių destrukcinius procesus: kolageno skaidulų irimą, alveolinio kaulo netekimą [62, 65]. Periodonto ligų diagnostikoje, kaip biožymuo, gali būti panaudojamas ir MMP bei TIMP (MMP inhibitoriaus) santykis: didėjant MMP, mažėja TIMP kiekis ir atvirkščiai [68]. MMP padidėjimas ir TIMP sumažėjimas lemia kolageno irimą jungiamajame audinyje ir kauliniame audinyje [69], o kliniškai šių parametrų matavimas seilių ar dantenų vagelės skysčio mėginiuose gali atspindėti periodonto ligos progresavimą [70–74].

1.2. Periodontito gydymas

1.2.1. Burnos higienos svarba

Prieš atliekant bet kokią periodontologinio gydymo etapą reikalinga užtikrinti optimalią apnašų kontrolę, nes nepalaikant pakankamos individualios burnos higienos stebimas periodonto uždegimo pasikartojimas bei nestabilūs ilgalaikiai periodontologinio gydymo rezultatai [75, 76].

Svarbią vietą palaikomojo periodontologinio gydymo metu (pasiekus visišką periodontologinių kišenių sugijimą) užima reguliariai atliekama profesionalios burnos higienos procedūra. Norint pasiekti podanteninės mikrofloros pokyčių bei klinikinių rezultatų stabilumą ilgalaikio palaikomojo gydymo metu, rekomenduojami profesionalios burnos higienos vizitai kas 3–4 mėnesius [53, 77]. Palaikomasis gydymas 6 mėnesių intervalais dažniausiai nulemia gerą periodonto audinių stabilizavimą, tačiau kiekvieno paciento pakartotinių vizitų dažnis nustatomas individualiai, panaudojant periodonto ligų rizikos įvertinimo schemą [78]. Palaikomasis periodontologinis gydymas

stabilizuoja prieš tai pasiektą periodonto ligos lygį, gerina ilgalaikę periodonto ligos paveiktų dantų prognozę [79].

1.2.2. Periodontito gydymo strategija

Esant periodontitui pagrindinė gydymo taktika yra nechirurginis periodontologinis gydymas. Visos nechirurginio gydymo taktikos (vieno etapo visos burnos dezinfekcija, visos burnos arba segmentinis dantų šaknų podanteninis instrumentavimas) nulemia panašius ilgalaikius gydymo rezultatus [80–84].

Po nechirurginio gydymo likus nesugijusioms periodontologinėms kišenėms, taikant chirurginį periodontologinį gydymą gali būti pasiekiamas visiškas periodontologinių kišenių sugijimas [85]. Taikomos chirurginio gydymo metodikos, tokios kaip lopo operacijos, rezekcinės ar regeneracinės periodontologinės chirurginės procedūros, padeda geriau pasiekti galias periodontologines kišenes, taip pat padeda regeneruoti ar rezekuoti tas sritis, kurios prisideda prie komplikuoto ligos valdymo (intrakauliniai, tarpšaknio defektai) [4]. Visiškas patologinių periodontologinių kišenių eliminavimas lemia puikią ligos kontrolę ir geresnę ilgalaikę prognozę. Svarbu paminėti, kad chirurginis gydymas lemia ir galimus šalutinius efektus, tokius kaip dantenų recesijos padidėjimas ar didesnis pooperacinis dantų jautrumas [86].

Užtikrinus optimalią burnos higieną skirtingi gydymo protokolai nulemia panašų ilgalaikį tiek nechirurginio, tiek chirurginio periodontologinio gydymo rezultatą [87]. Vis tik šiuolaikinėje periodontologijoje pirmenybė teikiama nechirurginiam periodontologiniam gydymui.

1.2.3. Papildomų preparatų panaudojimas periodontito gydymo metu

Papildomų preparatų panaudojimas konservatyvaus periodontito gydymo metu gali duoti papildomą naudą. Europos periodontologų asociacija publikavo periodontito gydymo rekomendacijas, kur pasiektas bendras sutarimas, kad papildomos priemonės, pvz., sisteminiai antibiotikai, nesteroidiniai vaistai nuo uždegimo, probiotikai, nelemia klinikinių rodiklių pagerėjimo [4]. Be to, perteklinis sisteminių antibiotikų naudojimas nulemia rezistentiškų bakterijų kolonijų formavimąsi [88, 89], kas ilgalaikėje perspektyvoje tampa dideliu iššūkiu įvairių kitų susirgimų valdyme.

Tačiau papildomos lokaliai skiriamos cheminės medžiagos, pvz., chlorheksidino digliukonato skalavimo skystis, vietškai naudojami kontroliuoto ilgalaikio išskyrimo preparatai (chlorheksidino digliukonato plėvelės, lokaliai naudojamų antibiotikų geliai) gali užtikrinti papildomą klinikinį efektą

[4]. Podanteninis instrumentavimas ir papildomų vietinių preparatų panaudojimas rodo papildomą klinikinių parametrų pagerėjimą (papildomą periodontologinių kišenių rodiklių (PPD, CAL) pagerėjimą) [90, 91]. Taigi papildomų antibakteriškai veikiančių vietinių preparatų naudojimas yra itin svarbus, siekiant maksimaliai pagerinti klinikinius rodiklius konservatyvaus periodontito gydymo metu.

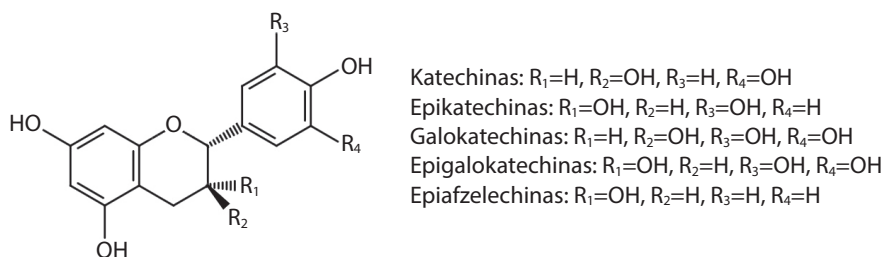
1.3. Proantocianidiniai

1.3.1. Proantocianidinų kilmė

Proantocianidiniai yra polifenolių grupei flavonoidų poklasiui priskiriamos biologiškai aktyvios medžiagos. Proantocianidiniai taip pat žinomi kaip kondensuoti taninai, sudėtingi flavonoidiniai polimerai, kurių natūraliai randama įvairiuose augaluose. Cheminė proantocianidinų sandara priklauso nuo augalų rūšių, kurios yra naudojamos frakcijos išgavimui [18]. Šiame tyrime testuojama proantocianidinų frakcija yra išgaunama iš *Pelargonium sidoides* DC šaknų sausojo ekstrakto (PSRE), augalinės kilmės vaistinio preparato, kuris pasižymi didele proantocianidinų koncentracija. Tyrinėjant panašios kilmės (*Pelargonium sidoides* ar *Pelargonium reniforme*) proantocianidinų antibakterinį efektą, rezultatai statistiškai reikšmingai nesiskyrė nei tarp skirtingų augalų rūšių nei tarp skirtingos augalinės žaliavos panaudojimo [92].

1.3.2. Proantocianidinų cheminė sandara

Kadangi PACN yra oligomeriniai flavonoidai, susidarantys flavan-3-olio monomerų (katechino, epikatechino ir kt.) polimerizacijos metu, tiksli PACN struktūra priklauso nuo flavan-3-olio tipo, polimerizacijos laipsnio, erdvinės konfigūracijos ir kt. [18]. Struktūrinių vienetų tipas ir vieta gali turėti įtakos jų antioksidaciniam pajėgumui, stabilumui, biologiniam prieinamumui: skirtingos sudėties gali turėti įtakos laisvųjų radikalų neutralizavimo veiksmingumui [93]. Flavan-3-olio struktūriniai vienetai yra katechinas, epikatechinas, epigalokatechinas, epiafzelechinas (1.3.2.1 pav.). Flavan-3-olio monomerai yra polimerizuojami ir gaunami proantocianidinų oligomerai (dimerai, trimerai, tetramerai), multimerai (esant daugiau nei 5 subvienetams) [18].



1.3.2.1 pav. Proantocianidinų cheminė struktūra

Sukurta naudojant BioRender.com

Polimerizacijos laipsnis gali turėti įtakos biologiniam aktyvumui: trumpos grandinės PACN greitai absorbuojami virškinimo trakte, o ilgos grandinės PACN pasižymi stipriu priešuždegiminiu poveikiu [94, 95].

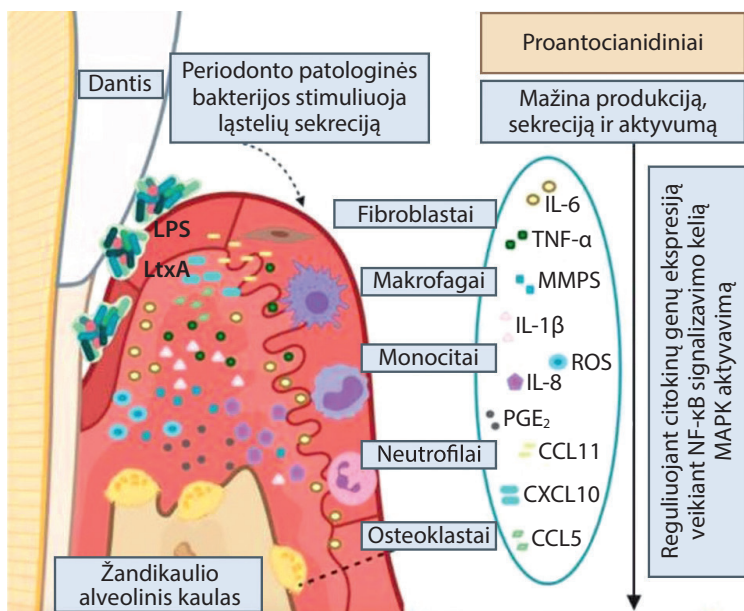
PACN turi hidroksilo grupių, o jų padėtis gali sustiprinti PACN gebėjimą neutralizuoti reaktyviasias deguonies formas, paveikdama bendrą antioksidacinį pajėgumą [96]. Be to, hidroksilo grupės sudaro vandenilinius ryšius su kitomis molekulėmis, tokiu būdu moduluodamos NF- κ B ir kitų signalinių kelių, atsakingų už uždegimą skatinančių mediatorių sintezę, aktyvumą [97]. PACN gali turėti skirtingas struktūrines modifikacijas (pvz., esterifikaciją), kurios gali pakeisti jų biologines savybes ir aktyvumą [98].

Proantocianidinų struktūros ypatumai turi didelę įtaką jų gebėjimui prisijungti prie specifinių receptorių, o tai savo ruožtu veikia jų aktyvumą ląstelėse ir audiniuose bei lemia bendrą veiksmingumą. Apskritai, specifinis PACN fitocheminis profilis tiesiogiai veikia jų biologinį aktyvumą (pvz., antioksidacinį ir priešuždegiminį poveikį). Todėl šių ypatumų supratimas yra labai svarbus proantocianidinų terapiniam pritaikymui.

1.3.3. Proantocianidinų veikimo mechanizmas

Nagrinėjant proantocianidinų veikimo mechanizmą, svarbu suprasti periodontito patogenezę. Periodonto audiniai yra unikali sritis dėl mikroorganizmų nuolatinio kontakto su organizmo imunine sistema. TLR receptorių, esančių dantenų vagelės epitelio ląstelėse, aktyvinimas stimuliuoja gynybines organizmo signalų perdavimo kaskadas [99], todėl išsiskiria įvairūs imunomodulatoriai bei prouždegiminiai citokinai [100].

Periodontito atveju vyksta „iškreiptas“ uždegiminis destruktivinis imuninės sistemos atsakas, stipriai didėja prouždegiminių citokinų sekrecija į dantenų vagelę, prasideda periodonto raiščio, alveolinio kaulo destruktivija. Šioje situacijoje į pagalbą gali būti pasitelkiami proantocianidinai (1.3.3.1 pav.) [19].



1.3.3.1 pav. Proantocianidinų mechanizmas periodontito patogenezėje

Sukurta naudojant BioRender.com

Yra žinomi keli PACN veikimo mechanizmai: viduląstelių signalų perdavimo kelių moduliacija, pvz., NF- κ B (branduolio faktoriaus kappa-B) kelias, MAPK (mitogenų aktyvuotos baltymų kinazės) kelias, PI3K/Akt/mTOR (fosfoinozitido 3-kinazės / baltymų kinazės B / žinduolių rapamicino taikinio) kelias ir NRF2/HO1 (branduolinio faktoriaus eritroidinio 2-susijusio faktoriaus 2 / hemo oksigenazės-1) signaliniai keliai [19, 29, 101–106].

Galimas PACN veikimo mechanizmas yra NF- κ B signalinio kelio slopinimas, sumažinant kappa B inhibitoriaus fosforilinimą ir skaidymą [97]. Padidėjęs kappa B inhibitoriaus kiekis jungiasi prie NF- κ B ir išlaiko jį citoplazmoje, sumažindamas jo pernašą į branduolį [107]. Šis slopinimas sumažina genų, skatinančių ląstelių apoptozę bei uždegimines reakcijas, transkripciją, sukurdamas palankesnę aplinką ląstelių proliferacijai [107, 108]. PACN gali moduluoti citokinų gamybą per NF- κ B s kelią [102; 109]. Sumažindami uždegiminių citokinų (TNF- α , IL-1 β) kiekį, PACN gali slopinti uždegiminius signalus, sukeliančius ląstelių stresą ir apoptozę, sukuriant palankesnę aplinką sveikam ląstelių augimui ir proliferacijai. PACN gali sumažinti reaktyviųjų deguonies junginių kiekį ir užkirsti kelią oksidaciniam stresui, slopindami NF- κ B aktyvaciją ir išsaugodami ląstelių funkcijas, kurios skatina proliferaciją [102, 110].

Kiti signaliniai keliai (PI3K/Akt/mTOR ir MAPK), veikiant PACN, sąveikauja su NF- κ B ir tokiu būdu sąlygoja NF- κ B aktyvumą bei ląstelių atsakus. MAPK reguliuoja prouždegiminių citokinų (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α), uždegiminių mediatorių (NO, COX-2, PGE2) išskyrimą, bei NF- κ B signalinę sistemą. Proantocianidinai tiesiogiai mažina MAPK aktyvumą, tokiu būdu kontroliuoja NF- κ B signalinį kelią [19;29;101;111]. Kitas galimas PACN veikimo mechanizmas yra TGF- β /Smad signalinio kelio aktyvavimas [112]. Fibroblastuose, kai TGF- β prisijungia prie savo receptorių kompleksų – TGF- β R1 (TGF- β I tipo receptoriaus) ir TGF- β R2 (TGF- β II tipo receptoriaus), TGF- β R2 fosforilina ir aktyvuoja TGF- β R1, inicijuodamas signalinę kaskadą: Smad2/3 fosforilinimas ir, sudaro kompleksus su Smad4 branduolyje [112–114]. Šie kompleksai yra transkripcijos veiksniai, reguliuojantys I tipo kolageno sintezę. Patekęs į branduolį, Smad4 inicijuoja kolageno sintezę per transkripcijos valdymą [112, 115]. PACN gali stimuliuoti TGF- β 1 kiekio padidėjimą [116], kuris vėliau gali aktyvinti fibroblastų proliferaciją [117–121]. Todėl šiame tyrime taip pat buvo analizuojami TGF- β 1 kiekiai PACN paveiktose HGF-1 ir HPDLF ląstelėse. Įdomu tai, kad TGF- β stimuliuoja fibroblastus, tuomet aktyvėja bioaktyvių faktorių (kolageno, fibronektino, MMP, audinių MMP inhibitorių (TIMP) ir plazminogeno aktyvatoriaus inhibitorių 1 (PAI-1)), kurie prisideda prie žaizdos pertvarkymo ir gijimo, gamyba [122]. Apibendrinant galima teigti, kad PACN gali apsaugoti ląsteles, reguliuoti ląstelių proliferaciją, stimuliuoti ląsteles kolageno sintezės metu.

1.3.4. Proantocianidinų biologinis aktyvumas

Proantocianidinai pasižymi plačiu biologinio aktyvumo spektru: pasižymi apsauginėmis funkcijomis [123], priešuždegiminiu poveikiu [124], priešvėžiniu poveikiu [125, 126], reguliuoja gliukozės kiekį kraujyje [127], apsaugo nuo širdies-kraujagyslių ligų [128], pasižymi antihipertenziniu poveikiu [129], hipolipideminiu poveikiu [130, 131], dėl to yra perspektyvūs jų taikymui medicinoje.

Odontologijoje proantocianidinai nėra dažnai naudojama medžiaga, tačiau dėl plataus veikimo profilio gali būti lengvai pritaikoma odontologijos procedūrų spektre [132–135], ypač gydant periodonto ligas.

Antioksidacinis poveikis. Oksidacinis stresas yra pagrindinė ląstelių pažaidos priežastis. Antioksidantai neutralizuoja nestabilius laisvuosius radikalus, perduodami jiems elektronus ar vandenilio atomus. Net ir normaliomis fiziologinėmis sąlygomis, antioksidantai efektyviai kontroliuoja ląstelių pažaidas ir slopina oksidacinio streso sukeltus pokyčius. Proantocianidinai geba neutralizuoti laisvuosius radikalus [23, 136]. Be to, proantocianidinai

geba didinti natūraliai organizme esančių antioksidacinių fermentų (superoksido dismutazės, katalazės, glutationo peroksidazės) išskyrimą ir taip sustiprinti ląstelinio antioksidacinio gynybinio mechanizmo poveikį [24]. Tokiu būdu proantocianidinai geba apsaugoti nuo oksidacinio poveikio.

Antibakterinis poveikis. Proantocianidinai inhibuoja bakterijų, sukeliančių periodonto patologiją (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Eikenella corrodens*) aktyvumą [21, 27, 28, 137–139]. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bakterijos išskiria leukotoksinus, kurie turi citotoksinį poveikį, sukelia piroptozę makrofaguose. Tačiau proantocianidinai pasižymi citoprotekcinio poveikiu: mažina leukotoksinų genų ekspresiją *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bakterijose, stabdo leukotoksinų prisitvirtinimą prie makrofagų, ir neutralizuoja uždegiminį atsaką makrofagų sąveikoje su leukotoksinais [140]. Proantocianidinai turi unikalią savybę bakterijas veikti selektyviai: neigiamai veikia periodontitą sukeliančias patologines bakterijas *Porphyromonas gingivalis*, tačiau išsaugo burnos ertmės komensalių bakterijų, tokių kaip *Streptococcus salivarius*, metabolinį aktyvumą [141]. Taip pat papildomas proantocianidinų antibakterinis poveikis pasireiškia dėl medžiagos gebėjimo stabdyti bakterijų adheziją ir biofilmo susiformavimą [139, 142–144].

Priešuždegiminis poveikis. Imuninės sistemos dėka uždegiminis procesas apsaugo organizmą nuo mikroorganizmų infiltracijos į gilesnius audinius. Prie organizmo gynybinių mechanizmų prisideda ir proantocianidinai, kurie mažindami prouždegiminių citokinų (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) gamybą ir išskyrimą, stabdo uždegiminių procesų vystymąsi [19, 20, 101, 111, 124, 137, 145, 146]. Kadangi oksidacinis stresas yra susijęs su uždegiminių procesų vystymusi [147], todėl proantocianidinų antioksidacinės savybės sustiprina ir priešuždegiminį efektą.

Regeneracinis poveikis. Proantocianidinų turinčios medžiagos mažina kaulo rezorbciją [25], skatina kaulinio audinio regeneraciją [29, 30], stabdo bakterijų sukeltą I tipo kolageno destruktiją [27, 28]. Kadangi periodonto raiščio kamieninės ląstelės turi gebėjimą diferencijuotis į osteoblastus, o proantocianidinai skatina periodonto raiščio kamieninių ląstelių osteogenezę, proantocianidinai gali būti naudojami alveolinio kaulo regeneracijai [148, 149]. Kaulo regeneracijoje naudojamų 3D spausdintų karkasų sudėtyje esant proantocianidinams, suteikiamos puikios biologinių molekulių pernešėjo savybės (angl. *cross-linker*) [150–151].

Remineralizacinis poveikis. Proantocianidinai geba atlikti danties remineralizaciją dėl hidroksiapatito kristalų formavimo efekto. Proantocianidinų molekulės turi hidroksilfenil- grupes, kurios geba surišti kalcio ir fosfatų jonus, randamus seilėse, ir formuoti kompleksus, kurie yra hidroksiapatito

kristalų prekursoriai [152–155]. Remineralizacinis proantocianidinų poveikis ypač aktualus danties šaknies paviršiams, apsinuoginusiems po atlikto periodontologinio gydymo, sumažinant kariozinių defektų formavimąsi bei mažinant dantų pooperacinį jautrumą.

1.3.5. Proantocianidinų panaudojimas periodontito gydymui: ikiklinikinės studijos *in vitro*

Laboratorinių tyrimų duomenys rodo, kad proantocianidinai, sąveikaudami su periodonto patogenine mikroflora, daro poveikį, kuris gali būti naudingas periodonto ligų gydymui. Proantocianidinai, sąveikaudami su periodonto patogeniniais mikroorganizmais (*A. actinomycescomitans*), mažina leukotoksino (baltyminio toksino, kuris padeda bakterijoms išvengti organizmo imuninės reakcijos, esant infekcijai) genų ekspresiją, slopina periodonto patogeninių mikroorganizmų augimą, saugo burnos keratinocitus nuo neigiamo poveikio, mažina biofilmo formavimąsi [139, 140]. Proantocianidinų struktūriniai junginiai (epigalokatechingalatas) sąveikoje su periodonto patogeninėmis bakterijomis (*P. gingivalis*) mažina bakterijų proteinazių aktyvumą, slopina pirmo tipo kolageno irimą, didina burnos keratinocitų apsauginę funkciją prieš bakterijų invaziją [28, 156]. Įdomu, kad proantocianidinai išreiškia specifinį antibakterinį poveikį: stipriau citotoksiškai veikia periodonto patogenines bakterijas (*P. gingivalis*), saugant komensalines bakterijas (*S. salivarius*) [141]. Proantocianidinai ar jų struktūriniai elementai (epigalokatechingalatas) mažina bakterijų (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*) adheziją [27, 143, 157] bei biofilmo formavimąsi ant burnos epitelio ląstelių [27, 158–161]. Proantocianidinai gali būti naudojami kaip alternatyva chlorheksidinui periodonto ligų atvejais dėl stebimo lygiaverčio antibakterinio efekto prieš burnos ertmės mikroorganizmus [162].

Laboratoriniai tyrimai su žmogaus burnos ertmės ląstelių kultūromis rodo teigiamą proantocianidinų poveikį periodonto struktūroms, esant patogeninei mikroflorai. Žmogaus dantenų fibroblastus, burnos epitelio ląsteles veikiant proantocianidinų turinčiomis medžiagomis sumažėja prieš uždegiminių citokinų ekspresija [20, 27, 163]. Pastebėta, kad proantocianidinai reguliuoja osteogenezę žmogaus periodonto raiščio fibroblastuose, aktyvuojant su osteogeneze susijusių genų ir baltymų ekspresiją [29]. Proantocianidinai, veikdami žmogaus monocitus, diferencijuotus į makrofagų tipo ląsteles, mažina leukotoksino A citotoksinį poveikį, mažina prouždegiminių citokinų (IL-18, IL-1β, IL-6, TNF-α, MMP-3, MMP-9) kiekį, taip pat mažina ROS, superoksido produkciją, mažina toksinų adheziją (sumažina leukotoksino A prisijungimą prie makrofagų 50 proc.) [28, 139–140]. Proantocianidinai ar jų sudėtinės dalys, veikdami žmogaus dantenų fibroblastus, pasižymi

citoprotekcinio poveikiu, didina ląstelių proliferaciją, migraciją, didina kolageno sintezę, kas pažymi stiprias regeneracines šių junginių savybes [164–165].

1.3.6. Proantocianidinų panaudojimas periodonto gydymui: ikiklinikinės studijos *in vivo*

Ikiklinikinės studijos su gyvūnais rodo proantocianidinų teigiamą poveikį periodonto audiniams. Eksperimentinio periodonto tyrimas su pelėmis parodė, kad proantocianidinų panaudojimas sumažino uždegiminių ląstelių kiekį, buvo susijęs su sumažėjusiu osteoklastų tankiu, padidėjusiu klinikiniu dantenų prisitvirtinimo lygiu (CAL), kas pagrindžia proantocianidinų prieš-uždegiminį poveikį periodonto audiniuose [16]. Morfometrinio ir histopatologinio tyrimo metu proantocianidinai sumažino periodonto uždegimą, alveolinio kaulo rezorbciją bei tuo pačiu padidino osteoblastų aktyvumą [17]. Intraoraliai naudoti katechinai, epigalokatechin-3-galatas (proantocianidinų sudėtiniai elementai) sumažino kaulo rezorbciją [166–168]. Apibendrinant, eksperimentinės ikiklinikinės studijos su gyvūnais pagrindžia proantocianidinų savybes slopinant periodonto uždegimą bei mažinant alveolinio kaulo rezorbciją, kas ypač aktualu periodonto ligų gydyme.

1.3.7. Proantocianidinų nauda periodonto gydymui: klinikinės studijos

Klinikinės studijos rodo proantocianidinų ar jų struktūrinių cheminių junginių turinčių preparatų teigiamą naudą. Intraoraliai vartojami oligomeriniai proantocianidinai sumažino dantenų uždegimo rodiklius: sumažėjo dantenų kraujavimo indeksas, dantenų apnašų rodiklis, dantenų vagelės skystyje matuotas uždegimo rodiklis (IL-6) [169]. Vietiškai naudojamos juostelės ar gelis su katechinais (proantocianidinų sudedamosiomis dalimis), įvesti į periodontologinę kišenę, sumažino dantenų kraujavimo, periodontologinių kišenių gylio reikšmes [170–171]. Skalavimo skystis po profesionalios burnos higienos procedūros sąlygojo mažesnius dantenų kraujavimo po zondavimo rodiklius [172]. Proantocianidinų turintis gelis, vedamas po podanteninio instrumentavimo procedūros nulėmė klinikinių periodontologinių rodiklių (zondavimo gylio, kraujavimo indekso, apnašų indekso) sumažėjimą [173–175]. Taigi, klinikinės studijos rodo klinikinių rodiklių pagerėjimą, naudojant proantocianidinų ar jų sudėtinųjų komponentų turinčių preparatų.

1.3.8. Proantocianidinų saugumas

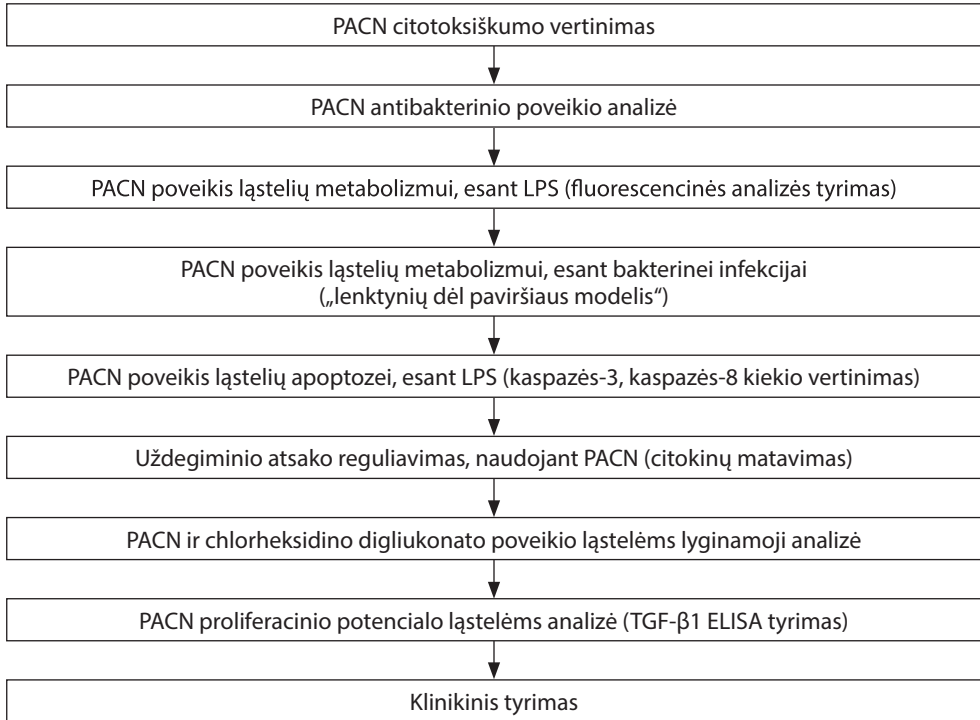
Proantocianidinų saugumas yra patikrintas eksperimentinėse studijose su gyvūnais [176]]. Jokio neigiamo poveikio odos, akių, burnos ertmės, vidaus organų (smegenų, žarnyno, širdies, inkstų, kepenų, plaučių, kasos, blužnies) veiklai nenustatyta [177]. Vis tik pacientams, turintiems nustatytą alergiją taninams, šių medžiagų naudoti nepatariama.

Apibendrinant literatūros apžvalgą, proantocianidinai (iš *Pelargonium sidoides* sausojo šaknų ekstrakto) turėtų mažinti periodonto audinių uždegimą, periodonto patogeninės mikrofloros aktyvumą, teigiamai veikti periodonto audinius, skatinant periodonto audinių regeneraciją. Tačiau vis tik trūksta ikiklinikinių tyrimų duomenų apie proantocianidinų (iš *Pelargonium sidoides* sausojo šaknų ekstrakto) poveikį bakterijoms, periodonto audiniams bei bakterijų, periodonto audinių ir proantocianidinų tarpusavio sąveiką. Taip pat trūksta klinikinių tyrimų duomenų, vertinant proantocianidinų poveikį periodontito gydymo metu.

2. METODAI

2.1. Tyrimai

Analizuojant PACN ir PSRE poveikį, atlikti ikiklinikiniai tyrimai bei kliniškas tyrimas (2.1.1 pav.).



2.1.1 pav. Atlikti ikiklinikiniai ir kliniškas tyrimas

2.1.1. Ikiklinikiniai tyrimai

Ikiklinikiniai tyrimai buvo atlikti naudojant *Pelargonium sidoides* šaknų sausąjį ekstraktą (PSRE) ir proantocianidinus, gautus iš PSRE ekstrakto (2.1.1.1 pav.).

Ikiklinikinių tyrimų metu buvo atliktas proantocianidinų citotoksiškumo vertinimas žmogaus dantenų fibroblastams bei analizuojamas proantocianidinų antibakterinis poveikis. Laboratoriniams tyrimams naudoti plataus spektro patogenai ir komensaliniai mikroorganizmai: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Escherichia coli* padermės.



2.1.1.1 pav. *Ikiklinikiniai tyrimai analizavo PACN ir PSRE poveikį*

Siekiant išsiaiškinti proantocianidinų poveikį dantenų fibroblastų metabolizmui bakterinės infekcijos metu, buvo atlikti fluorescentinės analizės ir „lenktynių dėl paviršiaus“ (angl. *race for the surface*) modelio tyrimai. Norint išanalizuoti proantocianidinų poveikį ląstelių apoptozės mechanizmui bakterinės infekcijos fone, atlikti kaspazių kiekio matavimai. Analizuojant uždegiminio atsako reguliavimo mechanizmą bakterinės infekcijos metu, naudojant proantocianidinus, buvo atliktas citokinų kiekio matavimas. Vertinant proantocianidinų nei chlorheksidino digliukonato poveikį dantenų fibroblastams, buvo atlikta lyginamoji analizė. Siekiant įvertinti proantocianidinų proliferacinį potencialą, buvo tiriamas proantocianidinų poveikis žmogaus dantenų ir periodonto raiščio fibroblastams.

2.1.1.1. Proantocianidinų išskyrimas

Pelargonium sidoides šaknų ekstraktas (PSRE) buvo įsigytas iš „Frutarom Switzerland Ltd.“, Rutiwisstrasse 7, CH-8820, Wädenswil (partijos Nr. 0410100). Proantocianidinų išgryninimas atliktas pagal Hellstrom aprašytą metodiką [178]. Sephadex LH-20 kolonėlė (GE Healthcare Biosciences Inc., Švedija) paruošta sumaišant 5 g filtravimo medžiagos (sefadekso) su 25 ml 50 proc. metanolio tirpalo. Mišinys perkeltas į Sephadex LH-20 kolonėlę ir paliktas 4 valandas, kol pilnai išbrinks. 0,4 g *Pelargonium sidoides* DC. šaknų sausojo ekstrakto ištirpinti 20 ml 50 proc. metanolio tirpalo. Tirpalas centrifuguotas 20 min. +20 (±2)°C temperatūroje, 2000 G jėga. Gautas supernatantas filtruotas 0,45 µm diametro filtru ir perkeltas į kolonėlę. Pašalinant fenolio

rūgštis, cukrus ir kitas priemaišas, kolonėlė 4 kartus plaunama 25 ml 50 proc. metanolio tirpalu, kol eliuatas tampa skaidrus. Kolonėlę plaunant po 50 ml 70 proc. acetonu surinkti proantocianidiniai. Gauta proantocianidinų frakcija liofilizuota aparatu LyoQuest Telstar (Telstar, Syntegon, Ispanija).

Atlikta proantocianidinų kiekinė analizė. Proantocianidinų, išskirtų iš sausojo *Pelargonium sidoides* DC. šaknų ekstrakto, kiekis nustatytas spektrofotometrinio metodu, naudojant para-dimetilaminocinnamaldehido (DMAC) reagentą, absorbciją matuojant spektrofotometru (Spectronic CamSpec M550, Jungtinė Karalystė). Pagamintas parūgštintas etanolio tirpalas: 12,5 ml koncentruotos (36 proc.) druskos rūgšties sumaišyta su 12,5 ml išgryninto vandens ir 75 ml etanolio (93 proc.). DMAC reagentas yra jautrus šviesai ir oksidacijos procesui, todėl kiekvieną kartą prieš tyrimą tirpalas ruoštas šviežiai, ištirpinant 0,05 g DMAC miltelių 50 ml parūgštinto etanolio. Lyginamasis tirpalas pagamintas 2 ml DMAC reagento sumaišant su 20 μ l išgryninto vandens.

Kalibracinės kreivės sudarymui naudotas standarto – epikatechino, tirpalas, gaminant skirtingų koncentracijų (0,0156 mg/ml – 0,125 mg/ml) tirpalus. 20 μ l paruošto skirtingų koncentracijų standarto tirpalo sumaišyta su 2 ml DMAC reagentu. Tirpalai inkubuoti +20 ($\pm$ 2) $^{\circ}$ C temperatūroje 15 min. Tirpalų absorbcija išmatuota esant 640 nm bangos ilgiui. Liofilizuotos PACN formos išeiga buvo 1,37 (0,07) g, t. y. iš *Pelargonium sidoides* DC. šaknų sausojo ekstrakto išskirta apie 34,25 proc. proantocianidinų.

2.1.1.2. Bakterijų padermės, auginimo metodika

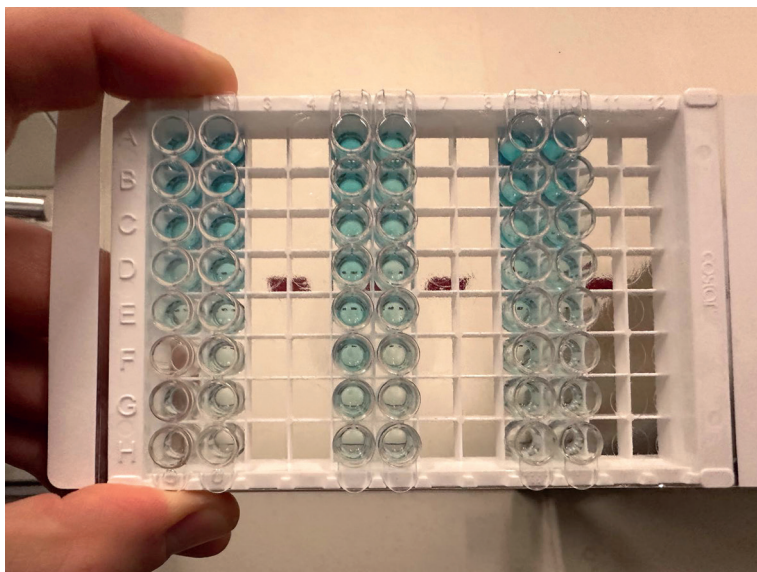
Eksperimentams naudotos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Escherichia coli* padermės. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 43300), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*, ATCC 33384) ir *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC BAA-1427) padermės buvo įsigytos iš Amerikos Tipo kultūros kolekcijos (ATCC, MA, JAV), kultyvuotos pagal tiekėjo nurodymus. Padermės kultyvuotos Luria-Bertani terpėje (LB, Sigma-Aldrich, Milan, Italija), 37 $^{\circ}$ C temperatūroje. Eksperimentams iš kiekvienos padermės paimta po vieną koloniją, auginama LB terpėje 18 val. Po inkubacijos paruošta nauja LB terpė santykiu 1:10, inkubuota 3 val., siekiant pasiekti logaritminę augimo fazę. Terpė su kultūromis skiesta, kol optinis tankis buvo OD₆₀₀ = 0,001, siekiant finalinės koncentracijos 1×10^5 ląstelių /ml.

2.1.1.3. Pelių dantenų fibroblastai

Visos eksperimentinės procedūros buvo atliktos pagal Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymą (Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas atlikti laboratorinius bandymus su gyvūnais Nr. G2-80). Pelės buvo laikomos ir prižiūrimos Lietuvos sveikatos mokslų universiteto gyvūnų laikymo patalpose, tyrimas atliktas pagal ARRIVE gaires, skirtas išklinikiniams tyrimams su gyvūnais [179]. Pirminiai dantenų fibroblastai buvo išskirti iš P5–7 žiurkių jauniklių dantenų. Po išskyrimo ląstelės buvo auginamos 75 cm² talpos kolbose DMEM terpėje su dideliu gliukozės kiekiu ir Glutamax (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, JAV), 10 proc. FBS ir Pen/Strep. Esant 70–90 proc. susiliejimui, ląstelės buvo atskirtos 0,025 proc. tripsino/EGTA ir išsėtos į 96 šulinėlių plokšteles, kurių tankis buvo 2×10^5 ląstelių/šulinėlyje.

2.1.1.4. Žmogaus dantenų fibroblastų linija, auginimo metodika

Žmogaus dantenų fibroblastų ląstelės (HGF-1) įsigytos iš ATCC (Virdžinija, JAV) buvo kultivuojamos remiantis tiekėjo rekomendacijomis. Ląstelės auginamos DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) auginimo terpėje su 10 proc. fetaliniu jaučio serumu (FBS), inkubatoriuje 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO₂ oro atmosferoje. Eksperimentiniams tyrimams ląstelės buvo sėjamos į 96 šulinėlių plokšteles po 5000 ląstelių į šulinėlį (2.1.1.4.1 pav.).

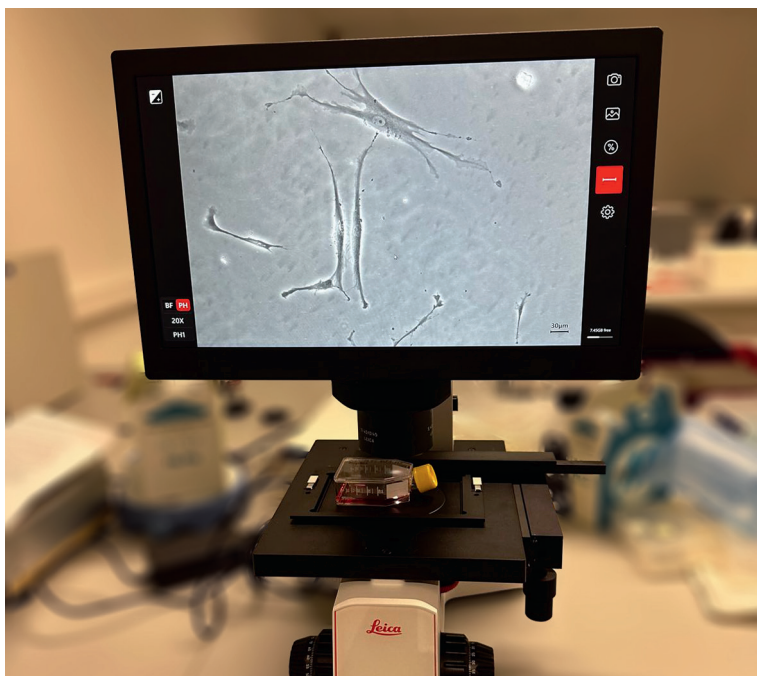


2.1.1.4.1 pav. Eksperimentinis tyrimas

Eksperimentiniams tyrimams ląstelės buvo sėjamos į 96 šulinėlių plokšteles.

2.1.1.5. Žmogaus periodonto raiščio fibroblastų linija, auginimo metodika

Žmogaus periodonto raiščio fibroblastų ląstelės (HPDLF) įsigytos iš ATCC (Virdžinija, JAV) buvo kultivuojamos remiantis tiekėjo rekomendacijomis (2.1.1.5.1 pav.). Ląstelės auginamos DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) auginimo terpėje su 10 proc. fetaliniu jaučio serumu (FBS), inkubatoriuje 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO₂ oro atmosferoje. Eksperimentiniuose tyrimuose ląstelės buvo sėjamos į 96 šulinėlių plokštes (po 5000 ląstelių į šulinėlį).



2.1.1.5.1 pav. Fibroblastų mikroskopinis vaizdas

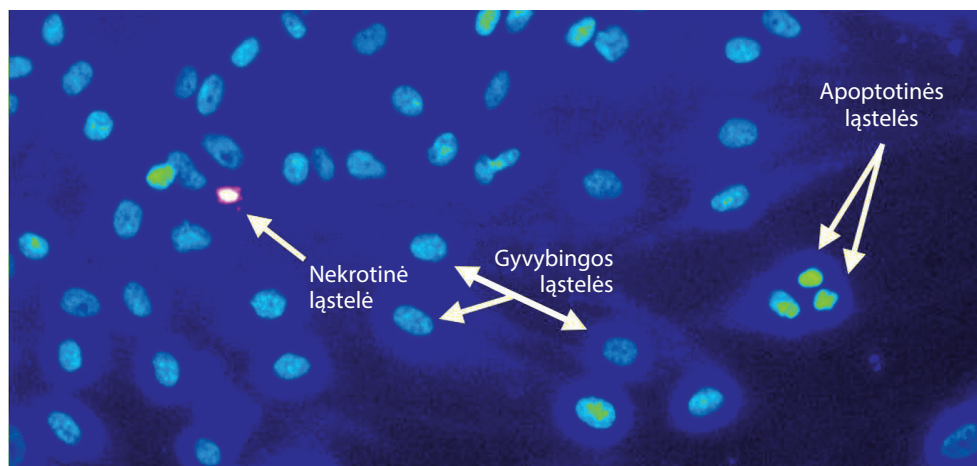
2.1.1.6. Žmogaus periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės

Žmogaus periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės (toliau PBMC) buvo įsigytos iš ATCC (ATCC® PCS-800-011, Manasas, Virdžinija, JAV). Ląstelės buvo kultivuojamos $3,3 \times 10^6$ ląstelių/ml tankiu (12 šulinėlių plokštelėje) RPMI terpėje, papildytoje 10 proc. FBS ir 1 proc. antibiotikų.

2.1.1.7. Proantocianidinų citotoksiškumo vertinimas

Buvo nustatyta PSRE pusinė maksimali slopinamoji koncentracija (IC₅₀). IC₅₀ yra koncentracija, kuriai esant žūsta 50 proc. ląstelių. PSRE (ištirpintas 30 proc. polietilenglikolio tirpale) buvo praskiestas žmogaus dantenų fibroblastų ląstelių kultūros terpėje iki 25, 50, 100, 200, 240, 280, 320, 400 ir 800 µg/ml koncentracijų ir filtruojamas per 0,22 µm švirkšto filtrą. Ląstelės buvo inkubuojamos su skirtingomis ekstrakto koncentracijomis 24 valandas, o tada ląstelių gyvybingumas buvo įvertintas fluorescencinės mikroskopijos metodu.

Ląstelių branduoliai buvo dažomi fluorescenciniais dažais bisbenzimidido H33342 trichloridu (Hoechst 33342) ir propidžio jodidu (PJ). Ląstelės membrana yra pralaidi Hoechst 33342, todėl ji gali nudažyti gyvybingų ir apoptotinių ląstelių branduolius, kurie vėliau švyti mėlynai. Gyvybingų ląstelių branduolių dažymas yra homogeniškas ir turi lygius kraštus, o apoptotinių ląstelių dažyti branduoliai yra sutankinti ir (arba) fragmentuoti ir švyti intensyviai mėlynai. Ląstelės membrana nėra pralaidi polimorfiniam tirpalui (PJ), todėl tik nekrotinių ląstelių branduoliai nusidažyti juo ir švyti raudonai (2.1.1.7.1 pav.).



2.1.1.7.1 pav. Ląstelių gyvybingumas buvo įvertintas fluorescencinės mikroskopijos metodu

Ląstelių kultūros buvo inkubuojamos su 20 µg/ml Hoechst 33342 ir 10 µg/ml PJ 15 min. Mėginiai buvo fiksuoti 4 proc. paraformaldehidu 10 min. kambario temperatūroje, kad būtų išsaugotos ląstelių struktūros mikroskopijai. Penkių atsitiktinių laukų vaizdai buvo užfiksuoti naudojant „Olympus IX71S1F-3“ fluorescencinę mikroskopą („Olympus Corporation“, Tokijas, Japonija) 200 kartų didinant. Gyvybingos, apoptotinės ir nekrotinės ląstelės

buvo suskaičiuotos naudojant „Image J 1.53k“ programinę įrangą ir užfiksuotas penkių laukų vidurkis. Ląstelių gyvybingumas buvo išreikštas gyvybingų, apoptotinių ir nekrotinių ląstelių procentine dalimi nuo bendro ląstelių skaičiaus.

2.1.1.8. Proantocianidinų antibakterinio poveikio analizė

Siekiant įvertinti antibakterinį proantocianidinų aktyvumą, nuspręsta sumaišyti PSRE arba PACN kartu su bakterijomis. Buvo naudojama skirtingos koncentracijos PSRE arba PACN frakcija: 10, 30, 50, 70, 80, 90 ir 100 µg/ml. PSRE arba PACN buvo sumaišyti ir ištirpinti LB (Luria-Bertani) mitybinė terpėje su analizuojamomis bakterijomis (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *A. actinomycescomitans* ir *E. coli*): 1 ml tiriamo skysčio (LB terpė su bakterijomis ir PSRE arba PACN frakcija) užsėta ant 24 šulinėlių plokštelės ir inkubuota 24 val. 37 °C. Kontrolei buvo pasirinkta LB terpė su bakterijomis. Po inkubacijos bakterijų gyvybingumas buvo vertinamas kolorimetrinio metabolinio tyrimo metodu, panaudojant Alamar mėlyną dažą (AlamarBlue®, Thermo-Fisher, Waltham, MA, JAV) pagal gamintojo nurodymus. Spektrofotometru (Spark, Tecan, Bazelis, Šveicarija) analizuoti gauti duomenys.

2.1.1.9. Proantocianidinų poveikis pelių dantų fibroblastų metabolizmui, esant bakterinei infekcijai: fluorescencinės analizės tyrimas

Proantocianidinų poveikis pelių dantų fibroblastams, esant infekcijai, buvo analizuojamas atliekant laboratorinį tyrimą, kai ant dantų fibroblastų buvo aplikuojamas 2 mg/ml *E. coli* bakterijų lipopolisacharidas (LPS) (Sigma-Aldrich) ir 50–100 µg/ml PSRE arba PACN. Pasirinktos minėtos koncentracijos, nes mažesnė nei 1 mg/ml LPS koncentracija nesukėlė reikšmingo ląstelių žūties padidėjimo, o didesnė nei 200 µg/ml PSRE arba PACN koncentracija turėjo citotoksinį poveikį.

Po tyrimo nekrotinių ląstelių žūties lygis buvo vertinamas fluorescencinės mikroskopijos metodu. Ląstelių gyvybingumas buvo įvertintas dvigubu branduolių fluorescencinio dažymo metodu, naudojant bisbenzimidą H33342 trichloridą (10 mg/ml) ir propidžio jodidą (PJ, 5 mg/ml), 5 min. 37 °C temperatūroje. Ląstelių membrana yra pralaidi Hoechst 33342 dažui, todėl nudažomi gyvybingų ir apoptotinių ląstelių branduoliai (švyti mėlynai). Gyvybingų ląstelių branduoliai nusidažo homogeniškai, turi lygius kraštus, apoptotinių ląstelių branduoliai yra kondensuoti ir/ar fragmentuoti, švyti intensyvia mėlyna spalva. Ląstelių membrana nėra pralaidi PJ, todėl juo nusidažo tik nekrotinių ląstelių branduoliai, švyti raudona spalva. Ląstelės buvo vizualizuotos fluorescenciniu mikroskopu OLYMPUS IX71S1F-3

(Olympus Corporation, Tokijas, Japonija), suskaičiuotos fluorescencinėse mikrografijose ir išreikštos kaip bendro ląstelių skaičiaus procentinė dalis viename vaizde. Duomenys pateikiami kaip vidurkiaiai su standartiniu nuokrypiu. LD50 buvo apskaičiuotas naudojant „SigmaPlot v.13“ („Systat Software Inc“, Londonas, Jungtinė Karalystė).

2.1.1.10. Proantocianidinų poveikis žmogaus dantenu fibroblastų metabolizmui, esant bakterinei infekcijai: „lenktynių dėl paviršiaus“ modelis

Siekiant įvertinti proantocianidinų gebėjimą išsaugoti ląstelių metabolizmą, esant infekcijai, buvo pritaikytas „lenktynių dėl paviršiaus“ modelis (angl. *race for the surface*). Modeliui buvo parinktos *S. aureus*, *A. actinomyces* padermės bei žmogaus dantenu fibroblastai (HGF, ATCC PCS-201-018), siekiant simuliuoti burnos gleivinės aplinką. Ląstelės ($1,5 \times 10^4$ ląstelių šulinėlyje) buvo pasėtos į 24 šulinėlių plokštelę, palikta per naktį. Terpė buvo pakeista į 1 ml be antibiotikų esantį skystį α -MEM (minimal essential medium Eagle alpha-modification), papildant 10 proc. FBS serumu (fetal bovine serum, Sigma), 100 $\mu\text{g/ml}$ proantocianidinų, 1×10^5 bakterijų. Plokštelė buvo inkubuota 24 val. 37 °C temperatūroje, leidžiant ląstelėms ir bakterijoms kontaktuoti. Po to ląstelės ir bakterijos buvo atkabintos nuo plokštelės šulinėlių, naudojant kolagenazės (1 mg/ml) tripsino-EDTA (0,25 proc.) skystį. Surinktos ir skaičiuojamas gyvų ląstelių kiekis, naudojant tripano mėlio tirpalą bei Burkerio ląstelių skaičiavimo metodą. Kontrolei buvo pasirinkta terpė su kultivuotomis ląstelėmis be bakterijų.

2.1.1.11. Proantocianidinų poveikis ląstelių apoptozės mechanizmo kaskadoje, esant bakterinei infekcijai: kaspazės-3 ir kaspazės-8 kiekio vertinimas

Ląsteles veikiant bakterijų lipopolisacharidu, gali įvykti ląstelių nekrozė arba apoptozė, kuri taip pat destruktvyviai veikia dantenu audinius. Kaspazės (cisteino asparto proteazės) yra pagrindiniai fermentai apoptozės procese [180]. Pagrindinės kaspazių grupės pagal vietą apoptozės procese yra skiriamos iniciatoriaus kaspazės (apoptozės sukėlėjai) ir efektoriaus kaspazės (sukėlėjams sustiprinus vykdo proteolizę, dėl ko apoptozės ląstelėse stebimi būdingi biocheminiai ir morfologiniai pokyčiai). Kaspazės aktyvumo vertinimas rodo, ar medžiagos (PSRE, PACN) geba slopinti bakterijų lipopolisacharido sukeltą apoptozės proteazės aktyvumą.

Kaspazės-3 aktyvumas ląstelių lizatuose po apdorojimo buvo matuojamas naudojant „Caspase 3 Assay Kit“ („Sigma-Aldrich“) pagal gamintojo

protokolą, ir vertinant Ac-DEVD-7-amido-4-metilkumarino skilimą ir vėlesnį 7-amido-4-metilkumarino (AMC) fluorescencijos padidėjimą fluorometriiniu plokštelių skaitytuvu „Ascent Fluoroskan“ („Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV; $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Duomenys pateikiami kaip AMC koncentracijos vidurkiai $\pm$ standartinis nuokrypis, normalizuoti pagal ląstelinio baltymo koncentraciją mg, vidurkiai $\pm$ standartinis nuokrypis. Kaspazės-8 kiekis ląstelių lizatuose po apdorojimo buvo matuojamas kolorimetriiniu Kaspazės-8 tyrimo rinkiniu („Sigma-Aldrich“) pagal gamintojo protokolą, vertinant Ac-IETD-p-nitroanilino skilimą ir p-nitroanilino (pNR) koncentracijos padidėjimą spektrofotometriiniu plokštelių skaitytuvu „Multiskan Go 1510“ („Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV), vertinant šviesos absorbciją esant $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$. Duomenys pateikiami kaip vidurkiai $\pm$ standartinis nuokrypis (pNR koncentracijos didėjimo greičio), normalizuotas ląstelių baltymo mg, vidurkiai $\pm$ standartinis nuokrypis.

2.1.1.12. Uždegiminio atsako reguliavimas, naudojant proantocianidinus, esant bakterinei infekcijai: citokinų matavimo tyrimas

Proantocianidinų poveikis uždegiminio atsako į bakterijų LPS metu buvo analizuojamas atliekant citokinų kiekio matavimus: interleukino-6 (IL-6), interleukino-8 (IL-8) ir prostaglandino E2 (PGE2), naudojant IL-6 žmonių (Sabbitech), IL-8 pelių (Abbexa) ir PGE2 pelių (Abbexa) ELISA rinkinius, laikantis gamintojo protokolų. Tyrimai buvo atlikti naudojant pelių dantenų fibroblastus ir žmogaus periferinio kraujo mononuklearines ląsteles.

2.1.1.13. Proantocianidinų ir chlorheksidino digliukonato poveikio dantenų fibroblastams lyginamoji analizė

Kaip minėta anksčiau, dažniausiai klinikinėje praktikoje skiriamo chlorheksidino digliukonato tirpalo naudojimas gydymo metu turi būti svarstytinas dėl galimo neigiamo poveikio burnos ertmės ląstelėms [7]. Šiame tyrime nartata palyginti PACN ir chlorheksidino digliukonato 0,12 proc. tirpalo poveikį HGF-1 ląstelių linijai. PACN koncentracija buvo pasirinkta 25, 50, 100, 200 ir 240 $\mu\text{g/ml}$. 0,12 proc. chlorheksidino tirpalas buvo paruoštas naudojant augimo terpę (Dulbecco modifikuota Eagle terpė, papildyta 10 proc. vaisiaus galvijų serumu ir 1 proc. penicilino-streptomicino tirpalu) ir filtruojamas taip pat, kaip ir PSRE tirpalas. Rezultatai buvo palyginti su neigiamomis kontrolinėmis grupėmis: augimo terpė ir 30 proc. polietilenglikolio tirpalas (naudojamas PSRE milteliams tirpinti) atskirai. Neigiamos kontrolinės grupės buvo pasirinktos norint atmesti išorinių veiksnių įtaką. Medžiagos buvo inkubuojamos su HGF-1 ląstelėmis 24 valandas. Ląstelių

stebėjimas buvo įvertintas spektrofotometriškai („Spark“, Tecan, Bazelis, Šveicarija) naudojant PrestoBlue® (Invitrogen, JAV) reagentą. PrestoBlue® buvo 10 kartų praskiestas augimo terpe, 100 µl praskiesto tirpalo buvo įpilta į šulinėlius su ląstelėmis ir inkubuota 37 °C temperatūroje 2 valandas.

PrestoBlue® metodas yra pagrįstas ląstelių metaboliniu aktyvumu. PrestoBlue® esantis rezazurinas ląstelėse paverčiamas rezorufinu, kurio kiekis matuojamas spektrofotometriškai esant 570 nm bangos ilgiui, naudojant 600 nm bangos ilgį, naudojama fono korekcijai. Resorufino absorbcijos kiekis yra tiesiogiai proporcingas ląstelių metaboliniam aktyvumui, šiuo atveju – ląstelių proliferacijai. Spektrofotometrijos rezultatai buvo užfiksuoti santykiniais vienetais PACN grupėse (25, 50, 100, 200 ir 240 µg/ml), 0,12 proc. chlorheksidino digliukonato tirpalo (CHX) grupėje, 30 proc. polietilenglikolio tirpalo grupėje (PG 30 proc.) ir augimo terpės grupėje.

2.1.1.14. Proantocianidinų proliferacinio poveikio žmogaus dantenų ir periodonto raiščio fibroblastams vertinimas: TGF-β1 ELISA tyrimas

Šio tyrimo metu analizavome PACN proliferacinį potencialą HGF-1 ir HPDLF ląstelėse, atliekant TGF-β1 (transformuojančio augimo faktoriaus beta 1) kiekybinę analizę. TGF-β1 yra augimo faktorius, kuris dalyvauja periodonto raiščių ląstelių regeneracijoje [181]. Šio veiksnio koncentracija didėja žaizdų gijimo vietose (ypač burnos ertmėje), kur reikia skatinti kelių tipų ląstelių (fibroblastų, osteoblastų) proliferaciją [182]. TGF-β1 vaidina svarbų vaidmenį reguliuojant fibroblastų proliferaciją, diferenciaciją, skatinant kolageno sintezę, o tai yra labai svarbu periodonto sveikatos palaikymui. Šiame tyrime PACN proliferacinis potencialas HGF-1 ir HPDLF ląstelėse buvo matuojamas atliekant TGF-β1 ELISA imunologinį tyrimą.

HGF-1 ir HPDLF ląstelės buvo apdorotos PSRE 25 ir 50 µg/ml, palygintos su kontroline grupe. HGF-1 ir HPDLF proliferacijos potencialas buvo matuojamas naudojant TGF-β1 ELISA imunologinį tyrimą, kuris buvo atliktas pagal gamintojų rekomendacijas. Šis tyrimas, naudojant specifinius antikūnus, leidžia kiekybiškai įvertinti TGF-β1 augimo faktoriaus koncentraciją biologiniuose mėginiuose.

2.1.2. Klinikinis tyrimas

Atliktas klinikinis tyrimas yra atsitiktinės imties kontroliuojamas kliniškinis tyrimas, skirtas įvertinti lokaliai išskiriamų PACN veiksmingumą gydant generalizuotą periodontitą.

2.1.2.1. Proantocianidinų plėvelės

Proantocianidinų išskyrimo procesas aprašytas skyriuje „2.1.1.1 Proantocianidinų išskyrimas“. Plėvelių gamybai buvo panaudotas kiaulės I tipo kolageno hidrogelis, sustiprintas kryžminio sujungimo metodu, kuris buvo prisotintas liofilizuotų proantocianidinų frakcija (2.1.2.1.1 pav.).



2.1.2.1.1 pav. Proantocianidinų plėvelės, sukurtos klinikiniam tyrimui

2.1.2.2. Tyrimo dizainas

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Dantų ir burnos ligų klinikoje 2019 m. sausio–gegužės mėn. buvo atliktas randomizuotas klinikinis tyrimas, įtraukiant sistemiskai sveikus pacientus su diagnozuotu III–IV stadijos periodontitu. Pacientai atsitiktine tvarka priskirti kontrolinei ar eksperimentinei grupei. Konstruotas dvigubai aklas (maskuotas) tyrimo modelis – nei pacientai, nei egzaminatoriai nebuvo informuoti apie pacientų priskyrimą grupei.

2.1.2.3. Bioetikos leidimas

Gautas bioetikos leidimas Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komitete (Nr. BE-2-38). Visi pacientai turėjo pasirašyti informuoto sutikimo formą, kad sutinka dalyvauti tyrime, geba atvykti sutartiems vizitams, sutinka užkoduotų duomenų surinkimui.

2.1.2.4. Tyrimo dalyviai, įtraukimo bei atmetimo kriterijai

Tyrimo dalyviai lankėsi Lietuvos sveikatos mokslų universitete Dantų ir burnos ligų klinikoje.

Įtraukimo kriterijai:

- Pacientai su III–IV laipsnio periodontitu, lėtai progresuojančiu (A/B tipas) (rentgenologiškai nustatomas kaulo netekimas siekia vidurinę arba viršūninę šaknies trečdalį, stebimas dantų netekimas dėl periodontito, maksimalus zondavimo gylis ≥ 6 mm, horizontalus ir vertikalus kaulo netekimas ≥ 3 mm);
- Sistemiškai sveiki pacientai;
- Likę ≥ 20 dantų;
- Pacientai ≥ 30 metų.

Atmetimo kriterijai:

- Pacientai su nustatytu I–II stadijos periodontitu (rentgenologiškai kaulo netekimas stebimas vainikiniame trečdalyje, nėra dantų netekimo dėl periodontito, maksimalus zondavimo gylis ≤ 5 mm, daugiausiai horizontali kaulo rezorbcija);
- Serga sisteminėmis ligomis;
- Taikyta antibiotikoterapija per paskutinius 3 mėnesius;
- Atliktas periodontologinis tyrimas per paskutinius 6 mėnesius;
- Nėščios, maitinančios moterys;
- Patvirtinta alerginė reakcija veikliajai medžiagai (proantocianidinams).

Atrinkti pacientai buvo paskirstyti į dvi grupes: pirmoje grupėje atliktas podanteninis instrumentavimas, antroje grupėje – podanteninis instrumentavimas su proantocianidinių hidrogelio plokštelių įvedimu.

2.1.2.5. Imties dydžio matavimas

46 pacientų imties dydis po 23 kiekvienoje grupėje (kontrolinėje ir testinėje), buvo pakankamas, kad būtų galima nustatyti kliniškai reikšmingą vidutinio PPD pokyčio skirtumą vidutinio gylio kišenėse (lyginant pradinį ištyrimą su ištyrimu po 8 savaitių) tarp kontrolinės ir bandomosios grupių, naudojant dvipusį t testą vidutinio skirtumo nustatymui su 78,9 proc. galia ir 5 proc. lygiu ($\alpha = 0,05$).

2.1.2.6. Atsitiktinė atranka, paskirstymas

46 pacientai buvo atsitiktinai suskirstyti į 2 grupes. Egzaminatorius atliko gydymo grupių dalyvių kodavimą ir atsitiktinę atranką naudodamas kompiuteriu sugeneruotą atsitiktinės atrankos lentelę. Iš pradžių pacientams buvo suteiktas unikalus numeris nuo 1 iki 46. Po kodavimo procedūros buvo

atlikta paprasta atsitiktinė atranka be apribojimų ir sugeneruoti 2 atsitiktinių skaičių rinkiniai (po 23 kiekvienam). Priskyrimo slėpimas buvo atliktas susiejant pirmąjį numerių rinkinį su kontroline grupe, o antrąjį rinkinį su testine grupe.

2.1.2.7. Tyrimo profilis

Klinikinio tyrimo metu buvo panaudotas dvigubas maskavimas. Tyrimo eigoje dalyvavo du egzaminatoriai: egzaminatorius-gydytojas ir egzaminatorius-ekspertas. Podanteninio instrumentavimo procedūros metu egzaminatorius-gydytojas nebuvo informuotas apie pacientų priskyrimą grupėms (kontrolė ar testinė). Po atliktos procedūros pacientų priskyrimą grupėms egzaminatoriui-gydytojui atskleidė egzaminatorius-ekspertas, ir atitinkamai pacientai gavo numatytą gydymą. Nuo klinikinio tyrimo pradžios pacientams nebuvo pranešta, kuriai grupei jie buvo priskirti. Periodontito gydymas buvo atliktas taikant vietinę nejautrą steriliame lauke (buvo naudojami odontologinės chirurgijos veido apklotai), kad pacientai negalėtų stebėti procedūros eigos. Taigi, pacientai negalėjo matyti ar jausti, kokio tipo gydymą jie gavo.

2.1.2.8. Taikyta intervencija, periodontologinis gydymas

Pacientams atliktas gydymas priklausomai nuo to, į kokią grupę jie pateko. Pirmoje grupėje pacientams atliktas podanteninis instrumentavimas (kontrolė), antroje grupėje – podanteninis instrumentavimas ir proantocianidinių hidrogelių plėvelių įvedimas (testinė grupė). Kolageno I tipo plėvelės buvo pagamintos tyrimo tikslais (2.1.2.8.1 pav.).



2.1.2.8.1 pav. Proantocianidinių plėvelė. Klinikinis vaizdas

Prieš atliekamą tyrimą pacientams buvo atliktas intraoralinis ištyrimas (skubi odontologinė pagalba, blogos prognozės dantų šalinimas). Standartizavimas buvo pasiektas atliekant profesionalią burnos higieną, pravedant individualios burnos higienos instruktažą, instrukuota nenaudoti papildomų skaliklių burnos higienai gerinti.

Klinikinio tyrimo protokolas buvo sudarytas iš kelių vizitų:

- Pacientams atliktas periodontologinis ištyrimas, paimti seilių mėginiai. Nestimuliuotų seilių mėginiai paimti naudojant 3 sterilius vatos tamponėlius, laikant burnoje 5 minutes. Po to surinkus seilių tamponėlius, jie laikyti steriliuose induose -80°C temperatūroje. Taip pat I vizito metu atliktas podanteninis instrumentavimas to paties egzaminatoriaus-gydytojo. Procedūra atlikta steriliame lauke, naudojant vietinį nuskausminimą, naudojant ultragarsinį skalerį (Acteon Satelec Suprasson P5 Booster) ir rankinius instrumentus (Gracey mikrokiuretes (Hu-Friedy), minikiuretes (LM-Dental) ir optinį didinimą 4,5 $\times$. Jei pacientas priskirtas testinei grupei, į periodontologines kišenes buvo įvedami hidrogelio geliai su proantocianidiniais. Jei pacientas priskirtas kontrolinei grupei – gydymas baigiamas be hidrogelių įvedimo į periodontologines kišenes (2.1.2.8.2 pav.). Po procedūros pacientui paaiškinama pooperacinė priežiūra.



2.1.2.8.2 pav. Proantocianidinių plėvelės įdėjimas. Klinikinis vaizdas

- Pacientai kviečiami sekančiam vizitui po atliktos procedūros praėjus 8 savaitėms. Atliktas periodontologinis ištyrimas. Pakartotinai paimti nestimuliuotų seilių pavyzdžiai, kaip aprašyta anksčiau.

2.1.2.9. Klinikiniai ir imunologiniai rodikliai, kalibracija

Periodontito gydymo poveikis atspindėjo klinikiniais periodonto matavimais (PPD, CAL, BOP ir PI) ir biocheminiais matavimais (MMP-3 ir TIMP-1 koncentracijos seilėse). PPD, BOP, CAL ir PI buvo matuojami 6 kiekvieno danties vietose: meziobukalinėje, bukalinėje, distobukalinėje, distolingualinėje, lingvalinėje ir meziolingualinėje. Trečiųjų krūminių dantų klinikiniai matavimai nebuvo įtraukti į tyrimą.

Vidutinio gylio kišenių PPD ir CAL kiekvienam pacientui tyrimo pradžioje (ir po 8 savaičių) buvo gauti apskaičiuojant PPD ir CAL vidurkį vidutinio gylio vietose kiekvienam pacientui tyrimo pradžioje (ir po 8 savaičių). Panašiai, gilių kišenių PPD ir CAL kiekvienam pacientui tyrimo pradžioje (ir po 8 savaičių) buvo gauti apskaičiuojant PPD ir CAL vidurkį giliose vietose kiekvienam pacientui tyrimo pradžioje (ir po 8 savaičių). Paciento PPD (ir CAL) pokytis, palyginti su pradiniu lygiu vidutinio (gilumo) kišenės, buvo gautas apskaičiuojant kiekvieno paciento PPD (ir CAL) pokyčių vidurkį pagal pradinį PPD (4–6 mm arba ≥ 7 mm). Paciento BOP (ir paciento PI) buvo gauti apskaičiuojant dantų vietų su BOP (ir apnašomis) procentinę dalį kiekvienam pacientui ir klasifikuojant kišenes pagal pradinį PPD (4–6 mm arba ≥ 7 mm).

Statistinių duomenų analizei periodontologinės kišenės pagal gylį buvo suskirstytos į dvi kategorijas: vidutinio gylio (4–6 mm) ir gilios (≥ 7 mm) kišenės. Pagrindinis vertinamas kintamasis- vidutinis PPD pokytis vidutinio gylio kišenėse (lyginant pradinį ištyrimą su ištyrimu po 8 savaičių). Antriniai kintamieji – vidutinis PPD pokytis giliose kišenėse (lyginant pradinį ištyrimą su ištyrimu po 8 savaičių); vidutinis klinikinis prisitvirtinimo lygio pokytis; kraujavimo po zondavimo lygio pokytis; apnašų indekso pokytis; vidutiniai MMP-8 ir TIMP-1 pokyčiai seilėse.

Tyrėjo kalibracija buvo vykdoma atliekant dvigubą 10 pacientų ištyrimą su 15 minučių intervalu. Į šią imtį įtraukti asmenys, turintys mažiausiai 5 dantis su išreikšta periodonto destrukcija, kai giliojo dantenu zonavimo gylis (PPD) ir klinikinio prisitvirtinimo praradimas (CAL) buvo ≥ 5 mm. Klinikiniams matavimams abiejų etapų metu naudotas standartizuotas universalus periodontologinis zondas (PCPUNC156; Hu-Friedy, JAV).

2.1.2.10. Imunologinis vertinimas

Klinikinio tyrimo metu buvo atlikta MMP-8 ir TIMP-1 kiekio ir klininių parametų ryšio analizė, siekiant įvertinti proantocianidinų efektyvumą periodontito gydymo metu. MMP-3 ir TIMP-1 kiekis matuotas seilių mėginiuose prieš atliktą gydymą ir po atlikto gydymo praėjus 2 mėnesiams.

MMP-3 ir TIMP-1 kiekio matavimams buvo panaudota Salivette (SARSTEDT AG & Co) seilių pavyzdžių surinkimo rinkinys.

Imunologinį tyrimą atliko tas pats eksperimentuotojas. Mėginiai buvo centrifuguoti 3500 apsiskukimų/min. (2 min.) greičiu ir išpilstyti lygiomis dalimis į Eppendorf tipo mėgintuvėlius o į kiekvieną mėginį buvo įpilta proteazės inhibitoriaus kokteilio (1 mg/ml). Visi mėginiai buvo laikomi – 80 °C temperatūroje ir įvertinti naudojant imunofermentinį tyrimą (ELISA) pagal gamintojo instrukcijas. MMP-3 ir TIMP-1 koncentracija seilių mėginiuose buvo tirta naudojant komercinius ELISA rinkinius („Elabscience“) ir „Multiskan“ mikroplokštelių skaitytuvą („Thermo Fisher Scientific“) esant 450 nm bangos ilgiui. Rezultatai buvo apskaičiuoti naudojant standartines kreives, gautas atliekant kiekvieną seilių tyrimą, ir pateikti pg/ml.

2.1.3. Statistinė analizė

Ikiklinikiniai tyrimai

Statistinė analizė atlikta naudojant IBM SPSS 20 statistikos programinės įrangos paketą (IBM, JAV).

Normaliai pasiskirsčiusiems duomenims (patikrinti naudojant Shapiro-Wilk testą) grupių vidurkiams palyginti buvo naudojama vienfaktorinė ANOVA analizė.

Antibakterinio aktyvumo tyrimams ir bakterijų bei fibroblastų bendros kultūros eksperimentams statistinė duomenų analizė atlikta taikant ANOVA su Tukey HSD post hoc testu. Eksperimentams su pelių dantenų fibroblastais naudota dispersija su Dunno testu. Reikšmingumo lygmuo nustatytas ties 0,05.

Kiekybiniai rezultatai pateikiami kaip 3–7 pakartojimų vidurkis ± standartinis nuokrypis (SD).

Klinikiniai tyrimai

Statistinė analizė atlikta naudojant IBM SPSS 28 statistikos programinės įrangos paketą (IBM, JAV).

Buvo atliktas Shapiro-Wilk testas, siekiant įvertinti, ar klinikiniai periodonto rodikliai (vienam pacientui PPD, CAL, BOP ir PI) ir biocheminiai rodikliai (MMP-3 ir TIMP-1 koncentracijos seilėse) atitiko normalų pasiskirstymą. Atitinkamai, jei duomenys atitiko normalų pasiskirstymą, buvo atliktas porinių imčių t testas, kad būtų galima palyginti grupių duomenis prieš gydymą ir po jo. Jei buvo pažeista normalumo prielaida, buvo taikytas susijusių imčių Wilcoxon ženklų rango testas, siekiant gauti palyginimus prieš ir po gydymo grupėse.

Matmenų palyginimai tarp grupių buvo nustatyti naudojant nepriklausomų imčių t testą, jei konkretus matas atitiko normalų skirstinį, arba Mann-Whitney testą, jei konkretus matas atitiko nenormalų skirstinį. Reikšmingumo lygmuo nustatytas $p < 0,05$.

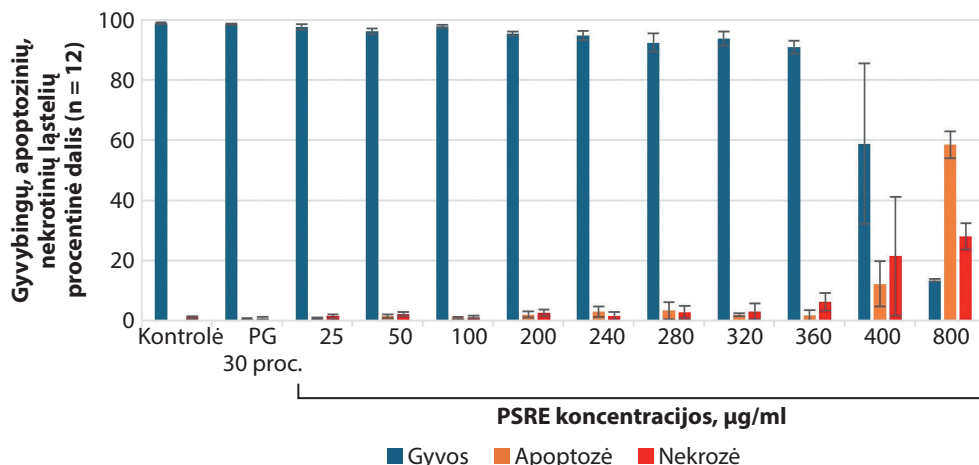
3. REZULTATAI

3.1. Laboratorinių tyrimų rezultatai

Laboratorinių tyrimų dalis buvo sudaryta iš kelių skirtingų tyrimų, analizuojant proantocianidinų, bakterijų ir ląstelių tarpusavio sąveiką.

3.1.1. Proantocianidinų citotoksiškumo vertinimo rezultatai

Rezultatai parodė, kad mažos (mažiau nei 100 $\mu\text{g/ml}$) PSRE koncentracijos neturėjo įtakos ląstelių gyvybingumui, o didelės koncentracijos (400 $\mu\text{g/ml}$ ar didesnės) stipriai veikė ląstelių gyvybingumą. Nustatyta, kad pusė maksimalios slopinamosios koncentracijos yra 583 $\mu\text{g/ml}$; todėl vėlesni *in vitro* tyrimai buvo atlikti su mažesnėmis ekstrakto koncentracijomis (3.1.1.1 pav.).



3.1.1.1 pav. Pusinės maksimalios slopinamosios PSRE koncentracijos poveikio HGF-1 ląstelių gyvybingumui tyrimas

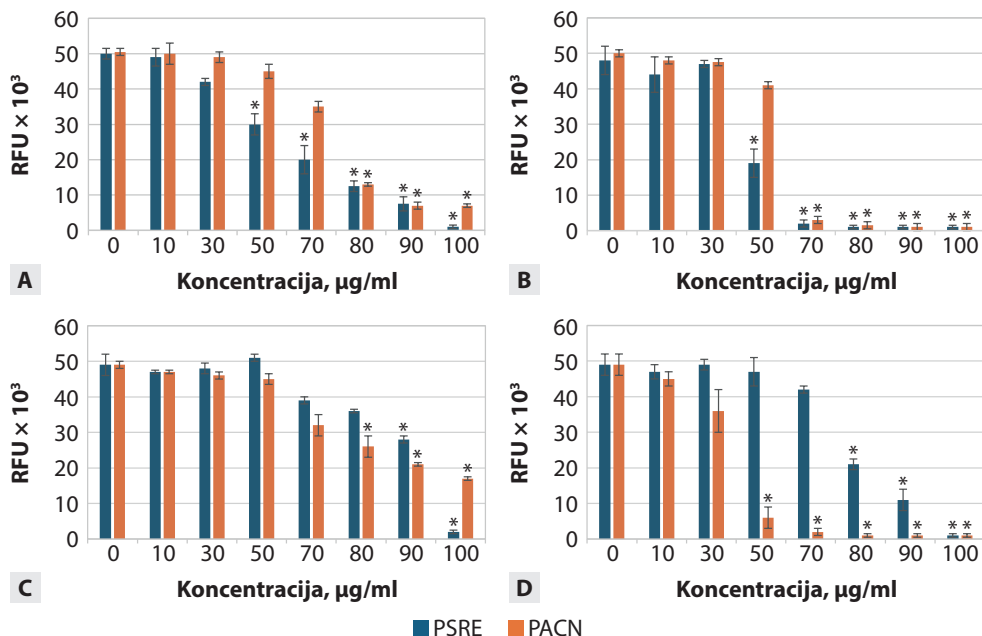
PG 30 proc. – 30 proc. polietilenglikolio tirpalas.

Remiantis šiais rezultatais, vėlesniuose eksperimentuose naudotos PACN koncentracijos, ženkliai žemesnės nei IC50 vertė.

3.1.2. Proantocianidinų antibakterinio poveikio analizės rezultatai

Antibakterinio efektyvumo vertinimui bakterijų padermės (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *A. actinomycetemcomitans* ir *E. coli*) buvo paveiktos PSRE arba PACN (10–100 $\mu\text{g/ml}$). Antibakterinio aktyvumo rezultatai (3.1.2.1 pav.) parodė, kad tiek PSRE, tiek PACN reikšmingai sumažino bakterijų metabolinį

aktyvumą, palyginti su kontroline grupe, pradedant nuo 50–70 µg/ml koncentracijų.



3.1.2.1 pav. *Pelargonium sidoides* šaknų sausojo ekstrakto (PSRE) ir proantocianidinų (PACN) antibakterinis aktyvumas.

Antibakterinis aktyvumas prieš *Staphylococcus aureus* (A), *Staphylococcus epidermidis* (B), *Escherichia coli* (C) ir *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (D). RFU – santykiniai fluorescencijos vienetai. Stulpeliai (bakterijų metabolinis aktyvumas) rodo šešių eksperimentinių pakartojimų vidurkių ir standartinius nuokrypius. *p < 0,05, palyginti su kontrole.

Tarp tirtų bakterijų padermių buvo pastebėti tam tikri skirtumai. *S. aureus* atveju PSRE buvo veiksmingesnis nei PACN: 50 µg/ml PSRE pakako, kad reikšmingai sumažėtų metabolinis aktyvumas, o PACN rezultatas buvo panašus esant 80 µg/ml koncentracijai (p < 0,05, palyginti su kontroline grupe). *A. actinomycetemcomitans* atveju rezultatai buvo priešingi: PACN reikšmingai sumažino metabolinį aktyvumą esant 50 µg/ml koncentracijai, tačiau norint pasiekti tokį aktyvumo lygį, reikėjo 80 µg/ml PSRE. *S. epidermidis* metabolizmą reikšmingai sumažino tiek PSRE, tiek PACN, esant 70 µg/ml koncentracijai. Įdomu tai, kad nepatogeninė *E. coli* parodė didžiausią atsparumą gydymui 0–80 µg/ml diapazone. Po 80 µg/ml PSRE, *E. coli* metabolinis aktyvumas sumažėjo 26 proc., palyginti su kontroline grupe, o *S. aureus*, *S. epidermidis* ir *A. actinomycetemcomitans* metabolinis aktyvumas sumažėjo atitinkamai 75 proc., 97 proc. ir 57 proc. Esant 80 µg/ml PACN, šių keturių

ta pačia tvarka išvardytų padermių metabolinis aktyvumas sumažėjo atitinkamai 47 proc., 74 proc., 96 proc. ir 99 proc. Be to, net ir pridėjus 100 µg/ml PACN į augimo terpę, *E. coli* vis tiek išlaikė beveik pusę kontrolinio aktyvumo lygio.

Apibendrinant, antibakterinio vertinimo rezultatai rodo stipresnę PSRE ir PACN toksiškumą *S. aureus*, *S. epidermidis* ir *A. actinomycetemcomitans* nei nepatogeninėms *E. coli* padermėms, kai ekstraktai buvo naudojami 80 µg/ml diapazone. Esant didesnėms (90 ir 100 µg/ml) koncentracijoms, visoms tirtoms padermėms buvo pastebėtas panašus plataus diapazono poveikis, nes visi PSRE ir PACN rezultatai reikšmingai skyrėsi, palyginti su neapdorotomis kontrolinėmis grupėmis ($p < 0,05$). Svarbu, kad *A. actinomycetemcomitans* padermę (vieną pagrindinių periodontito ligos sukėlėjų) stipriau veikia proantocianidinai nei naudotas *Pelargonium sidoides* šaknų ekstraktas.

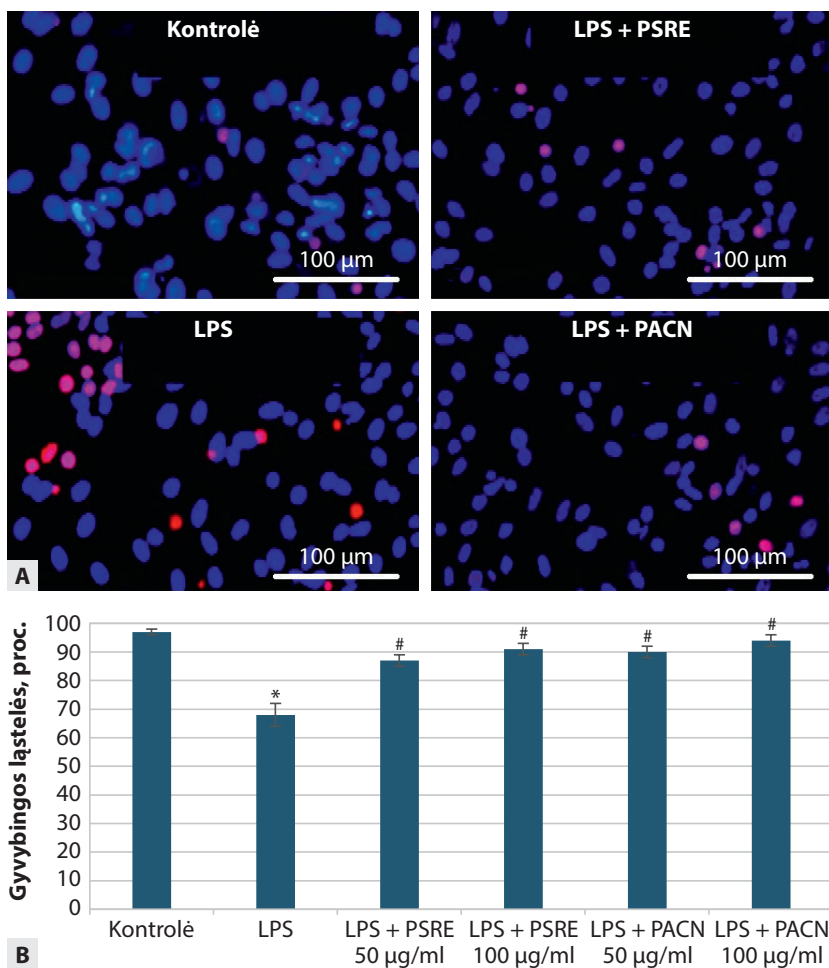
3.1.3. Proantocianidinų poveikio pelių dantenų fibroblastų metabolizmui, esant bakterinei infekcijai, fluorescencinės analizės tyrimo rezultatai

Apsauginis PSRE ir PACN poveikis bakterinės infekcijos sąlygomis gali pasireikšti ne tik bakterijų augimo slopinimu, bet ir ląstelių atsparumo bakterijų metabolitams didėjimu. Todėl buvo atliktas laboratorinis tyrimas norint išsiaiškinti, kaip PSRE ir PACN veikia pirminių pelių dantenų fibroblastų gyvybingumą esant bakteriniam lipopolisacharidui (LPS).

Norėdami parinkti tinkamas PSRE ir PACN koncentracijas, kurios neturi žalingo poveikio ląstelėms, nuo koncentracijos priklausomas toksiškumas buvo nustatytas anksčiau aptartu dvigubu branduolių dažymo metodu propidžio jodidu ir Hoechst 33342. Nekrotinių ląstelių su propidžio jodido teigiamais branduoliais kiekis reikšmingai padidėjo po 24 val. apdorojimo 200 µg/ml ir didesne PSRE ir PACN koncentracija. PSRE pasižymėjo reikšmingai didesniu toksiškumu, palyginti su PACN, koncentracijos intervale nuo 200 µg/ml, ir tai atsispindėjo nustatytame preparatų IC₅₀ (rodiklis matuoja 50 proc. ląstelių žūtį su esama tiriamos medžiagos koncentracija): 209 µg/ml PSRE ir 288 µg/ml PACN. Koncentracijų intervale nuo 400 iki 550 µg/ml nebuvo jokio kito skirtumo tarp abiejų preparatų poveikio ir beveik visos kultūros ląstelės buvo nekrotinės.

Remiantis šiais duomenimis, priešuždegiminiam poveikiui tirti buvo pasirinktos dvi PSRE ir PACN koncentracijos: 50 ir 100 µg/ml. Abi šios koncentracijos nebuvo toksiškos dantenų fibroblastams, kai ląstelių kultūros šiais junginiais veikiamos 24 valandas. Po apdorojimo 2 µg/ml LPS, nekrotinių ląstelių skaičius fibroblastų ląstelių kultūroje padidėjo nuo 2,7 proc. (2,2 proc.)

kontrolinėje grupėje iki 31,7 proc. (11,9 proc.) po PACN ir PSRE, atitinkamai, o tai rodo statistiškai reikšmingą ląstelių gyvybingumo sumažėjimą (3.1.3.1 pav.).



3.1.3.1 pav. PSRE ir PACN poveikis pelių dantenų fibroblastų, paveiktų bakterinio LPS, gyvybingumui.

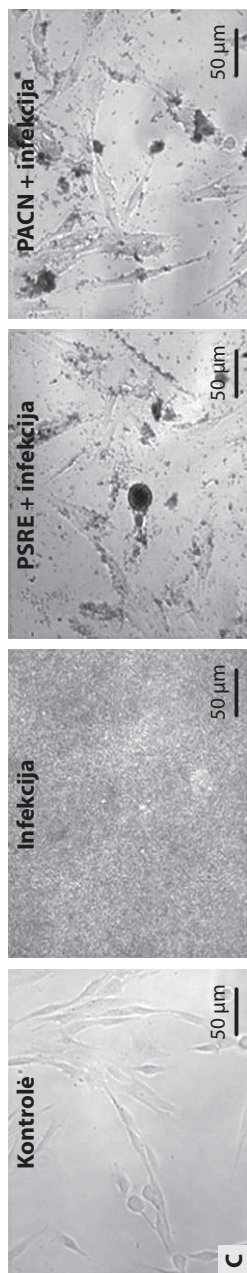
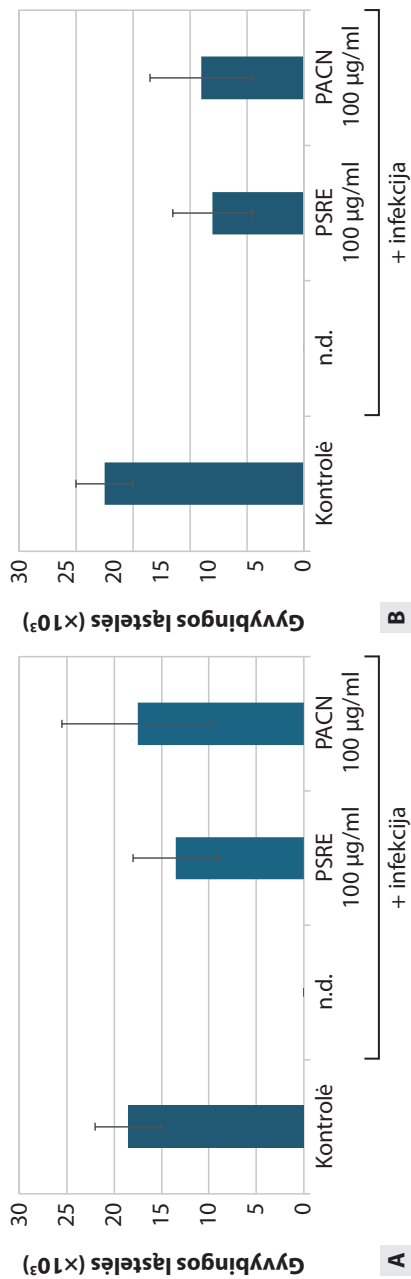
(A) Tipiniai fluorescenciniai vaizdai po ląstelių apdorojimo LPS ir 100 μg/ml PSRE arba PACN bei branduolių gyvybingumo dažymo. (B) Kiekybiniai dantenų fibroblastų gyvybingumo rezultatai. Duomenys pateikiami kaip penkių eksperimentų vidurkiai ir standartinis nuokrypis. * – reikšmingas skirtumas, palyginti su neapdorota kontroline grupe, o # – reikšmingas skirtumas, palyginti su gydymu tik LPS, $p < 0,05$.

Įdomu, kad apdorojimas 50 ir 100 µg/ml PSRE ir PACN užkirto kelią LPS sukeltam ląstelių gyvybingumo praradimui. Duomenys rodo, kad tiek PSRE, tiek PACN galėjo apsaugoti dantenų fibroblastus nuo bakterijų LPS sukeltos nekrozės.

3.1.4. Proantocianidinų poveikio žmogaus dantenų fibroblastų metabolizmui, esant bakterinei infekcijai: „lenktynių dėl paviršiaus“ tyrimo rezultatai

Laboratorinis tyrimas, analizuojant proantocianidinų, bakterijų ir ląstelių (dantenų fibroblastų) sąveiką, atskleidė, kad PSRE ir PACN antibakterinės savybės yra veiksmingos apsaugant žmogaus dantenų fibroblastus bakterinės infekcijos metu. Tyrimo metu buvo imituojamos dvi mikroaplinkos: burnos (auginant kartu dantenų fibroblastų ląsteles ir bakterijas *A. actinomycetem-comitans*), ir gleivinės (kartu kultivuojant dantenų fibroblastus ir *S. aureus*). „Lenktynių dėl paviršiaus“ modelio rezultatai pateikti 3.1.4.1 pav.

Tiek PSRE, tiek PACN, (100 µg/ml), buvo veiksmingi apsaugant ląsteles nuo bakterinės infekcijos: gyvybingų ląstelių skaičius po 24 val. tiesioginio kontakto su bakterijomis, buvo panašus į kontrolinę grupę (ląstelės, kultivuotos terpėje be bakterijų). Ir atvirkščiai, kai bakterijos buvo kultivuojamos ląstelių šulinėliuose nesant PSRE ar PACN, bakterijos sugebėjo visiškai kolonizuoti šulinėlį ir tokiu atveju gyvybingų ląstelių nebuvo aptikta. Rezultatai rodo, kad bet kurios iš šių medžiagų taikymas veiksmingai išsaugojo dantenų fibroblastų ląstelių gyvybingumą, mažindamas bakterijų proliferaciją. Be to tyrimas parodė, kad PACN pasižymi stipresnėmis ląsteles apsaugančiomis savybėmis nei PSRE ekstraktas.



3.1.4.1 pav. PSRE ir PACN poveikis žmogaus dantenų fibroblastų gyvybingumui mišrios kultūros „lenktynių dėl paviršiaus“ tyrime

Žmogaus dantenų fibroblastai buvo užkrėsti *A. actinomycetemcomitans* (A) arba *S. aureus* (B). Stulpeliai rodo šešių eksperimentinių pakartojimų vidurkių ir standartinius nuokrypius. „Kontrolė“ reiškia neužkrėstas ląsteles, o „n.d.“ reiškia, kad mėginiuose nebuvo aptinkamų ląstelių. (C) pateikti žmogaus dantenų fibroblastų su *A. actinomycetemcomitans* vaizdai 24 val. po užkrėtimo.

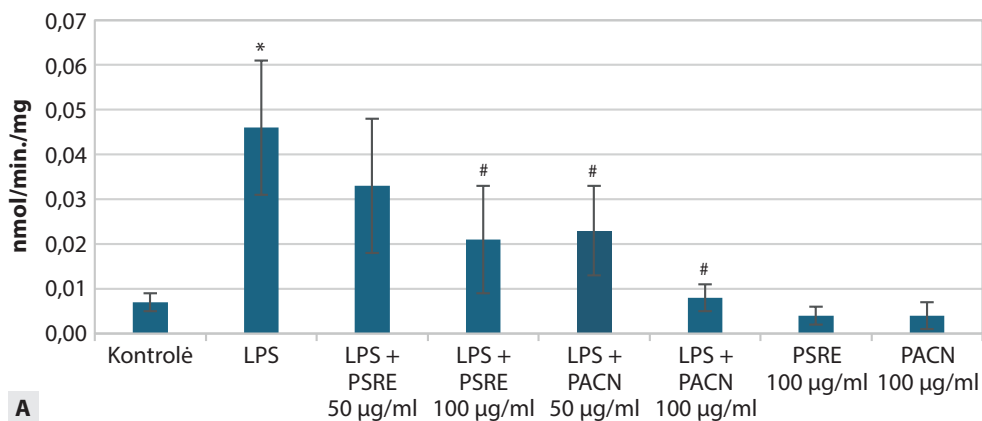
3.1.5. Proantocianidinų poveikis ląstelių apoptozei, bakterinės infekcijos metu: kaspazės-3 ir kaspazės-8 kiekio vertinimo rezultatai

Analizuojant PSRE ir PACN apsauginį antiapoptozinį poveikį, buvo vertinama iniciatorinės kaspazės-8 ir efektorinės kaspazės-3 koncentracijų pokyčiai LPS paveiktose fibroblastų ląstelėse (3.1.5.1 pav.).

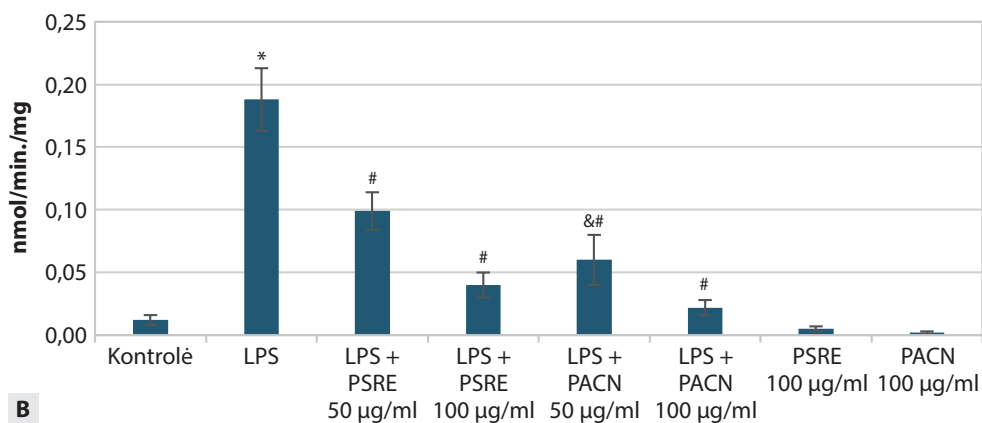
Rezultatai parodė, kad lipopolisacharidas po 24 val. padidino kaspazės-8 koncentraciją kontroliniuose mėginiuose nuo $0,007 \pm 0,001$ nmol/min/mg iki $0,047 \pm 0,013$ nmol/min./mg. PSRE, esant 50 µg/ml koncentracijai, reikšmingai nepaveikė LPS sukeltos kaspazės-8 aktyvumo, tačiau paveikus 100 µg/ml PSRE, 50 µg/ml PACN ir 100 µg/ml PACN reikšmingai sumažino LPS sukeltą kaspazės-8 aktyvumą – atitinkamai 2,2, 2,0 ir 5,9 karto. 100 µg/ml PSRE ir PACN be lipopolisacharido neturėjo reikšmingo poveikio kaspazės aktyvumui.

Kaspazės-3 matavimo rezultatai parodė kad po 24 val. apdorojimo lipopolisacharidu, kaspazės-3 kiekis padidėjo nuo $0,012 \pm 0,01$ iki $0,189 \pm 0,06$ nmol/min./mg. Tiek PSRE, tiek PACN visomis tirtomis koncentracijomis reikšmingai sumažino LPS poveikį kaspazės-3 aktyvumui. Kai LPS buvo taikomas kartu su 50 µg/ml PSRE, kaspazės-3 aktyvumas buvo beveik dvigubai mažesnis nei mėginiuose, apdorotuose tik LPS. 100 µg/ml PSRE sumažino LPS poveikį kaspazės-3 aktyvumui 4,7 karto. 50 ir 100 µg/ml PACN sumažino LPS sukeltą kaspazės-3 aktyvumą atitinkamai 3 ir 8,8 karto. Po apdorojimo 100 µg/ml PSRE arba vien tik PACN, be LPS, reikšmingo poveikio kaspazės-3 substrato skilimo greičiui nebuvo pastebėta.

Kaspazės aktyvumo vertinimas parodė, kad ir PSRE, ir PACN geba slopinti bakterijų LPS sukeltą apoptozės aktyvinimą. Abu preparatai turi stipresnį poveikį mažinant efektorinės kaspazės-3 aktyvumą, palyginti su kaspaze-8. Rezultatai parodė, kad PACN buvo veiksmingesnis slopinant kaspazės-8 aktyvumą nei PSRE, todėl PACN yra galingesnis apoptozės slopintojas ankstyvosiose stadijose. Nė viena iš medžiagų nebuvo toksiška dantenų fibroblastams, veikiant juos 50, 100 µg/ml PACN bei PSRE 24 valandas.



A



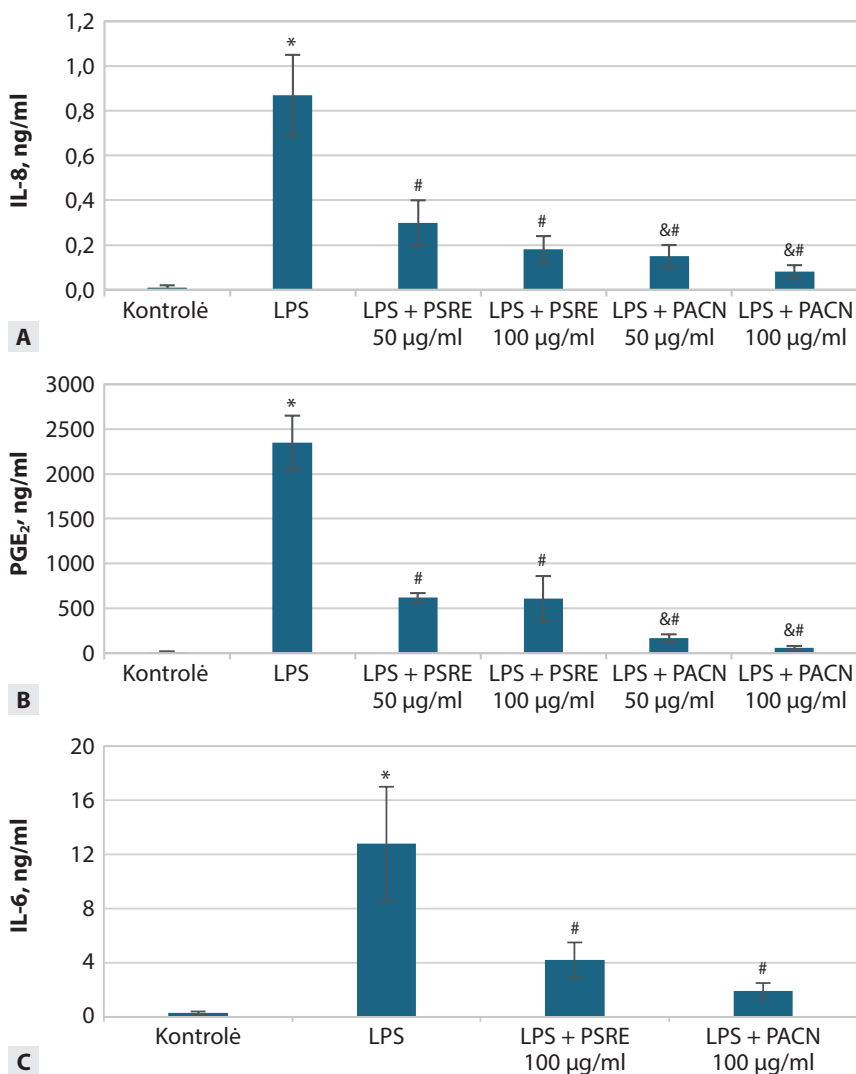
B

3.1.5.1 pav. PSRE ir PACN poveikis LPS sukeltai kaspazės-8 (A) ir kaspazės-3 (B) aktyvacijai dantenų fibroblastuose

Duomenys pateikiami kaip vidurkiai su standartiniu 7 eksperimentinių pakartojimų nuokrypiu. * – reikšmingas skirtumas, palyginti su neapdorota kontroline grupe, # – reikšmingas skirtumas, palyginti su gydymu tik LPS, ir & – reikšmingas skirtumas, palyginti su LPS ir 50 µg/ml PSRE gydymu, $p < 0,05$.

3.1.6. Uždegiminio atsako reguliavimas, naudojant proantocianidinus, esant bakterinei infekcijai: citokinų matavimo tyrimų rezultatai

Infekcijos sukeltas uždegimas yra pagrindinis periodonto audinių nykimo veiksnys periodonto ligų patogenezėje. Toliau buvo tirtas PSRE ir PACN priešuždegiminis poveikis, vertinant LPS sukeltą uždegimo mediatorių išsiskyrimą iš dantenų fibroblastų ir žmogaus periferinio kraujo mononuklearinų leukocitų. Buvo atliktas laboratorinis tyrimas, norint išanalizuoti, kaip PSRE ir PACN veikia IL-8, PGE2 išsiskyrimą iš pelių dantenų fibroblastų bei IL-6 išsiskyrimą iš periferinio kraujo mononuklearinų ląstelių (3.1.6.1 pav.).



3.1.6.1 pav. *Pelargonium sidoides* šaknų sausojo ekstrakto (PSRE) ir proantocianidinų iš PSRE (PACN) poveikis (A) interleukino-8 (IL-8) ir (B) prostaglandino E₂ (PGE₂) sekrecijai iš pelių dantenų fibroblastų ir (C) interleukino-6 (IL-6) sekrecijai iš periferinio kraujo mononuklearinių ląstelių po LPS apdoravimo

Duomenys pateikiami kaip septynių eksperimentų vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai. * – reikšmingas skirtumas, palyginti su neapdorota kontroline grupe, # – reikšmingas skirtumas, palyginti su gydymu tik LPS, ir & – reikšmingas skirtumas, palyginti su LPS ir 50 g/ml PSRE gydymu, $p < 0,05$.

Įvertinus IL-8 kiekį, paaiškėjo, kad po 24 val. su LPS citokino IL-8 kiekis šoktelėjo iki 1022 ± 75 ng/ml. PSRE (50 µg/ml), sumažino IL-8 koncentraciją iki 344 ± 49 ng/ml, t. y. tris kartus nei ląstelėse, nepaveiktose ekstraktu. Padidinus PSRE koncentraciją iki 100 µg/ml, IL-8 išsiskyrimas dar labiau sumažėjo iki 201 ± 33 ng/ml (penkis kartus mažiau nei po gydymo vien LPS). Panašus slopinimo lygis buvo pasiektas naudojant 50 µg/ml PACN, o esant 100 µg/ml PACN, IL-8 koncentracija po LPS stimuliacijos dar labiau sumažėjo iki 32 ± 12 ng/ml, t. y. buvo 16 kartų mažesnė po gydymo lyginant su LPS grupe.

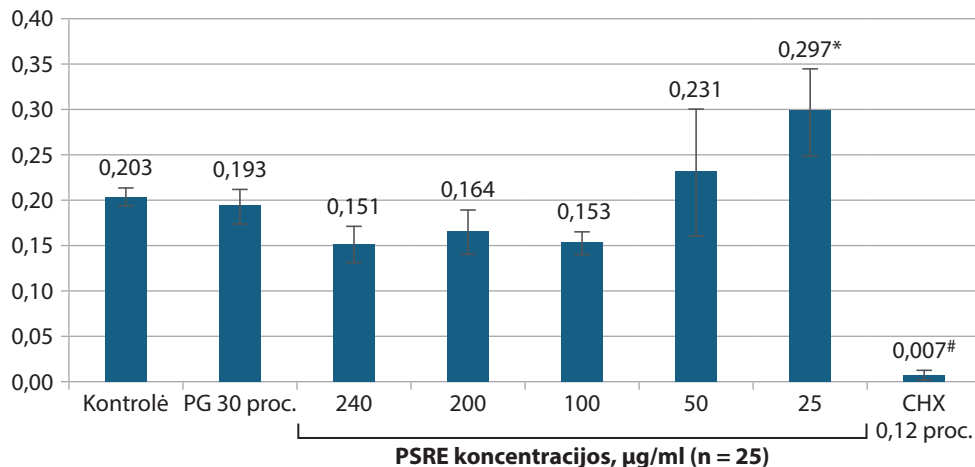
Taip pat tyrime buvo analizuojamas ir PGE2, ciklooksigenazės-2 uždegiminio kelio tarpininko, kiekis pelių dantenų fibroblastų kultūros terpėje. Kontroliniuose mėginiuose vidutinė PGE2 koncentracija buvo 5 ± 2 ng/ml, tačiau po 24 val. su LPS ji padidėjo iki 2372 ± 194 ng/ml. Esant tiek 50, tiek 100 µg/ml PSRE, PGE2 koncentracija po apdorojimo LPS buvo 637 ± 58 ng/ml ir 613 ± 133 ng/ml, atitinkamai t. y. beveik keturis kartus mažesnė, lyginant ekstrakto nepaveikta grupe. 50 ir 100 µg/ml PACN buvo dar efektyvesnis: PGE2 koncentracija sumažėjo iki atitinkamai 174 ± 41 ng/ml ir 72 ± 16 ng/ml, arba 14 ir 33 kartus, palyginti su vien LPS aplikacija. Taigi, PACN poveikis LPS stimuliuojamam PGE2 išsiskyrimui buvo žymiai stipresnis nei PSRE.

IL-6 kiekio iš PBMC ląstelių matavimai parodė, kad 100 µg/ml koncentracijos PSRE ir PACN reikšmingai sumažino LPS sukeltą IL-6 sekreciją iš PBMC atitinkamai iki 67 proc. ir 18 proc. lygio, kurį sukėlė LPS stimuliacija. Nei PSRE, nei PACN nebuvo toksiški ląstelėms, esant taikomoms koncentracijoms, kaip parodė metabolinio gyvybingumo analizė.

Duomenys apie uždegiminių mediatorių sekreciją rodo, kad ir PSRE, ir PACN efektyviai slopina LPS sukeltą IL-8 ir PGE2 išsiskyrimą iš pelių dantenų fibroblastų ir IL-6 išsiskyrimą iš mononuklearinių leukocitų. PACN pasižymėjo šiek tiek stipresniu IL-8 ir IL-6 išsiskyrimą slopinančiu aktyvumu ir žymiai stipresniu PGE2 išsiskyrimą slopinančiu aktyvumu nei PSRE.

3.1.7. Proantocianidinų ir chlorheksidino digliukonato poveikio dantenų fibroblastams lyginamosios analizės rezultatai

Tyrimė buvo atlikta PSRE ir chlorheksidino poveikio HGF-1 ląstelių proliferacijai analizė (3.1.7.1 pav.).



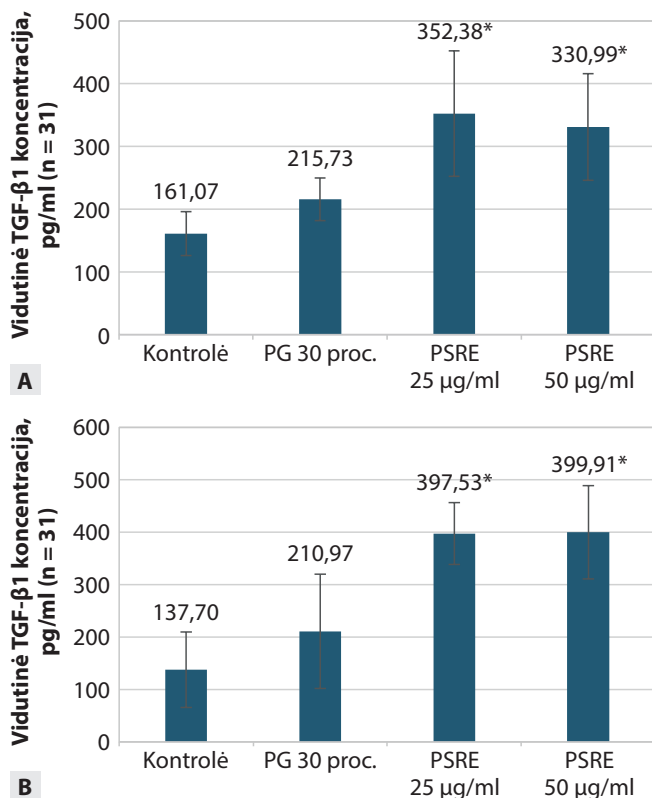
3.1.7.1 pav. PSRE ir chlorheksidino poveikis HGF-1 ląstelių skaičiui (santykiniais vienetais (vidurkis $\pm$ SE))

PG 30 proc. – 30 proc. polietilenglikolio tirpalas; CHX 0,12 proc. – 0,12 proc. chlorheksidino digliukonato tirpalas; Vienfaktorinė ANOVA, po kurios sekė LSD *post hoc* testas: * – kontrolinė grupė, palyginti su 25 $\mu\text{g/ml}$ ($0,09 \pm 0,03$), $p = 0,006$; # – kontrolinė grupė, palyginti su CHX 0,12 proc. ($-0,20 \pm 0,03$), $p < 0,001$. Kitų grupių rezultatai, palyginti su kontroline grupe, nesiskyrė.

Maža PSRE koncentracija (25 $\mu\text{g/ml}$) sukėlė didesnę HGF-1 ląstelių proliferacijos lygį, palyginti su didesnėmis koncentracijomis (100 $\mu\text{g/ml}$ ar didesnė). Priešingai, 0,12 proc. chlorheksidino tirpalas visiškai slopino ląstelių proliferaciją.

3.1.8. Proantocianidinų proliferacinio potencialo žmogaus dantenų ir periodonto raiščio fibroblastams analizė (TGF- β 1 ELISA tyrimo) rezultatai

Proantocianidinų proliferacinio potencialo žmogaus dantenų ir periodonto raiščio fibroblastams analizė buvo atlikta matuojant TGF- β 1 kiekį PSRE paveiktose HGF-1 ir HPDLF ląstelėse (3.1.8.1 pav.).



3.1.8.1 pav. TGF- β 1 lygiai PSRE paveiktose HGF-1 (A) ir HPDLF (B) ląstelėse

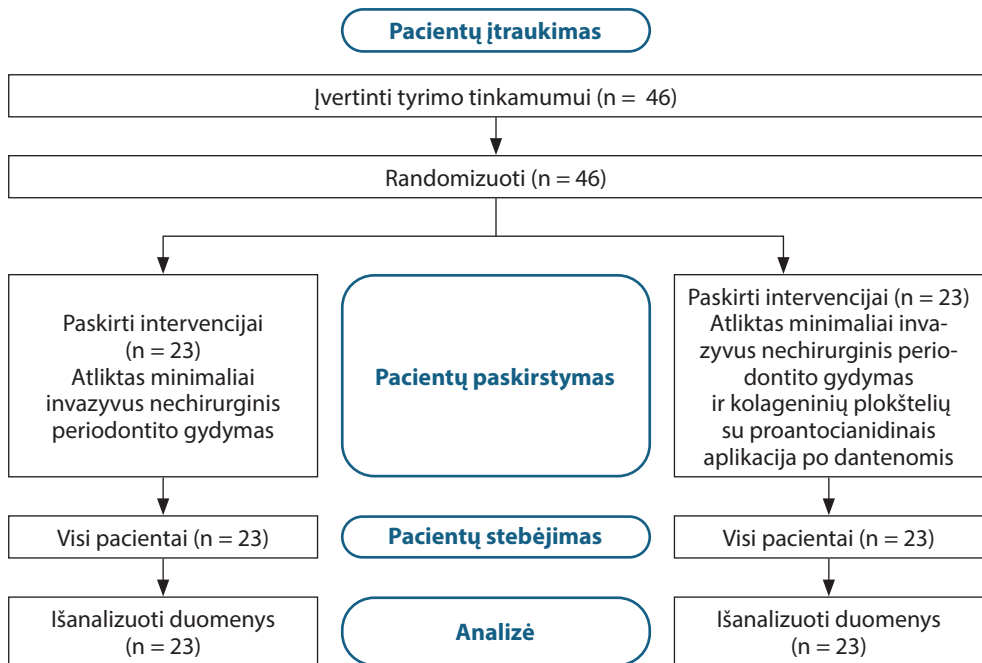
Vienfaktorinis ANOVA testas, po kurio sekė LSD post hoc testas: * $p < 0,001$, palyginti su kontroline grupe. PG 30 proc. – 30 proc. polietilenglikolio tirpalas.

Rezultatai parodė, kad 25 ir 50 µg/ml PSRE grupėse TGF- β 1 lygiai buvo žymiai didesni, palyginti su kontroline grupe (vidurkis $\pm$ SE) ($352,38 \pm 31,32$ ir $330,99 \pm 26,53$, palyginti su $161,07 \pm 11,04$ pg/ml HGF-1 ląstelėse; $397,53 \pm 18,1$ ir $399,91 \pm 27,61$, palyginti su $137,7 \pm 16,54$ pg/ml HPDLF ląstelėse).

3.2. Klinikinio tyrimo rezultatai

3.2.1. Klinikinio tyrimo dalyviai

Tyrime dalyvavo 46 dalyviai, turinčiais III–IV stadijos generalizuotą periodontitą. Pacientai atsitiktine tvarka suskirstyti į dvi grupes: vienai grupei taikytas visos burnos podanteninis instrumentavimas (konservatyvus periodontologinis gydymas) su podanteniniu hidrogeliu su proantocianidiniais įvedimu (MINST+PACN grupė) arba tik visos burnos podanteninis instrumentavimas (MINST grupė). Kiekvieną grupę sudarė 23 pacientai. Scheminis pacientų skaičiaus atvaizdavimas pateiktas CONSORT FLOW diagramoje (3.2.1.1 pav.).



3.2.1.1 pav. CONSORT FLOW diagramoje stebimas scheminis pacientų skaičiaus atvaizdavimas.

Tarp dviejų tyrimo grupių nerasta statistiškai reikšmingo skirtumo, vertinant amžių, lytį, tabako gaminių naudojimą (buvusio ar esamo) ar periodontito stadijos skirtumus pradinio ištyrimo metu (3.2.1.1. lentelė).

3.2.1.1 lentelė. Pacientų pasiskirstymas pagal amžių, lytį, tabako gaminių naudojimą (buvusio ar esamo) ar periodontito stadijos skirtumus pradinio ištyrimo metu

Savybė	MINST (n = 23)	MINST+PACN (n = 23)	p
Amžius, m. (vidurkis ± SD)	46,3±9,5	51,2±1,5	0,109 ^a
Lytis, n (proc.)			
Moteris	17 (73,9)	16 (69,6)	0,743 ^b
Vyras	6 (26,1)	7 (30,4)	
Rūkymas			
Rūko	8 (34,8)	7 (30,4)	0,753 ^b
Nerūko	15 (65,2)	16 (69,6)	
Periodontito stadija, n (proc.)			
III stadija	16 (69,6)	11 (47,8)	0,134 ^b
IV stadija	7 (30,4)	12 (52,2)	

^a Nepriklausomų imčių t testas; ^b χ^2 testas.

3.2.2. Klinikinių parametru pokyčiai

Periodonto kišenių zondavimo gylio (PPD) pokyčiai. Vidutinė PPD dinamika vienam pacientui vidutinio sunkumo (pradinis PPD 4–6 mm) ir gilių (pradinis PPD $\geq$ 7 mm) kišenių atveju pateikta vaizdinėmis priemonėmis (3.2.2.1 lentelė).

3.2.2.1 lentelė. Klinikinių parametrų pokyčiai klinikinio tyrimo metu

Ypatybė		MINST (n = 23)			MINST + PACN (n = 23)		
		Pradinis ištyrimas	Po 8 sav.	p	Pradinis ištyrimas	Po 8 sav.	p
CAL, mm (vidurkis ±SD)	Vidutinio gylgio kišenės (4–6 mm)	6,2 ± 0,6	3,7 ± 0,5	<0,001*	7,0 ± 0,7	4,0 ± 0,9	<0,001*
	Gilios kišenės (≥ 7 mm)	9,2 ± 1,0	5,8 ± 1,1	<0,001*	9,4 ± 0,8	5,8 ± 1,0	<0,001*
PPD, mm (vidurkis ±SD)	Vidutinio gylgio kišenės (4–6 mm)	5,0 ± 0,3	2,1 ± 0,6	<0,001*	5,5 ± 0,3	2,1 ± 0,5	<0,001*
	Gilios kišenės (≥ 7 mm)	7,7 ± 0,6	2,7 ± 1,2	<0,001*	7,8 ± 0,5	2,7 ± 0,9	<0,001*
Proc. kišenių su PPD	Sveikos sritys (iki 3 mm)	–	81,4 ± 17,2	<0,001†	–	85,9 ± 12,4	<0,001†
	Vidutinio gylgio kišenės (4–6 mm)	81,0 ± 17,5	16,9 ± 14,4	<0,001†	69,1 ± 19,8	13,4 ± 11,7	<0,001†
	Gilios kišenės	≥ 7 mm	19,0 ± 17,5	1,7 ± 5,7	30,9 ± 19,8	0,6 ± 1,7	<0,001†
		≥ 5 mm	79,7 ± 12,9	9,9 ± 12,0	94,7 ± 8,8	6,6 ± 9,9	<0,001†
		≥ 6 mm	41,3 ± 22,9	3,8 ± 7,7	68,6 ± 21,8	2,7 ± 5,5	<0,001†
		≥ 7 mm	19,0 ± 17,5	1,7 ± 5,7	30,9 ± 19,8	0,6 ± 1,7	<0,001†
BOP, proc. (vidurkis ± SD)	≥ 8 mm	10,0 ± 12,2	0,5 ± 1,9	0,001†	18,6 ± 15,8	0,0 ± 0,0	<0,001†
	≥ 9 mm	5,3 ± 10,7	0,1 ± 0,5	0,008†	5,1 ± 6,9	0,0 ± 0,0	0,005†
	Vidutinio gylgio kišenės (4–6 mm)	91,4 ± 16,4	13,3 ± 18,2	<0,001†	89,2 ± 24,5	22,9 ± 29,1	<0,001†
	Gilios kišenės (≥ 7 mm)	92,1 ± 24,3	17,2 ± 27,3	<0,001†	91,2 ± 24,7	27,2 ± 32,2	<0,001†
PI, proc. (vidurkis ± SD)	Vidutinio gylgio kišenės (4–6 mm)	57,2 ± 37,0	10,6 ± 21,8	<0,001†	69,5 ± 33,7	22,6 ± 33,6	<0,001†
	Gilios kišenės (≥ 7 mm)	65,1 ± 40,5	11,6 ± 26,8	<0,001†	73,7 ± 36,8	28,8 ± 42,3	0,002

CAL – klinikinis prisitvirtinimo lygis; PPD – zondavimo gylis, BOP – kraujavimas po zondavimo, PI – apnašų indeksas. Pavaizduotas charakteristikos vertintos pradiniam taške, tada po atlikto gydymo praėjus 8 savaitėms. Lygintos dvi gydymo metodikos: MINST ir MINST + PACN. *Poruotų imčių t-testas ($\alpha = 0,05$); † Wilcoxon testas priklausantioms imtims ($\alpha = 0,05$); † vienos imties Stjudento t testas ($\alpha = 0,05$).

Vidutinis vidutinio gylio kišenių PPD MINST grupėje reikšmingai skyrėsi nuo vidutinio vidutinio gylio kišenių PPD MINST + PACNs grupėje pradinio tyrimo metu ($p < 0,001$). Kadangi vidurkiai rodė statistiškai reikšmingus skirtumus tarp grupių pradinio tyrimo metu, tolimesnė analizė buvo atlikta palyginant vidutinius PPD pokyčius po 8 savaitių nuo pradinio tyrimo.

Šio tyrimo išvados taip pat buvo padarytos remiantis vidutiniais PPD pokyčiais. Abiejose grupėse vidutinis vieno paciento PPD (vidutinio ir gilių kišenių atveju) statistiškai reikšmingai sumažėjo po 8 savaitių, palyginti su pradiniu tyrimu. Tiksliau, po 8 savaitių MINST grupėje vidutinis vieno paciento PPD sumažėjo nuo 5,0 mm (SN = 0,3) iki 2,1 mm (SN = 0,6) vidutinio gylio kišenėse ($p < 0,05$) ir nuo 7,7 mm (SN = 0,7) iki 2,7 mm (SN = 1,2) giliose kišenėse ($p < 0,05$). Papildomas PACN taikymas kartu su MINST po 8 savaitių lėmė vidutinį PPD sumažėjimą vienam pacientui nuo 5,5 mm (SN = 0,3) iki 2,1 mm (SN = 0,5) vidutinio gylio kišenėse ($p < 0,05$) ir nuo 7,8 mm (SN = 0,5) iki 2,7 mm (SN = 0,9) giliose kišenėse ($p < 0,05$) (3.2.2.1 ir 3.2.2.2 pav.).

Palyginus vidutinį PPD pokytį vienam pacientui tarp dviejų gydymo tipų, paaiškėjo, kad vidutiniškai PPD pokytis vidutinio dydžio kišenėse MINST + PACN grupėje buvo statistiškai reikšmingai didesnis, palyginti su MINST grupe. Konkrečiai, vidutinio dydžio kišenėse papildomų PACN taikymas lėmė vidutiniškai 0,5 mm didesnę PPD sumažėjimą vienam pacientui ($p < 0,05$), palyginti su gydymu vien MINST. Tačiau giliųjų kišenių atveju statistiškai reikšmingų skirtumų, vertinant vidutinį PPD vienam pacientui, tarp dviejų gydymo būdų nenustatyta.



3.2.2.1 pav. Klinikinis vaizdas prieš periodontologinį gydymą su proantocianidiniais



3.2.2.2 pav. Klinikinis vaizdas po periodontologinio gydymo su proantocianidiniais praėjus 8 savaitėms

Kraujavimo po zondavimo parametrų pokyčiai. Vidutinių ir gilių periodonto kišenių BOP dinamika pateikta lentelėje apačioje (3.2.2.2 lentelė).

3.2.2.2 lentelė. MINST ir MINST + PACN poveikis klinikiams parametrams

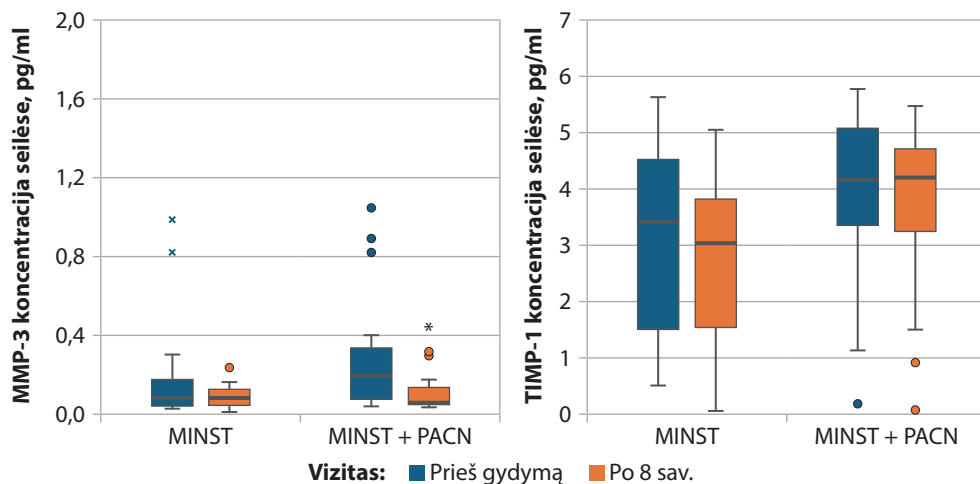
Parametro skirtumas po 8 sav. nuo pradinio matavimo			MINST (n = 23)	MINST + PACN (n = 23)	p
CAL, mm (vidurkis ± SD)	Vidutinio gylgio kišenės (4–6 mm)		2,5 ± 0,6	3,1 ± 0,6	0,002*
	Gilios kišenės (≥ 7 mm)		3,4 ± 1,0	3,7 ± 1,0	0,455*
PPD, mm (vidurkis ± SD)	Vidutinio gylgio kišenės (4–6 mm)		2,9 ± 0,6	3,4 ± 0,6	0,019*
	Gilios kišenės (≥ 7 mm)		5,0 ± 1,1	5,1 ± 1,2	0,805*
Proc. kišenių su PPD	Vidutinio gylgio kišenės (4–6 mm)		64,2 ± 23,4	55,6 ± 26,8	0,345 [†]
	Gilios kišenės	≥ 7 mm	17,2 ± 17,2	30,3 ± 19,7	0,030[†]
		≥ 5 mm	69,8 ± 17,6	88,1 ± 11,2	< 0,001[†]
		≥ 6 mm	37,4 ± 21,7	65,9 ± 23,0	< 0,001[†]
		≥ 7 mm	17,2 ± 17,2	30,3 ± 19,7	0,030[†]
		≥ 8 mm	9,4 ± 11,7	18,6 ± 15,8	0,029[†]
		≥ 9 mm	5,2 ± 10,6	5,1 ± 6,9	0,632 [†]
BOP, proc. (vidurkis ± SD)	Vidutinio gylgio kišenės (4–6 mm)		78,1 ± 28,5	66,2 ± 31,9	0,168 [†]
	Gilios kišenės (≥ 7 mm)		74,8 ± 32,5	64,0 ± 33,8	0,258 [†]
PI, proc. (vidurkis ± SD)	Vidutinio gylgio kišenės (4–6 mm)		46,6 ± 34,2	46,9 ± 43,9	0,783 [†]
	Gilios kišenės (≥ 7 mm)		53,5 ± 39,7	44,9 ± 46,4	0,663 [†]

Lentelėje pavaizduota klinikinių rodiklių skirtumas-prieš ir po gydymo. Palygintos MINST ir MINST + PACN grupės. CAL – klinikinis prisitvirtinimo lygis, PPD – zondavimo gylis, BOP – kraujavimas po zondavimo, PI – apnašų indeksas. Statistiškai reikšmingas rezultatai paryškinti. * Nepriklausomų imčių testas ($\alpha = 0,05$); [†] Nepriklausomų imčių Mann-Whitney testas ($\alpha = 0,05$).

Abu gydymo būdai turėjo teigiamą poveikį mažinant uždegimą vidutinio ir gilaus uždegimo kišenėse, nes paciento BOP rodikliai sumažėjo po 8 savaičių, palyginti su pradiniu lygiu. Paciento BOP sumažėjimas buvo statistiškai reikšmingas abiejose grupėse. Tačiau palyginus paciento BOP pokyčius vidutinio ir gilaus uždegimo kišenėse tarp grupių, reikšmingų skirtumų nenustatyta.

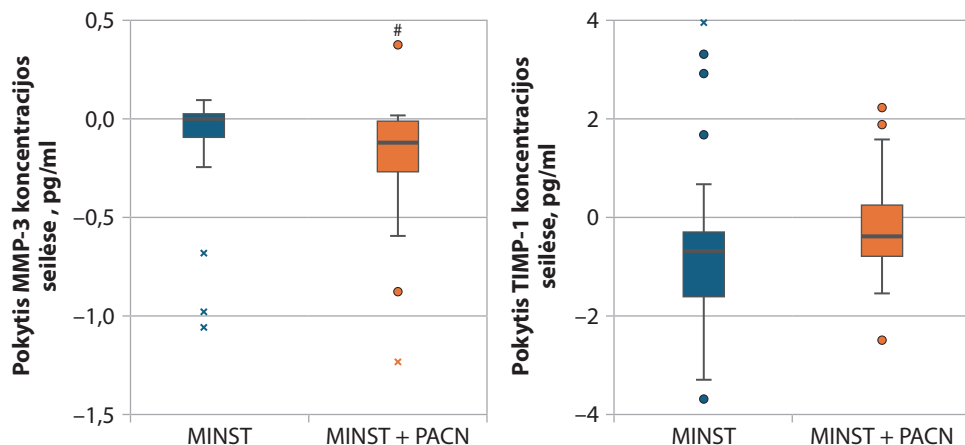
3.2.3. Biocheminių parametų pokyčiai

Biocheminio tyrimo tikslas buvo nustatyti, ar MMP-3 gali būti laikomas periodontito biožymeniu. MINST ir MINST + PACNs gydymo poveikis MMP-3 ir TIMP-1 kiekiui seilėse pateiktas vaizdinėmis priemonėmis (3.2.3.1 ir 3.2.3.2 pav.).



3.2.3.1 pav. Periodontologinio gydymo efektas MMP-3 ir TIMP-1 koncentracijai seilėse, pg/ml

* $p < 0,05$ priklausomų imčių Wilcoxon testas.



3.2.3.2 pav. MINST ir MINST + PACN gydymo efektas MMP-3 ir TIMP-1 kiekiui

$p < 0,05$ Mann-Whitney testas.

MMP-3 koncentracija MINST + PACNs grupėje po gydymo statistiškai reikšmingai sumažėjo, palyginti su pradiniu lygiu. MMP-3 koncentracija MINST grupėje po gydymo statistiškai reikšmingai nesiskyrė, palyginti su pradiniu lygiu. Po 8 savaičių nė vienoje grupėje nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingo TIMP-1 koncentracijos seilėse pagerėjimo, palyginti su pradiniu lygiu. Tyrimas parodė, kad MMP-3 reikšmės seilėse MINST + PACN grupėje sumažėjo labiau nei MINST grupėje, ir šis rezultatas yra statistiškai reikšmingas. TIMP-1 koncentracijos pokyčių analizė parodė, kad statistiškai reikšmingų TIMP-1 koncentracijos seilėse pokyčių tarp grupių pagerėjimų nebuvo.

3.2.4. Šalutinis poveikis

Per visą tyrimo laikotarpį nebuvo užfiksuotas joks neigiamas poveikis.

3.2.5. Ekonominiai svertai

Naudojome ekonomines prielaidas ir apskaičiavome PACN kaip produkto ekonomiškumą. Galima daryti prielaidą, kad pagalbinės medžiagos (pvz., chlorheksidino plėvelės, tetraciklino pluoštai) yra panašiai ekonomiškai efektyvūs kaip ir PACN hidrogelio plėvelės.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. Proantocianidinų poveikis periodonto audiniams

Literatūroje plačiai aptartas teigiamas proantocianidinų poveikis įvairiose medicinos srityse, tačiau šiame tyrime buvo analizuotas proantocianidinų poveikis ikiklinikiniuose tyrimuose su artimesnėmis periodonto audiniams ląstelėmis. Moksliniai tyrimai rodo, kad PACN, veikdami žmogaus dantenų ar periodonto raiščių fibroblastus, pasižymi citoprotekcinio poveikiu, padidina ląstelių proliferaciją ir migraciją bei padidina kolageno sintezę, kas patvirtina stiprias PSRE ląstelių apsaugines savybes [164, 165, 183]. Be to, kiti tyrimai rodo, kad PACN gali sumažinti kaulų rezorbciją [25, 184], pagerinti kaulinio audinio metabolizmą [185] ir padidinti kaulinio audinio regeneraciją [29, 30, 186–188], o tai yra pagrindiniai procesai, kurie vyksta periodonto audinių regeneracijoje. Kadangi periodonto raiščio kamieninės ląstelės gali diferencijuotis į osteoblastus, o PACN gali skatinti periodonto raiščio kamieninių ląstelių osteogenezę, PACN galėtų būti taikomi kraštinio kaulo regeneracijoje [148, 149, 186, 189]. Yra mokslinių įrodymų, kad PACN slopina osteoklastų formavimąsi ir diferenciaciją, skatindami osteoblastų diferenciaciją [190, 191]. Šio tyrimo rezultatai taip pat rodo, kad PACN gali sustiprinti ląstelių proliferaciją ir išsaugoti ląstelių gyvybingumą.

Proantocianidinų poveikio periodonto audiniams analizei buvo pasirinktos fibroblastų ląstelės. Kadangi periodonto regeneracija yra periodonto, apimančio alveolinį kaulą, periodonto raiščius ir šaknies cementą [192], atkūrimas, fibroblastai atlieka svarbų vaidmenį šiuose procesuose. Fibroblastai skatina žaizdų gijimą, audinių atstatymą, kolageno sintezę ir angiogenezę [193]. Fibroblastų proliferacija skatina naujų audinių formavimąsi ir pažeistų periodonto struktūrų atkūrimą, suteikdama pagrindą naujoms ląstelėms migruoti ir daugintis. Fibroblastų proliferacija yra labai svarbi kolageno sintezei, kuri yra pagrindinis tarpląstelinio matrikso komponentas, prisidedantis prie struktūrinio vientisumo, palengvinantis gijimą ir skatinantis periodonto audinių funkcinį atsistatymą, todėl yra būtinas klinikinei periodonto regeneracijai.

Atliekant proantocianidinų citotoksiškumo analizę, pastebėta, kad mažos ($< 100 \mu\text{g/ml}$) PSRE koncentracijos neturėjo įtakos ląstelių gyvybingumui, o didelės koncentracijos ($\geq 400 \mu\text{g/ml}$) stipriai veikė ląstelių gyvybingumą. Nustatyta, kad pusinė maksimali slopinanti koncentracija yra $583 \mu\text{g/ml}$. Ankstesniuose *in vitro* tyrimuose PACN koncentracijos buvo $10\text{--}50 \mu\text{g/ml}$ [161, 163, 194]. *In vitro* tyrimas su fibroblastais patvirtino, kad proantocianidinai neturėjo įtakos ląstelių gyvybingumui, esant mažesnei nei $100 \mu\text{g/ml}$ koncentracijai (po 24 val.) [20]. Remiantis šiais rezultatais, vėlesniuose

eksperimentuose naudotos PACN koncentracijos, ženkliai žemesnės nei IC50 vertė (50–100 µg/ml konc.), o tokios koncentracijos neturi įtakos ląstelių gyvybingumui.

Ikiklinikinėse studijose su ląstelėmis buvo analizuotas proantocianidinų antibakterinis poveikis. Didėjantis atsparumas antibiotikams, alternatyvių antimikrobinių junginių paieška tampa dideliu iššūkiu pasaulinei medicinai [195]. Nesugebėjimas įveikti greitai prisitaikančių patogenų nepadarius didelės žalos sveikatai yra pagrindinis iššūkis gydant lėtines infekcines- uždegimines ligas, įskaitant periodontitą [196]. Progresuojantis bakterijų sukeltas uždegiminis atsakas nuolat pažeidžia periodonto audinius, todėl jie tampa jautresni žalingam antibiotikų ir antimikrobinių cheminių medžiagų poveikiui [9, 197]. Žalingą efektą dar labiau padidina gydymo sukeltas naudingų komensalių bakterijų praradimas [198]. Tai tik parodo, kad reikėtų persvarstyti alternatyvių gydymo strategijų galimybes, pavyzdžiui kaip specifines patogenus veikiančias bakterijų padermes [199] arba augalinės kilmės antibakterinių vaistų naudojimą. Tokioms strategijoms būdingas mažesnis šalutinis poveikis, mažesnė atsparumo išsivystymo rizika, taip pat sudėtingos priešuždegiminės ir audinių atsinaujinimą stimuliuojančios savybės.

Nagrinėjant antibakterines ir priešuždegimines PSRE ekstrakto ir iš PSRE gauto PACN savybes, pastebėta, kad PACN pasižymi stipresnėmis antioksidacinėmis ir antibakterinėmis savybėmis, palyginti su PSRE [141, 200]. Tiek PSRE, tiek PACN veiksmingai mažina pasirinktų padermių metabolinį aktyvumą, o tai rodo platų antibakterinių savybių spektrą. Tai atitinka ankstesnius įrodymus apie įvairius iš *P. sidoides* šaknų pagamintus ekstraktus. Pavyzdžiui, vandeninis-etanolinis *P. sidoides* EPs® 7630 (Umckaloabo®) ekstraktas slopina *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus epidermidis* ir kai kurių kitų gramneigiamų ir gramteigiamų bakterijų padermių augimą [201]. Vandeninis-acetoninis PSRE veiksmingai mažina antibiotikams atsparių *S. aureus* padermių augimą [202]. Šiame tyrime pirmą kartą pademonstruotas PSRE ir PACN efektyvumas slopinant *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, vieno svarbiausių gramneigiamų anaerobinių periodonto patogenų, augimą [203]. Panašiai kaip ir anksčiau parodytu *P. gingivalis* atveju [141], PACN pasižymėjo žymiai didesniu toksiškumu *A. actinomycetemcomitans*, palyginti su PSRE poveikiu: 50 µg/ml PACN sumažino *A. actinomycetemcomitans* metabolinį aktyvumą beveik 10 kartų labiau, palyginti su PSRE. Ta pati koncentracija neturėjo reikšmingo toksiškumo kitoms tirtoms padermėms. Minimalus PACN kiekis, turintis reikšmingą poveikį *E. coli* ir *S. aureus* metabolismui, buvo 80 µg/ml, o *S. epidermidis* reikšmingas toksiškumas prasidėjo nuo 70 g/ml PACN. Rezultatai rodo, kad gali būti specifinė proantocianidinų iš

PSRE sąveika su pagrindinėmis patogeninėmis padermėmis (*P. gingivalis* ir *A. actinomycetemcomitans*), atsakingomis už periodontito išsivystymą. Padermėms specifiską proantocianidinų aktyvumą jau pastebėjo ir kiti autoriai. Lacombe ir Wu apžvalgoje analizuojamas selektyvus patogenus slopinantis ir komensalinės padermės skatinantis proantocianidinų, gautų iš įvairių uogų, aktyvumas [204]. Kita vertus, PSRE buvo veiksmingesnis už PACN slopinantis abi šiame tyrime tirtas *Staphylococcus* padermės, o tai rodo, kad prieš šias bakterijas veikė ne tik proantocianidinų frakcijos junginiai. Labiausiai tikėtina, kad išskirtinį PSRE antibakterinį aktyvumą galima priskirti ir kitiems fenoliniams junginiams, tokiems kaip fenolio rūgštys, flavonoliai, flavan-3-oliai [92].

Tačiau, nepaisant daugelio publikacijų, kuriose pranešama apie selektyvų natūralių ekstraktų aktyvumą prieš patogenines ir nepatogenines padermes, vis dar nėra iki galo aišku, kaip vyksta šis mechanizmas [205]. Manoma, kad pagrindinis proantocianidinų veikimo mechanizmas yra susijęs su NF-κB (pagrindinės prouždegiminės signalizavimo sistemos) signaliniu keliu. Tyrimai rodo, kad proantocianidinai gali trikdyti adheziją prie šeimininko ląstelių, imituodami ląstelių paviršiaus signalizaciją [206]. Kai kurie autoriai iškėlė hipotezę, kad proantocianidinai gali padidinti bakterijų membranos pralaidumą ir sukelti netiesioginį metabolizmo sumažėjimą dėl ATP ir kitų tarpląstelių metabolitų praradimo [205, 207]. Atlikti tyrimai rodo, kad proantocianidinai gali sustiprinti antibiotikų poveikį, veikdami slopinant du atsparumo antibiotikams mechanizmus: selektyvų membranos pralaidumą ir daugelio vaistų išstūmimo siurblius (angl. *multidrug efflux pump*) [208]. Taigi, transmembraninės pernašos trikdymas iš tiesų gali būti bakteriotoksiškumo priežastis. Vis tik norint išsiaiškinti proantocianidinų veikimo mechanizmą prieš patogenines bakterijų padermes, reikalinga atlikti daugiau tyrimų.

Laboratoriniai tyrimai (tiek fluorescentinė analizė su pelių dantenų fibroblastais, tiek „lenktynių dėl paviršiaus“ modelio tyrimas su žmogaus dantenų fibroblastais) parodė, kad 100 µg/ml PSRE arba PACN įvedimas į terpę veiksmingai išsaugojo dantenų fibroblastų gyvybingumą, esant bakterijų lipopolisacharidui. Kiti tyrimai antrina, kad proantocianidiniais padengti paviršiai išsaugo ląstelių gyvybingumą, tuo pačiu mažindami bakterijų adheziją [209]. Šis efektas yra aiškinamas proantocianidinų gebėjimu mažinti bakterijų prisitvirtinimą ir bioplėvelės susidarymą. Eksperimentiniame modelyje panašus efektyvumas buvo pasiektas naudojant PSRE ir PACN tirpalus, o tai rodo, kad tirpių junginių sąveika su bakterijų sienelėmis taip pat gali turėti įtakos bakterijų adhezijai ir ląstelių apsaugai. Šie rezultatai rodo, kad natūralios kilmės ekstraktai gali būti veiksmingai pritaikomi, kaip alternatyvus

antibakterinis junginys, galintis suteikti ir organizmo ląsteles apsaugantį efektą.

Nagrinėjant ląstelių apoptozės mechanizmus, tyrimai parodė, kad tiek PSRE, tiek PACN preparatai veiksmingai apsaugo dantenų fibroblastus nuo ląstelių nekrozės ir apoptozės. Tiek PSRE, tiek PACN veiksmingai slopina LPS sukeltą apoptozės proteazių aktyvumą. Tiek PSRE, tiek PACN veiksmingiau mažino vykdančiosios kaspazės-3 aktyvumą, palyginti su iniciatoriaus kaspazės-8 aktyvumu. PACN buvo veiksmingesnis slopinant kaspazės-8 aktyvumą nei PSRE, todėl PACN yra galingesnis apoptozės slopintojas ankstyvosiose stadijose. Proantocianidinų iš vynuogių sėklų antiapoptotinis aktyvumas, įskaitant vykdančių kaspazių-3 ir 9 sumažėjimą, buvo pastebėtas rotenono sukulto SH-SY5Y ląstelių neurotoksiškumo modelyje [210]. Įdomu, kad tyrimuose su kancerogeninėmis ląstelėmis stebimas priešingas efektas. Žmogaus kolorektalinės karcinomos ląstelių HCT-116 veikimas proantocianidiniais iš to paties šaltinio reikšmingai padidino kaspazę-2, kaspazę-3 ir kaspazę-9 koduojančių mRNR ekspresiją [211]. Kitame tyrime analizuojama apoptozės indukcija plaučių vėžio ląstelėse NCI-H460, stimuliuojant kaspazę-3 ir mitochondrijų citochromo c išsiskyrimą galio rūgštimi, viena iš svarbių PSRE sudedamųjų dalių [212]. Tokie prieštaringi duomenys rodo, kad PSRE ir PACN poveikis apoptozės signalizacijos keliams priklauso nuo ląstelių tipo ir jie gali turėti priešingą poveikį vėžinėse ir normaliose ląstelėse, taip pat skirtinguose toksiškumo modeliuose.

Uždegiminių citokinų sekrecijos vertinimas yra svarbus elementas periodonto mechanizmo analizėje. Tyrimai parodė, kad tiek PSRE, tiek PACN slopina uždegiminių procesus, mažindami citokinų sekreciją. Kadangi PGE2 yra ryškiausias periodonto patogenezeje iš prostaglandinų [213, 214] bei dalyvauja uždegimo mediatorių ir MMP stimuliavime, osteoklastų formavime per branduolinio faktoriaus B ligando receptoriaus aktyvatorių (RANKL) [214, 215], jo analizė yra labai svarbi nagrinėjant periodonto patogenezės mechanizmus. IL-6 ir IL-1 taip pat yra labai svarbūs, kadangi tarpininkauja kaulų rezorbcijoje per osteoklastų aktyvacijos mechanizmą [216]. Slopinant šiuos uždegimo kelius, tikimasi, kad PSRE ir PACN žymiai pagerins periodonto audinių būklę ir sveikatą. PSRE ir PACN sumažino IL-6 išsiskyrimą iš žmogaus periferinio kraujo mononuklearinių ląstelių, bei IL-8 ir PGE2 išsiskyrimą iš dantenų fibroblastų. Panašus PSRE prieš uždegiminis aktyvumas kartu su *Coptis chinensis* šaknų ekstraktu buvo parodytas LPS stimuliuojamose RAW264.7 ląstelėse [217]. Nors tyrimuose atskleistos PACN ir PSRE prieš uždegiminės savybės buvo panašaus lygio, PACN veiksmingiau slopino kaspazių ir uždegimo mediatorių išsiskyrimą. Manoma, kad stipresnis PACN prieš uždegiminis aktyvumas gali būti susijęs su struktūriniais ypatumais.

Šiame tyrime taip pat buvo atlikta proantocianidinų ir chlorheksidino digliukonato poveikio dantenų fibroblastams lyginamoji analizė. Šiame tyrime nustatyta, kad maža PSRE koncentracija (25 µg/ml) sukėlė didesnę HGF-1 ląstelių proliferacijos lygį, palyginti su didesnėmis koncentracijomis (100 µg/ml ar didesnė). Tyrimai parodė, kad chlorheksidino digliukonatas (aukso standartas periodonto ligų gydyme) visiškai slopino ląstelių proliferaciją. Kiti *in vitro* tyrimai patvirtino, kad chlorheksidino digliukonato vartojimas gydymo metu gali turėti neigiamą ilgalaikį poveikį dėl nustatyto citotoksinio poveikio burnos ertmės ląstelėms [5–7, 218, 219]. Po periodonto gydymo procedūrų labai svarbu sukurti tinkamą aplinką gijimui. PACN galėtų būti naudojami kaip chlorheksidino alternatyva gydant periodonto ligas ne tik dėl panašaus antibakterinio poveikio burnos ertmės mikroorganizmams [162], bet ir dėl stebimo fibroblastų proliferacinio efekto, kas itin svarbu periodonto audinių regeneracijoje.

Šiame tyrime taip pat buvo atlikta proantocianidinų proliferacinio potencialo žmogaus dantenų ir periodonto raiščio fibroblastams analizė, nagrinėjanti TGF-β1 kiekį. Rezultatai parodė, kad veikiant PSRE TGF-β1 kiekis buvo žymiai didesnis nei kontrolinėje grupėje. Moksliniai tyrimai patvirtina, kad PACN gali padidinti TGF-β1 kiekį [116], kuris vėliau gali stimuliuoti fibroblastų proliferaciją [117–121]. Tokiu būdu PACN gali apsaugoti ląsteles, reguliuoti ląstelių proliferaciją, stimuliuoti ląsteles kolageno sintezės metu, o tai atsispindi ir šio tyrimo rezultatuose.

Apibendrinant, laboratoriniai tyrimai patvirtino, kad PSRE ir PACN geba išsaugoti fibroblastų ląstelių gyvybingumą, esant bakterinei infekcijai, bei pasižymi patogenams selektyviu antibakteriniu poveikiu. Iiklinikiniai tyrimai patvirtino, kad PSRE ir PACN mažina uždegiminių mediatorių sekreciją, geba slopinti ląstelių apoptozę, esant bakterinei infekcijai. Rezultatai parodė, kad santykinai mažos PSRE ir PACN koncentracijos skatino HGF-1 ir HPDLF fibroblastų proliferaciją, priešingai nei chlorheksidino digliukonatas, kuris parodė citotoksinį poveikį.

4.2. Proantocianidinų klinikinis poveikis

Šiame tyrime buvo vertinamas PACN poveikis generalizuoto periodontito gydymui, analizuojant klinikinius ir imunologinius parametrus. Papildomas PACN vartojimas parodė statistiškai reikšmingai didesnę PPD sumažėjimą vidutinio gylio periodonto kišenėse. Šis klinikinis tyrimas yra pirmasis atsitiktinės imties kontroliuojamas klinikinis tyrimas, skirtas įvertinti lokaliai išskiriamų PACN veiksmingumą gydant generalizuotą periodontitą. Iki šiol tik dviejuose klinikiniuose tyrimuose buvo atliktas sistemiskai vartojamų

PACN maisto papildų klinikinio poveikio periodonto sveikatai tyrimas [169, 175]. Vieno tyrimo metu sistemškai vartojami PACN sumažino kultivuojamų bakterijų skaičių ir statistiškai reikšmingai pagerino klinikinius matavimus (PPD, dantenų kraujavimo indeksą) [175]. Kitame tyrime PACN maisto papildas pagerino periodonto sveikatą (mažino dantenų kraujavimo ir minkštų apnašų ant dantų indeksą eksperimentinėje grupėje) [169].

Klinikiniai tyrimai, kuriuose buvo tiriamas nechirurginis periodonto gydymas kartu su papildomais lokaliai naudojamais preparatais, patvirtino, kad lokaliai skiriami preparatai duoda papildomą naudą klinikiniams rodikliams [220]. Tyrimai parodė, kad papildomas vietinių antibiotikų vartojimas nechirurginio periodonto gydymo metu parodė statistiškai reikšmingą PPD sumažėjimą 0,37 mm, lyginant su kontroline grupe [91]. Remiantis naujausiais tyrimais, papildomas lokaliai skiriamas natrio hipochlorito gelio naudojimas MINST metu lėmė papildomą PPD sumažėjimą 0,5 mm ($p = 0,001$) [221]. Panašus klinikinis efektyvumas nustatytas ir šiame klinikiniam tyrime: papildomas PACN vartojimas lėmė papildomą PPD sumažėjimą vidutinio dydžio periodonto kišenėse vidutiniškai 0,5 mm ($p < 0,05$), palyginus su podanteniniu instrumentavimu be PACN. Šio klinikinio tyrimo rezultatai neparodė statistiškai reikšmingų BOP skirtumų tarp MINST ir MINST + PACN grupių. Kolageno hidrogeliai išskiria veikliąją medžiagą (PACN) ir gana greitai ištirpsta periodonto kišenėse (rezorbcijos greitis paprastai trunka ≥ 4 savaites) [222]. Nepriklausomai nuo gydymo grupės (MINST arba MINST + PACN), vėlesni gijimo proceso etapai gali vykti panašiai ir todėl duoti panašius rezultatus (BOP vertes). Šis tyrimas rodo, kad abi gydymo strategijos gali padėti sumažinti uždegimą ir pagerinti periodonto sveikatą pagal BOP vertes.

Nechirurginio periodonto gydymo teigiamus rezultatus gali atspindėti ir biocheminiai rodikliai, aptinkami seilėse ar dantenų vagelės skystyje. MMP yra viena iš svarbiausių proteinazių, atsakingų už tarpląstelinės matricos komponentų hidrolizę, audinių pertvarkymą, žaizdų gijimą ir angiogenezę. MMP gali skaidyti beveik visus tarpląstelinės matricos ir bazinės membranos junginius, o jų perteklinis aktyvumas gali sukelti periodonto audinių irimą [223]. MMP paprastai žinomi kaip audinių pertvarkymo fermentai, kurie aktyvuojami uždegiminio atsako metu [224]. Iki klinikinių tyrimų parodė, kad PACN slopina MMP gamybą [137, 139, 225]. Klinikiniuose tyrimuose pastebėta, kad aukštesni MMP-3 ir TIMP-1 kiekiai teigiamai koreliavo su klinikiniais parametrais ir buvo susiję su reikšmingai didesne periodonto ligos progresavimo rizika [68, 73, 226, 227]. MMP-3 kiekio teigiama koreliacija su klinikiniais parametrais atsispindėjo ir šiame klinikiniam tyrime: MMP-3 koncentracija MINST + PACN grupėje po gydymo statistiškai reikšmingai sumažėjo, lyginant su MMP-3 koncentracija prieš gydymą. Taip pat

MMP-3 reikšmės MINST + PACN grupėje sumažėjo labiau nei MINST grupėje. Biocheminiai MMP-3 svyravimai parodo, kad PACN geba užtikrinti uždegiminių mediatorių kiekio sumažėjimą periodontito gydymo atvejais. Kiti klinikiniai tyrimai parodė, kad MMP-3 ir TIMP-1 lygiai gali būti papildomas periodonto sveikatos vertinimo parametras [70]. Tyrimai parodė, kad santykinai mažas MMP-3 lygis dantenų vagelės skystyje kelia klausimą, ar šis biocheminis žymuo yra pakankamai jautrus ir specifiškas, kad būtų galima įvertinti periodonto ligos progresavimą [71]. Klinikiniai tyrimai rodo, kad MMP-3 ir TIMP-1 vertės gali būti naudojamos kaip rodiklis vertinant periodonto sveikatos būklę [62, 72–74].

Apibendrinant, papildomas PACN vartojimas kartu su podanteniniu instrumentavimu skatino papildomą teigiamą poveikį klinikiniams ir imunologiniams parametrams. Klinikinis tyrimas patvirtino, kad MMP-3 kiekis seilėse yra reikšmingas žymuo, susijęs su lėtinės periodonto infekcijos sunkumu, ir gali atspindėti periodonto audinių būklę.

Apžvelgiant tiek ikiklinikinių tyrimų, tiek klinikinio tyrimo rezultatus galima apibendrinti, kad proantocianidinai turi teigiamą poveikį tiek periodontą imituojančiomis sąlygomis, tiek klinikinėje praktikoje. Stiprių patogenams selektyvių antibakterinių savybių, priešuždegiminio ir dantenų audinius apsaugančio poveikio derinys rodo, kad proantocianidinų turintys preparatai gali būti potencialus kandidatas periodonto ligų gydymui ir profilaktikai.

IŠVADOS

1. Įvertinus proantocianidinų, bakterijų bei ląstelių sąveikos tyrimus, nustatyta, kad proantocianidinai pasižymi selektyviu antibakteriniu poveikiu prieš periodonto patogeninę mikroflorą (*A. actinomycetemcomitans*), išsaugant nepatogeninę mikroflorą *in vitro* tyrimuose.
2. Atlikus proantocianidinų, bakterijų bei ląstelių sąveikos tyrimus, nustatyta, kad proantocianidinai išsaugojo ląstelių gyvybingumą, mažindami bakterijų proliferaciją, bei slopino uždegiminių mediatorių išskyrimą.
3. Įvertinus proantocianidinų ir chlorheksidino digliukonato poveikio lyginamąją analizę, nustatyta, kad mažos proantocianidinų koncentracijos skatino dantenų ir periodonto plyšio fibroblastų proliferaciją, priešingai nei chlorheksidino digliukonatas, kuris turėjo citotoksinį poveikį.
4. Atlikus proantocianidinų proliferacinio poveikio analizę, nustatyta, kad proantocianidinai stimulavo dantenų ir periodonto plyšio fibroblastų proliferaciją.
5. Papildomas proantocianidinų panaudojimas konservatyvaus periodontito gydymo metu nulėmė klinikinių rodiklių (periodonto kišenių zondavimo gylio) sumažėjimą, palyginus su konservatyviu periodontito gydymu.
6. Papildomas proantocianidinų panaudojimas konservatyvaus periodontito gydymo metu nulėmė papildomą biocheminių rodiklių (MMP-3 kiekio seilėse) sumažėjimą, palyginus su konservatyviu periodontito gydymu.

SUMMARY

INTRODUCTION

Periodontitis is a chronic inflammatory disease that leads to the destruction of the tissues surrounding the teeth (the periodontium). Severe forms of periodontitis affect over 1 billion individuals, with a disease prevalence of 12.5% [1]. Scientific literature predicts that by 2050, more than 1,5 billion people (+44.32%) will suffer from severe periodontitis, and this condition will become one of the most prevalent diseases worldwide [1]. Periodontal diseases are not only the leading cause of tooth loss but also a major public health concern, posing both social and economic burdens [2, 3].

The primary method of managing this disease is conservative periodontal therapy [4]. During conservative treatment, topical agents may be utilized to further improve clinical parameters, potentially avoid the need for future surgical intervention, and maintain periodontal tissue health. To achieve an adjunctive therapeutic effect, topical agents such as local antiseptics or antibiotics can be administered [4]. The use of widely prescribed, highly potent chemical agents (e.g., chlorhexidine digluconate solutions) during treatment must be carefully evaluated, as they may have adverse long-term effects due to their established cytotoxic impact on oral mucosal cells [5–7]. The use of antibiotics in periodontitis treatment is controversial and recommended only in exceptional cases [4, 8]. In addition to the expected benefits of antibiotics, a negative side effect is observed: growing bacterial antibiotic resistance [9]. Long-term and recurrent systemic or local antibiotic therapy not only fails to ensure sustainable disease remission but also increases the risk of disease recurrence and progression. The uncontrolled selective pressure of antimicrobial agents promotes the targeted evolution of resistance in periodontal pathogens. Within microorganisms, diverse molecular resistance mechanisms are activated, including the modification of target structures, the synthesis of drug-inactivating enzymes, decreased permeability of the outer cell wall and membranes, and the active excretion of xenobiotics via efflux pumps [10, 11]. Another critical consequence of this therapeutic modality is its non-selective impact on the oral microbiome. Commensal bacterial strains play a fundamental role in maintaining oral mucosal homeostasis and colonization resistance [12]. The administration of traditional broad-spectrum antibiotics induces profound microbial dysbiosis, which eradicates the protective autochthonous microflora, thereby paradoxically creating favorable conditions for recolonization by opportunistic pathogens.

Modern antibacterial agents utilized in periodontal therapy should exert their antimicrobial effects through mechanisms distinct from those of traditional antibiotics. Furthermore, they must exhibit selective toxicity, specifically targeting periodontal pathogens while preserving commensal bacterial strains and host oral cavity cells. Proanthocyanidins, a plant-derived multi-component compound, possess these precise therapeutic properties.

Various natural sources of proanthocyanidins (PACNs), such as grape seeds, cranberries, and blueberries [13], are documented in the literature; however, this study focuses primarily on *Pelargonium sidoides* root dry extract (PSRE), in which PACNs serve as the principal constituents responsible for the extract's therapeutic activity [14]. *Pelargonium sidoides* DC is a perennial herbaceous plant belonging to the Geraniaceae family, native to South Africa. The dry root extract of *Pelargonium sidoides* DC. is a complex matrix of natural chemical compounds comprising both primary metabolites (carbohydrates, amino acids, peptides, and minerals) and secondary metabolites, predominantly proanthocyanidins [14, 15]. Approximately 40% of the dry weight of PSRE can be attributed to oligomers of the proanthocyanidin family, which are chiefly composed of gallocatechin and epigallocatechin derivatives [14].

Proanthocyanidins (PACNs), plant-derived compounds belonging to the flavonoid family, are well-recognized for their numerous beneficial biological properties, including the maintenance of periodontal and peri-implant tissue health [16, 17]. PACNs are distributed across various botanical sources, including fruits, leaves, roots, and seeds. The chemical architecture of PACNs is fundamentally determined by the specific plant species utilized for fractional isolation [18]. These structural variations can profoundly influence their binding affinity to specific receptors, which in turn modulates their intracellular and tissue-level activity, as well as their overall therapeutic efficacy. Consequently, the distinct phytochemical profile of PACNs directly dictates their biological activities, such as antioxidant and anti-inflammatory effects. Elucidating these structural nuances is therefore critical for optimizing their clinical application. The anti-inflammatory [19, 20], antibacterial [21], and antioxidant [22–24] properties of PACNs are extensively documented. Previous studies have demonstrated that PACNs can attenuate alveolar bone loss [17, 25, 26], inhibit collagen degradation [27, 28], accelerate bone regeneration [29–31], and enhance the osseointegration of dental implants [32]. These therapeutic capacities are pivotal for optimizing the healing cascade and promoting the neoformation of periodontal structures, ultimately ensuring successful periodontal and peri-implant tissue regeneration.

Although recent literature increasingly documents the therapeutic potential of proanthocyanidins in dentistry, the scientific landscape still lacks systematic laboratory evidence and validated randomized controlled clinical trials required to unequivocally substantiate the biochemical and clinical efficacy of standardized *Pelargonium sidoides* proanthocyanidin fractions. Researchers' findings remain fragmented due to the chemical heterogeneity of proanthocyanidins, which restricts the integration of scientifically validated, topically administered phytopreparations into routine periodontal treatment protocols. Therefore, an analysis of the interaction mechanisms between proanthocyanidins, bacteria, and gingival cells was undertaken using *Pelargonium sidoides* DC. root dry extract to elucidate its biochemical impact on periodontal tissues. Furthermore, a double-blind, randomized controlled clinical trial was conducted to evaluate the clinical impact of this phytotherapeutic substance when adjunctively utilized during conservative periodontal therapy.

This work analyzes the selective antibacterial efficacy of proanthocyanidins (derived from *Pelargonium sidoides* DC. root dry extract) against periodontal pathogenic microflora, as well as their beneficial cytoprotective and proliferative effects on gingival cells. Notably, this study represents the first randomized controlled clinical trial to evaluate the effects of *Pelargonium sidoides* DC. root dry extract-derived proanthocyanidins, demonstrating a positive clinical outcome when adjunctively utilized during conservative periodontal therapy. In conclusion, the integration of proanthocyanidin-containing formulations into periodontal therapy is highly advantageous for preventing disease progression in its early stages, reducing the necessity for subsequent surgical intervention, lowering treatment costs, and preserving periodontal health during supportive periodontal therapy.

Aim and objectives of the study

Aim of the Study

To investigate the therapeutic potential of proanthocyanidins (derived from *Pelargonium sidoides* DC root dry extract) in the management of periodontitis.

Objectives of the Study

1. To evaluate the antibacterial efficacy of proanthocyanidins against various bacterial strains;
2. To assess the impact of proanthocyanidins on cellular metabolism during bacterial infection;
3. To compare the effects of proanthocyanidins and chlorhexidine digluconate on periodontal health;
4. To evaluate the proliferative potential of proanthocyanidins in periodontal tissues;
5. To determine whether the adjunctive use of proanthocyanidins during conservative periodontal therapy yields an additive improvement in clinical parameters compared to conservative periodontal therapy alone;
6. To determine whether the adjunctive use of proanthocyanidins during conservative periodontal therapy yields an additive improvement in biochemical parameters compared to conservative periodontal therapy alone.

Scientific novelty of the work

Scientific literature still lacks sufficient data regarding the therapeutic application of proanthocyanidins derived from *Pelargonium sidoides* DC root dry extract for the treatment of periodontitis.

The results of the preclinical laboratory investigations demonstrated that proanthocyanidins (derived from *Pelargonium sidoides* DC root dry extract) possess selective antibacterial efficacy, specifically targeting the periodontal pathogenic microflora (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) while simultaneously preserving the commensal microflora. These findings possess the potential to shift the paradigm regarding the conventional use of antibiotics in the management of bacterial diseases, including periodontitis.

Preclinical studies indicated that proanthocyanidins can preserve cell viability during bacterial infection, a phenomenon characteristically observed in periodontitis. The investigations confirmed that proanthocyanidins suppress the secretion of inflammatory mediators and inhibit cellular apoptosis under bacterial challenge, thereby demonstrating a potent anti-inflammatory effect. This capacity may be highly beneficial for maintaining the therapeutic outcomes achieved during supportive periodontal therapy.

Furthermore, the preclinical results revealed that relatively low concentrations of proanthocyanidins stimulated the proliferation of human gingival and periodontal ligament fibroblasts. In contrast, chlorhexidine digluconate exhibited pronounced cytotoxic effects. This specific attribute could be

exceptionally advantageous in clinical practice, as it not only ensures an antimicrobial impact on periodontal tissues but also establishes a favourable microenvironment for their subsequent regeneration.

To date, no randomized controlled clinical trial has investigated the clinical efficacy of proanthocyanidins derived from *Pelargonium sidoides* DC. root dry extract in conservative periodontal therapy. The results of the present study demonstrated that the local application of proanthocyanidins as an adjunct to non-surgical periodontal treatment yields statistically significant improvements in clinical parameters – specifically pocket depth (PD) and clinical attachment level (CAL) – compared to the current “gold standard” therapy, which consists of subgingival instrumentation alone. This incremental improvement in clinical parameters has the potential to reduce the necessity for surgical interventions in the future. Furthermore, the adjunctive administration of proanthocyanidins alongside subgingival instrumentation exerted a beneficial effect on both clinical and immunological outcomes. Biochemical analysis corroborated that salivary matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) levels serve as a significant biomarker associated with the severity of chronic periodontal infection, accurately reflecting the pathological status of periodontal tissues.

Owing to their anti-inflammatory, cytoprotective, and pro-proliferative activities, proanthocyanidins represent an innovative therapeutic modality for the management of periodontal diseases. These compounds exhibit a unique antimicrobial capacity to selectively target Gram-negative periodontal and peri-implant pathogens while preserving the commensal organisms of the oral microbiota. This discovery holds significant promise for advancing the paradigm of personalized medicine.

Clinical relevance

The application of proanthocyanidins as an adjunct to non-surgical periodontal therapy yields statistically significant improvements in clinical parameters – specifically reducing periodontal pocket depth (PD), bleeding on probing (BOP), and clinical attachment level (CAL) values – compared to subgingival instrumentation alone. This incremental improvement in clinical parameters can potentially avert the necessity for future surgical interventions during long-term supportive periodontal therapy.

1. MATERIAL AND METHODS

To evaluate the effects of PACNs and PSRE, both preclinical investigations and a clinical trial were conducted (Fig. 1.1).

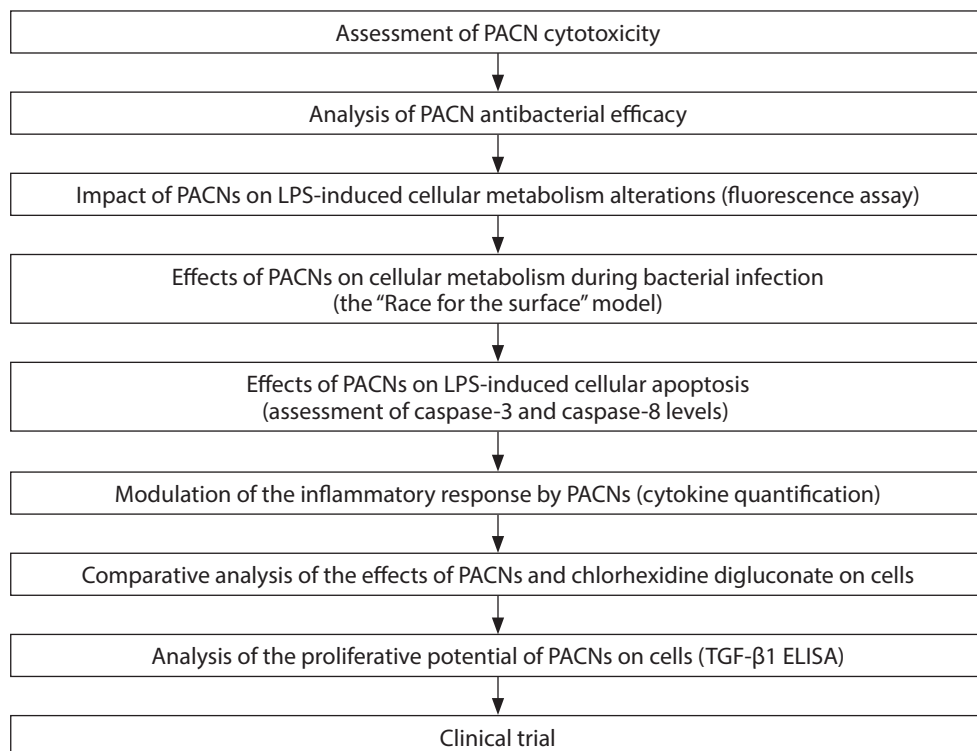


Fig. 1.1. Preclinical investigations and a clinical trial were conducted

1.1. Preclinical investigations

Preclinical investigations were conducted utilizing *Pelargonium sidoides* DC root dry extract (PSRE) and proanthocyanidins isolated from the PSRE extract. During the preclinical phase, the cytotoxicity of proanthocyanidins toward human gingival fibroblasts was evaluated, and their antibacterial efficacy was analysed. Broad-spectrum pathogens and commensal microorganisms, including strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Escherichia coli*, were utilized for the laboratory assays.

To elucidate the effects of proanthocyanidins on gingival fibroblast metabolism during bacterial infection, fluorescence analysis and the “race for the surface” model investigations were performed. To analyse the impact of proanthocyanidins on cellular apoptotic mechanisms against a background of

bacterial infection, caspase levels were quantified. Furthermore, the levels of cytokines were measured to analyse the modulation mechanisms of the inflammatory response by proanthocyanidins during bacterial challenge. To compare the effects of proanthocyanidins versus chlorhexidine digluconate on gingival fibroblasts, a comparative analysis was executed. Finally, to evaluate the proliferative potential of proanthocyanidins, their impact on human gingival and periodontal ligament fibroblasts was investigated.

1.1.1. Isolation of proanthocyanidins

Pelargonium sidoides root extract (PSRE) was purchased from Frutarom Switzerland Ltd., Rutiwisstrasse 7, CH-8820, Wädenswil (batch No. 0410100). The purification of proanthocyanidins was performed according to the methodology described by Hellström [178].

Quantitative analysis of the proanthocyanidins was performed. The total proanthocyanidin content isolated from the Pelargonium sidoides DC root dry extract was determined spectrophotometrically using the para-dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) reagent, with absorbance measured on a spectrophotometer (Spectronic CamSpec M550, United Kingdom). The yield of the lyophilized PACN fraction was 1.37 ± 0.07 g, indicating that approximately 34.25% of proanthocyanidins were isolated from the Pelargonium sidoides DC root dry extract.

1.1.2. Bacterial strains and cultivation methodology

Strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Escherichia coli* were utilized for the experiments. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 43300), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*, ATCC 33384), and *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC BAA-1427) strains were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, MA, USA) and cultured in accordance with the manufacturer's instructions.

1.1.3. Murine gingival fibroblasts

All experimental procedures were conducted in strict accordance with the Law on the Welfare and Protection of Animals of the Republic of Lithuania (State Food and Veterinary Service permit for laboratory animal testing No. G2-80). The animals were housed and cared for at the animal facility of the Lithuanian University of Health Sciences, and the study was executed in compliance with the ARRIVE guidelines for preclinical animal research. Primary gingival fibroblasts were isolated from the gingival tissues of P5–7 rat pups. Following isolation, the cells were cultured in 75 cm² flasks

in high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 10% fetal bovine serum (FBS), and penicillin/streptomycin (Pen/Strep). Upon reaching 70–90% confluence, the cells were detached using 0.025% trypsin/EGTA and seeded into 96-well plates at a density of 2×10^5 cells/well.

1.1.4. Human gingival fibroblast cell line and cultivation methodology

Human gingival fibroblast cells (HGF-1) were purchased from the ATCC (Virginia, USA) and cultured in accordance with the manufacturer's recommendations. The cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) in an incubator at 37 °C under a humidified atmosphere of 5% CO₂. For the experimental assays, the cells were seeded into 96-well plates at a density of 5,000 cells per well (Fig. 1.1.4.1).

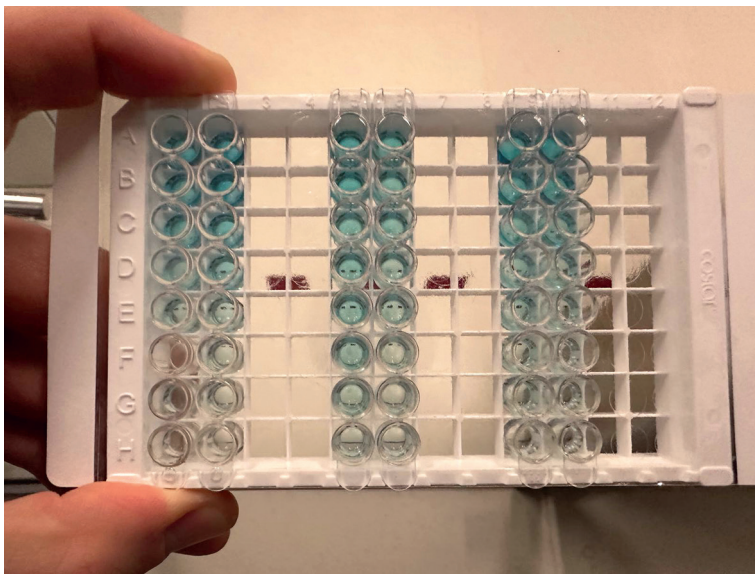


Fig. 1.1.4.1. Experimental setup for cell seeding

1.1.5. Human periodontal ligament fibroblast cell line and cultivation methodology

Human periodontal ligament fibroblast cells (HPDLF) were purchased from the ATCC (Virginia, USA) and cultured in accordance with the manufacturer's recommendations (Fig. 1.1.5.1). The cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) in an incubator at 37 °C under a humidified atmosphere

of 5% CO₂. For the experimental assays, the cells were seeded into 96-well plates at a density of 5,000 cells per well.

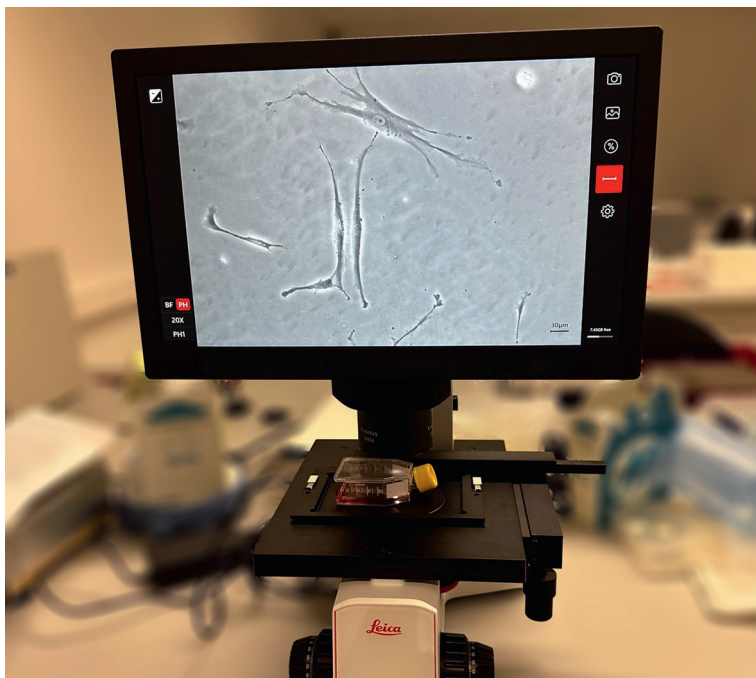


Fig. 1.1.5.1. Microscopic appearance of fibroblasts

1.1.6. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purchased from the ATCC (ATCC® PCS-800-011, Manassas, Virginia, USA). The cells were cultured at a density of $3,3 \times 10^6$ cells/mL in 12-well plates utilizing RPMI medium supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics.

1.1.7. Assessment of PACN cytotoxicity

The half-maximal inhibitory concentration IC₅₀ of PSRE was determined. The IC₅₀ value represents the concentration at which 50% cell mortality is induced. PSRE (dissolved in a 30% polyethylene glycol solution) was diluted in human gingival fibroblast culture medium to obtain concentrations of 25, 50, 100, 200, 240, 280, 320, 400, and 800 µg/mL, and subsequently filtered through a 0.22 µm syringe filter. Cells were incubated with the varying concentrations of the extract for 24 hours, after which cell viability was evaluated via fluorescence microscopy.

Cell nuclei were stained using the fluorescent dyes bisbenzimidazole H33342 trihydrochloride (Hoechst 33342) and propidium iodide (PI). The plasma

membrane is permeable to Hoechst 33342, allowing it to stain the nuclei of both viable and apoptotic cells, which subsequently exhibit blue fluorescence. Viable cell nuclei display homogenous staining with smooth margins, whereas the stained nuclei of apoptotic cells appear condensed and/or fragmented, emitting intense blue fluorescence. Conversely, the cell membrane is impermeable to propidium iodide (PI); therefore, it exclusively stains the nuclei of necrotic cells, which exhibit red fluorescence (Fig. 1.1.7.1).

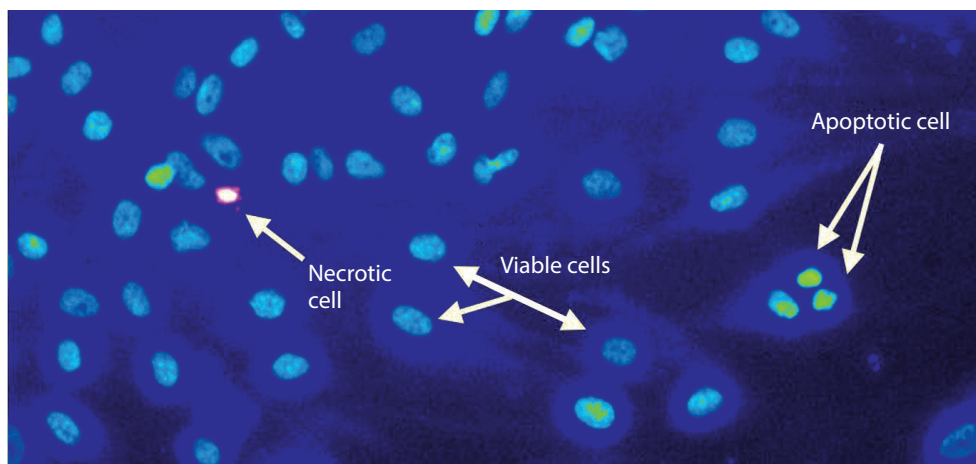


Fig. 1.1.7.1. Cell viability was evaluated via fluorescence microscopy

Cell cultures were incubated with 20 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33342 and 10 $\mu\text{g/mL}$ PI for 15 min. The samples were then fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature to preserve the cellular structures for microscopy. Images of five randomized fields were captured using an Olympus IX71S1F-3 fluorescence microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) at a 200 $\times$ magnification. Viable, apoptotic, and necrotic cells were quantified using ImageJ software (version 1.53k), and the average value across the five fields was recorded. Cell viability was expressed as the percentage of viable, apoptotic, and necrotic cells relative to the total cell count.

1.1.8. Analysis of PACN antibacterial efficacy

To evaluate the antibacterial activity of the proanthocyanidins, PSRE or the PACN fraction was co-incubated with the bacterial cultures. Varying concentrations of PSRE or the PACN fraction were utilized: 10, 30, 50, 70, 80, 90, and 100 $\mu\text{g/mL}$. PSRE or PACNs were incorporated and dissolved in Luria-Bertani (LB) broth containing the bacterial strains under analysis (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *A. actinomycetemcomitans*, and *E. coli*). A 1 mL aliquot of the experimental suspension (LB broth containing the bacteria and

either PSRE or the PACN fraction) was inoculated into 24-well plates and incubated for 24 hours at 37 °C. LB broth containing only the bacterial cultures served as the control group. Following incubation, bacterial viability was assessed via a colorimetric metabolic assay using alamarBlue® reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The resulting data were analyzed using a spectrophotometric microplate reader (Spark, Tecan, Basel, Switzerland).

1.1.9. Impact of PACNs on LPS-induced cellular metabolism alterations (fluorescence assay)

The effects of proanthocyanidins on murine gingival fibroblasts during infection were analysed in vitro by challenging the fibroblasts with 2 mg/mL *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich) and 50–100 µg/mL of either PSRE or PACNs. These specific concentrations were selected because an LPS concentration below 1 mg/mL failed to induce a significant increase in cell mortality, whereas PSRE or PACN concentrations exceeding 200 µg/mL exhibited cytotoxic effects. Following the experimental treatment, necrotic cell death was evaluated via fluorescence microscopy. The cells were quantified on the fluorescence micrographs and expressed as a percentage of the total cell count per field of view. Data are presented as means with standard deviation. The LD₅₀ (median lethal dose) values were calculated using SigmaPlot software (version 13; Systat Software Inc., London, United Kingdom).

1.1.10. Effects of PACNs on cellular metabolism during bacterial infection (the “race for the surface” model)

To evaluate the capacity of proanthocyanidins to preserve cellular metabolism during infection, the “race for the surface” model was utilized. To simulate the oral mucosal environment within this model, *S. aureus* and *A. actinomycetemcomitans* strains were selected along with human gingival fibroblasts (HGFs, ATCC PCS-201-018). The cells were seeded into 24-well plates at a density of 1.5×10^4 cells/well and incubated overnight. Subsequently, the culture medium was replaced with 1 mL of antibiotic-free α -MEM (α -Minimum Essential Medium Eagle, alpha-modification) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma), 100 µg/mL proanthocyanidins, and 1×10^5 bacterial cells. The plates were incubated for 24 hours at 37 °C to allow direct interaction between the fibroblasts and bacteria. Following incubation, both cells and bacteria were detached from the wells using a solution containing collagenase (1 mg/mL) and trypsin-EDTA (0.25%). The harvested viable cells were quantified using the trypan blue exclusion

assay and a Bürker counting chamber. Well-plates containing cultured cells without bacterial inoculation served as the control group.

1.1.11. Effects of PACNs on LPS-induced cellular apoptosis (assessment of Caspase-3 and Caspase-8 levels)

Cellular challenge with bacterial lipopolysaccharide can induce either cell necrosis or apoptosis, which exerts a destructive effect on gingival tissues. Caspases (cysteine-aspartic proteases) are the pivotal enzymes involved in the apoptotic cascade [180]. Based on their functional role within the apoptotic pathway, caspases are classified into initiator caspases (triggers of apoptosis) and effector caspases (which execute proteolysis upon activation by initiator caspases, leading to the characteristic biochemical and morphological alterations observed in apoptotic cells). Assessing caspase activity demonstrates whether the tested substances (PSRE, PACNs) can suppress bacterial lipopolysaccharide-induced apoptotic protease activity.

Following experimental treatment, caspase-3 activity in cell lysates was measured using a Caspase-3 Assay Kit (Sigma-Aldrich) in accordance with the manufacturer's protocol. Data are expressed as the mean AMC concentrations $\pm$ standard deviation, normalized to milligrams of total cellular protein. Similarly, caspase-8 levels in cell lysates after treatment were quantified using a colorimetric Caspase-8 Assay Kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. The resulting data are presented as the mean rates of pNA concentration increase $\pm$ standard deviation, normalized per milligram of total cellular protein.

1.1.12. Modulation of the inflammatory response by PACNs (cytokine quantification)

The effects of proanthocyanidins on the inflammatory response to bacterial LPS were analysed by quantifying cytokine levels – specifically interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), and prostaglandin E₂ (PGE₂). These measurements were performed using a human IL-6 ELISA kit (Abbexa/FineTest) and murine IL-8 and PGE₂ ELISA kits (Abbexa) in strict accordance with the manufacturers' protocols. The investigations were conducted utilizing murine gingival fibroblasts and human peripheral blood mononuclear cells.

1.1.13. Comparative analysis of the effects of PACNs and chlorhexidine digluconate on cells

The administration of chlorhexidine digluconate solution – the most widely prescribed agent in clinical practice – warrants careful consideration during treatment due to its potential adverse effects on oral cavity cells [7]. Consequently, this study aimed to compare the effects of PACNs and a 0.12% chlorhexidine digluconate solution on the HGF-1 cell line. The PACN concentrations evaluated were 25, 50, 100, 200, and 240 µg/mL. The 0.12% chlorhexidine solution was prepared using growth medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin solution) and filtered following the same protocol as the PSRE solution. The experimental outcomes were compared against negative control groups consisting of the growth medium alone and a 30% polyethylene glycol solution (utilized for dissolving the PSRE powder) alone. These negative control groups were established to eliminate the influence of confounding external factors.

The tested substances were incubated with HGF-1 cells for 24 hours. Cellular responses were subsequently evaluated spectrophotometrically using a Spark microplate reader (Tecan, Basel, Switzerland) with the PrestoBlue® reagent (Invitrogen, USA). The PrestoBlue® reagent was diluted 10-fold in growth medium, and a 100 µL aliquot of the diluted solution was added to each cell-containing well, followed by incubation at 37 °C for 2 hours.

The PrestoBlue® assay is fundamentally based on cellular metabolic activity. Within the cells, the resazurin present in PrestoBlue® is converted into resorufin, the quantity of which is measured spectrophotometrically at an absorbance wavelength of 570 nm, utilizing a wavelength of 600 nm for background correction. The optical absorbance of resorufin is directly proportional to cellular metabolic activity, reflecting cellular proliferation in this experimental setup. The spectrophotometric data were recorded in arbitrary units across the PACN groups (25, 50, 100, 200, and 240 µg/mL), the 0.12% chlorhexidine digluconate solution (CHX) group, the 30% polyethylene glycol solution (PG 30%) group, and the growth medium control group.

1.1.14. Analysis of the proliferative potential of PACNs on cells (TGF-β1 ELISA)

In this study, we analysed the proliferative potential of PACNs in HGF-1 and HPDLF cells by performing a quantitative analysis of transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1). TGF-β1 is a pivotal growth factor involved in the regeneration of periodontal ligament cells [181]. The concentration of this factor increases at wound healing sites, particularly within the oral cavity,

where the proliferation of multiple cell types, such as fibroblasts and osteoblasts, must be stimulated. Furthermore, TGF- β 1 plays a critical role in regulating fibroblast proliferation and differentiation, as well as promoting collagen synthesis, which is essential for maintaining periodontal health. In the present investigation, the pro-proliferative capacity of PACNs in HGF-1 and HPDLF cells was evaluated using a TGF- β 1 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

HGF-1 and HPDLF cells were treated with PSRE at concentrations of 25 and 50 μ g/mL and compared against an untreated control group. The proliferative potential of both HGF-1 and HPDLF cells was determined via a TGF- β 1 ELISA in strict accordance with the manufacturer's recommendations. Utilizing highly specific antibodies, this immunoassay enables the precise quantification of the TGF- β 1 growth factor concentration within biological samples.

1.2. Clinical trial

The clinical trial conducted was a randomized controlled clinical trial designed to evaluate the efficacy of topically administered PACNs in the treatment of generalized periodontitis.

1.2.1. Proanthocyanidin films

The isolation process of proanthocyanidins is described in detail in Section 1.1 ("Isolation of proanthocyanidins"). For the fabrication of the films, a cross-linked porcine type I collagen hydrogel was utilized, which was subsequently impregnated with the lyophilized proanthocyanidin fraction (Fig. 1.2.1.1).



Fig. 1.2.1.1. *Development of proanthocyanidin films for the clinical trial*

1.2.2. Study design

A randomized clinical trial was conducted between January and May 2019 at the Clinic of Dental and Oral Diseases of the Lithuanian University of Health Sciences, enrolling systematically healthy patients diagnosed with stage III–IV periodontitis. The patients were randomly allocated to either the control or the experimental group. A double-blind (masked) study design was constructed; neither the patients nor the clinical examiner was informed regarding the group assignment.

1.2.3. Ethical approval

Ethical approval for the study was granted by the Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee (Permit No. BE-2-38). All participating patients were required to provide written informed consent, confirming their voluntary participation in the trial, their ability to attend the scheduled follow-up visits, and their agreement to the collection and processing of coded data.

1.2.4. Patient selection: inclusion and exclusion criteria

The study participants were recruited from the Clinic of Dental and Oral Diseases at the Lithuanian University of Health Sciences.

Inclusion criteria:

- Patients diagnosed with stage III–IV, slowly progressing (grade A/B) periodontitis (radiographically determined bone loss extending to the middle or apical third of the root, evidence of tooth loss due to periodontitis, maximum probing pocket depth (≥ 6 mm), and horizontal and vertical bone loss (≥ 3 mm));
- Systemically healthy individuals;
- Retention of ≥ 20 teeth;
- Individuals aged ≥ 30 years.

Exclusion criteria:

- Patients diagnosed with stage I–II periodontitis (radiographic bone loss confined to the coronal third, no tooth loss due to periodontitis, maximum probing pocket depth ≤ 5 mm, and predominantly horizontal bone resorption);
- Presence of systemic diseases;
- Antibiotic therapy within the preceding 3 months;
- Periodontal treatment within the preceding 6 months;
- Pregnant or lactating women;
- Documented hypersensitivity or allergic reaction to the active substance (proanthocyanidins).

The selected patients were allocated into two groups: the first group underwent subgingival instrumentation alone, while the second group received subgingival instrumentation combined with the subgingival application of proanthocyanidin hydrogel films.

1.2.5. Sample size calculation

A sample size of 46 patients (23 in each group: control and test) was sufficient to detect a clinically relevant difference in the mean probing pocket depth (PPD) change in moderately deep pockets (comparing baseline to the 8-week follow-up) between the control and test groups. This calculation was based on a two-sided t-test for the determination of the mean difference, assuming a statistical power of 78.9% and a significance level of 5% ($\alpha = 0.05$).

1.2.6. Randomization and allocation

The forty-six patients were randomly allocated into two groups. The clinical examiner performed participant coding and randomization utilizing a computer-generated randomization table. Initially, each patient was assigned a unique identification number from 1 to 46. Following the coding procedure, simple unrestricted randomization was executed to generate two distinct sets of random numbers, comprising 23 numbers per set. Allocation concealment was ensured by assigning the first set of numbers to the control group and the second set to the test group.

1.2.7. Study protocol and blinding

A double-blind study design was implemented for this clinical trial. The protocol involved two separate investigators: a treating clinician and a principal investigator. During the subgingival instrumentation procedure, the treating clinician remained blinded to the group assignment (control or test) of the patients. Following the instrumentation phase, the allocation status was revealed to the treating clinician by the principal investigator to allow the administration of the assigned adjunctive therapy. From the inception of the clinical trial, patients were kept strictly unaware of their group allocation. The periodontal treatment was performed under local anesthesia within a sterile field utilizing surgical drapes to obstruct the patients' field of vision regarding the procedural details. Consequently, the patients were prevented from visually observing or physically perceiving the specific type of therapeutic modality administered.

1.2.8. Clinical protocol and intervention

Patients received treatment according to their respective group allocation. In the first group (control), patients underwent subgingival instrumentation alone, whereas the second group (test) received subgingival instrumentation combined with the subgingival application of proanthocyanidin-loaded hydrogel films. The type I collagen films were custom fabricated specifically for the purposes of this investigation (Fig. 1.2.8.1).



Fig. 1.2.8.1. Proanthocyanidin-loaded film. Clinical view

Prior to the commencement of the study, all patients underwent an initial intraoral evaluation, during which emergency dental care was provided and teeth with a hopeless prognosis were extracted. Standardization of the study cohort was achieved by performing professional mechanical plaque debridement and providing tailored individual oral hygiene instructions. Furthermore, patients were explicitly instructed to refrain from using auxiliary oral rinses or antimicrobial mouthwashes during the study period.

The clinical trial protocol was structured across multiple visits:

- **Visit 1 (baseline):** Patients underwent a comprehensive periodontal examination, and salivary biofluid samples were harvested. Unstimulated whole saliva samples were collected by placing three sterile cotton rolls in the oral cavity for 5 minutes. Upon retrieval, the salivary rolls were stored in sterile containers at -80°C . Concurrently during this first visit, subgingival instrumentation was performed by the same treating clinician. The procedure was executed within a sterile field under local anesthesia utilizing a

combination of an ultrasonic scaler (Acteon Satelec Suprasson P5 Booster) and hand instruments, specifically Gracey micro-curettes (Hu-Friedy) and mini-curettes (LM-Dental), under 4.5× optical magnification. For patients allocated to the test group, the proanthocyanidin-loaded hydrogel films were immediately inserted into the periodontal pockets. For patients in the control group, the therapeutic intervention was concluded without any adjunctive subgingival delivery (Fig. 1.2.8.2). Following the procedure, standardized post-operative care instructions were detailed to the patient.



*Fig. 1.2.8.2. Subgingival application of the proanthocyanidin film.
Clinical view*

- **Visit 2 (8-week follow-up):** Patients were recalled for a follow-up evaluation 8 weeks post-intervention. A repeated comprehensive periodontal examination was executed, and unstimulated whole saliva samples were harvested again following the exact protocol described above.

1.2.9. Clinical and immunological parameters, examiner calibration

The efficacy of the periodontal therapy was reflected by clinical periodontal measurements – specifically probing pocket depth (PPD), clinical attachment level (CAL), bleeding on probing (BOP), and plaque index (PI) – as well as biochemical assessments, including salivary matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) concentrations. PPD, CAL, BOP, and PI were recorded at six sites per tooth: mesiobuccal, buccal, distobuccal, distolingual, lingual, and mesiolingual. Clinical measurements for third molars were excluded from the study.

The PPD and CAL values for moderately deep pockets for each patient at baseline and at the 8-week follow-up were determined by calculating the mean PPD and CAL across all moderately deep sites. Similarly, the PPD and CAL values for deep pockets for each patient at baseline and at the 8-week follow-up were obtained by calculating the mean PPD and CAL across all deep sites. Individual patient changes in PPD and CAL relative to baseline in moderately deep or deep pockets were determined by calculating the mean changes for each patient based on their initial PPD classification (4–6 mm or ≥ 7 mm). Patient-level BOP and PI were obtained by calculating the percentage of tooth sites exhibiting bleeding or plaque accumulation for each individual, stratified by the initial PPD (4–6 mm or ≥ 7 mm).

For statistical analysis, periodontal pockets were categorized into two depth intervals: moderately deep (4–6 mm) and deep (≥ 7 mm) pockets. The primary outcome variable was defined as the mean change in PPD within moderately deep pockets when comparing baseline values to the 8-week follow-up. Secondary outcome variables included the mean change in PPD within deep pockets from baseline to 8 weeks, the mean change in clinical attachment level, the change in bleeding on probing scores, the change in plaque index, and the mean changes in salivary MMP-8 and TIMP-1 levels.

Prior to the study, intra-examiner calibration was performed by evaluating ten patients possessing at least five teeth with a PPD and CAL ≥ 5 mm. These calibration subjects were examined twice with a 15-minute interval between measurements using a universal periodontal probe (PCPUNC156; Hu-Friedy).

1.2.10. Immunological assessment

During the clinical trial, an analysis of the correlation between salivary MMP-3 and TIMP-1 levels and clinical parameters was performed to evaluate the efficacy of proanthocyanidins in periodontal therapy. The levels of MMP-3 and TIMP-1 were measured in salivary samples at baseline (pre-treatment) and at the 2-month post-treatment follow-up. For the collection of salivary specimens, Salivette® (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany) saliva collection kits were utilized.

The concentrations of MMP-3 and TIMP-1 in the saliva samples were quantified via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercial ELISA kits (Elabscience Biotechnology Inc., Houston, TX, USA) in strict accordance with the manufacturer's instructions. Optical absorbance was measured at a wavelength of 450 nm using a Multiskan microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The final concentrations

were calculated based on standard calibration curves generated during each individual assay run and are expressed in pg/mL.

1.3. Statistical analysis

Preclinical investigations

Statistical analysis was performed utilizing the IBM SPSS Statistics software package, version 20 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). For normally distributed data (verified via the Shapiro-Wilk test), a one-way analysis of variance (ANOVA) was employed to compare group means. For antibacterial activity assays and bacterial-fibroblast co-culture experiments, statistical data analysis was executed using ANOVA followed by Tukey's HSD *post hoc* test. For experiments involving murine gingival fibroblasts, a non-parametric analysis of variance followed by Dunn's *post hoc* test was applied. The statistical significance level was set at $\alpha = 0.05$. Quantitative results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of 3 to 7 independent replicates.

Clinical trial

Statistical analysis was conducted utilizing the IBM SPSS Statistics software package, version 28 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). The Shapiro-Wilk test was performed to evaluate whether the clinical periodontal parameters (patient-level PPD, CAL, BOP, and PI) and biochemical markers (salivary MMP-3 and TIMP-1 concentrations) conformed to a normal distribution. Accordingly, for normally distributed data, a paired-samples t-test was employed to compare intra-group changes between baseline and the 2-month post-treatment follow-up. If the assumption of normality was violated, the non-parametric Wilcoxon signed-rank test for related samples was applied to analyze pre- and post-treatment differences within the groups.

Inter-group comparisons for continuous variables were determined using the independent-samples t-test for normally distributed measures, or the Mann-Whitney U test for non-normally distributed metrics. The statistical significance level for all tests was set at $\alpha = 0.05$.

2. RESULTS

2.1. Results of cytotoxicity evaluation of proanthocyanidins

The results demonstrated that low concentrations of PSRE (less than 100 $\mu\text{g/mL}$) did not affect cell viability, whereas high concentrations (400 $\mu\text{g/mL}$ or higher) significantly reduced cell viability. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was determined to be 583 $\mu\text{g/mL}$; therefore, subsequent *in vitro* studies were conducted using lower concentrations of the extract (Fig. 2.1.1).

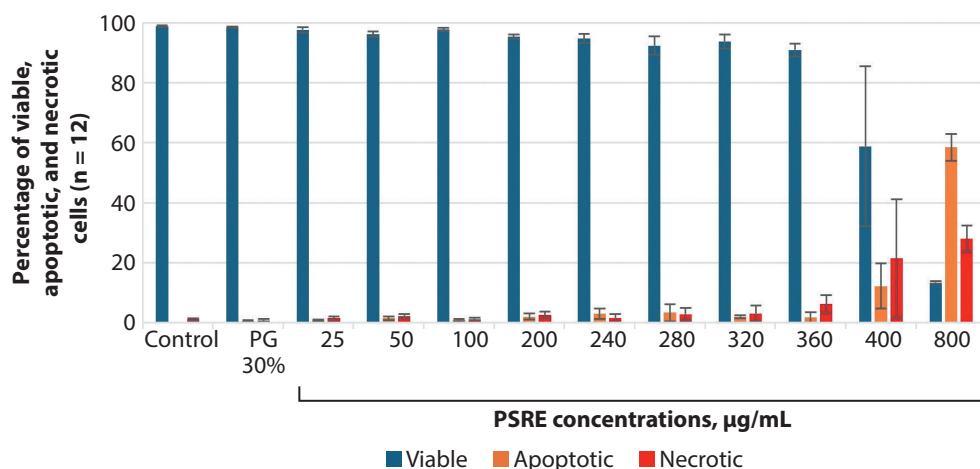


Fig. 2.1.1. Effect of half maximal inhibitory PSRE concentration on HGF-1 cell viability

PG 30% – 30% polyethylene glycol solution.

Based on these results, PACN concentrations significantly below the IC_{50} value were selected for subsequent experiments.

2.2. Results of the antibacterial activity analysis of proanthocyanidins

To evaluate the antibacterial efficacy, bacterial strains (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *A. actinomycetemcomitans*, and *E. coli*) were treated with PSRE or PACN (10–100 $\mu\text{g/mL}$). The antibacterial activity results (Fig. 2.2.1) demonstrated that both PSRE and PACN significantly reduced bacterial metabolic activity compared to the control group, starting at concentrations of 50–70 $\mu\text{g/mL}$.

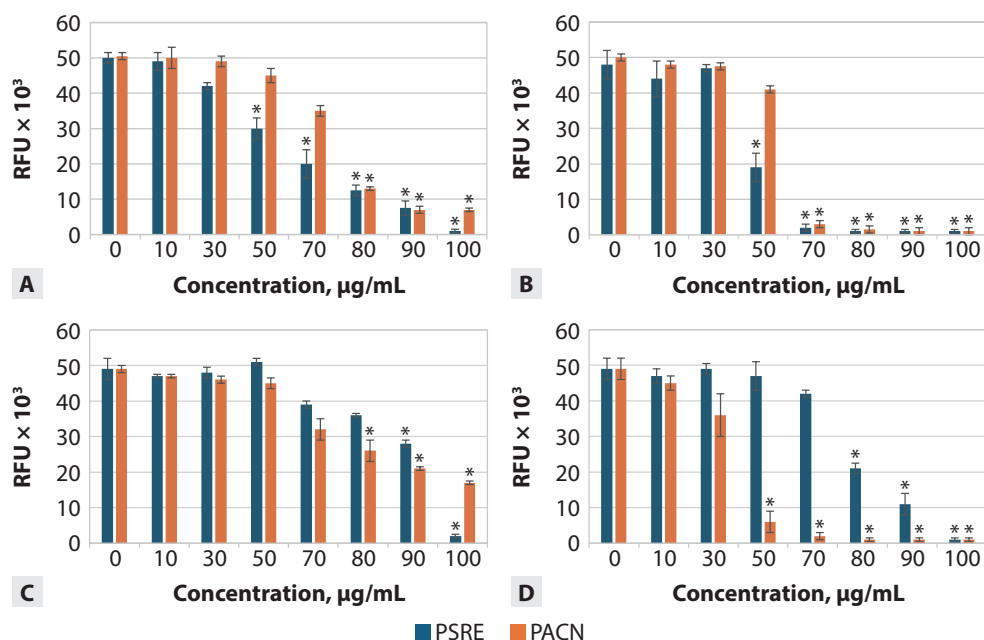


Fig. 2.2.1. Antibacterial activity of *Pelargonium sidoides* root extract (PSRE) and proanthocyanidins isolated from PSRE (PACN)

Staphylococcus aureus (A), *Staphylococcus epidermidis* (B), *Escherichia coli* (C), and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (D). RFU – relative fluorescence units. Bars represent means $\pm$ standard deviations of six experimental replicates. * $P < 0.05$ compared with control.

Certain differences were observed among the tested bacterial strains. In the case of *S. aureus*, PSRE was more effective than PACN: a concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ of PSRE was sufficient to significantly reduce metabolic activity, whereas a similar result for PACN was achieved at 80 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$, compared to the control group). Conversely, for *A. actinomycetemcomitans*, the results were opposite: PACN significantly reduced metabolic activity at 50 $\mu\text{g/mL}$, while 80 $\mu\text{g/mL}$ of PSRE was required to achieve a comparable level of activity. The metabolism of *S. epidermidis* was significantly reduced by both PSRE and PACN at a concentration of 70 $\mu\text{g/mL}$. Interestingly, non-pathogenic *E. coli* demonstrated the highest resistance to the treatment within the 0–80 $\mu\text{g/mL}$ range. Following treatment with 80 $\mu\text{g/mL}$ of PSRE, the metabolic activity of *E. coli* decreased by 26% compared to the control group, whereas the metabolic activities of *S. aureus*, *S. epidermidis*, and *A. actinomycetemcomitans* were reduced by 75%, 97%, and 57%, respectively. At 80 $\mu\text{g/mL}$ of PACN, the metabolic activities of these four strains, listed in the same order, decreased by 47%, 74%, 96%, and 99%,

respectively. Furthermore, even with the addition of 100 µg/mL of PACN to the growth medium, *E. coli* still maintained nearly half of the control activity level.

In summary, the results of the antibacterial assessment indicate stronger toxicity of PSRE and PACN toward *S. aureus*, *S. epidermidis*, and *A. actinomycetemcomitans* than toward the non-pathogenic *E. coli* strain when the extracts were applied in the 80 µg/mL range. At higher concentrations (90 and 100 µg/mL), a similar broad-spectrum effect was observed for all tested strains, as all PSRE and PACN results differed significantly compared to the untreated control groups ($P < 0.05$). Importantly, the *A. actinomycetemcomitans* strain (one of the primary causative agents of periodontitis) is more strongly affected by proanthocyanidins than by the *Pelargonium sidoides* root extract used.

2.3. Fluorescence analysis results of the effects of proanthocyanidins on murine gingival fibroblast metabolism under bacterial infection

The protective effect of PSRE and PACN under bacterial infection conditions may manifest not only through the inhibition of bacterial growth but also by enhancing cell resistance to bacterial metabolites. Therefore, an in vitro study was conducted to investigate how PSRE and PACN affect the viability of primary murine gingival fibroblasts in the presence of bacterial lipopolysaccharide (LPS). To select appropriate concentrations of PSRE and PACN that exert no adverse effects on the cells, concentration-dependent toxicity was determined using the previously described dual nuclear staining method with propidium iodide and Hoechst 33342. The number of necrotic cells with propidium iodide-positive nuclei significantly increased after 24 hours of treatment with PSRE and PACN at concentrations of 200 µg/mL and higher. PSRE exhibited significantly greater toxicity compared to PACN in the concentration range starting from 200 µg/mL, which was reflected in the determined IC₅₀ values (a metric quantifying 50% cell death at a given test substance concentration): 209 µg/mL for PSRE and 288 µg/mL for PACN. In the concentration range from 400 to 550 µg/mL, no further differences were observed between the effects of the two agents, and nearly all cells in the culture were necrotic.

Based on these data, two concentrations of PSRE and PACN were selected to investigate the anti-inflammatory effect: 50 and 100 µg/mL. Both concentrations were non-toxic to gingival fibroblasts when the cell cultures were exposed to these compounds for 24 hours. Following treatment with

2 $\mu\text{g/mL}$ LPS, the percentage of necrotic cells in the fibroblast culture increased from 2.7% (2.2%) in the control group to 31.7% (11.9%) after PACN and PSRE, respectively, demonstrating a statistically significant reduction in cell viability (Fig. 2.3.1).

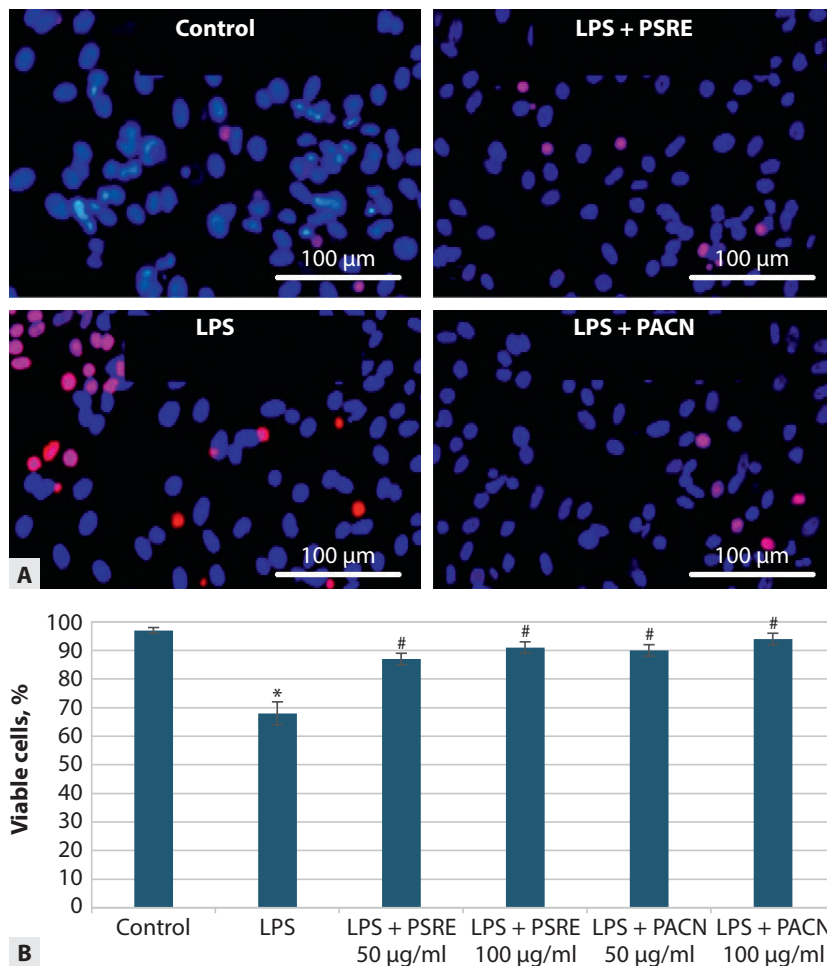


Fig. 2.3.1. Effect of *Pelargonium sidoides* root extract (PSRE) and PSRE-derived proanthocyanidins (PACN) on the viability of mouse gingival fibroblasts exposed to bacterial lipopolysaccharide (LPS)

(A) Representative fluorescence images after treatment with LPS and 100 $\mu\text{g/mL}$ PSRE or PACN, with nuclear viability staining: necrotic nuclei positive for propidium iodide are shown in red, while all nuclei are stained blue with Hoechst 33342. (B) Quantitative viability results: 50 and 100 indicate the concentrations used ($\mu\text{g/mL}$). Data are presented as means $\pm$ standard deviation of five experiments. * – significant difference compared to the untreated control group. # – significant difference compared to cells treated with LPS alone ($P < 0.05$).

Interestingly, treatment with 50 and 100 µg/mL of PSRE and PACN prevented the LPS-induced loss of cell viability. These data indicate that both PSRE and PACN were able to protect gingival fibroblasts against bacterial LPS-induced necrosis.

2.4. Results of the “Race for the surface” Study on the effects of proanthocyanidins on human gingival fibroblast metabolism under bacterial infection

An *in vitro* study analyzing the interaction among proanthocyanidins, bacteria, and cells (gingival fibroblasts) revealed that the antibacterial properties of PSRE and PACN are effective in protecting human gingival fibroblasts during bacterial. During the study, two microenvironments were simulated: the oral microenvironment (by co-culturing gingival fibroblast cells and *A. actinomycetemcomitans* bacteria) and the mucosal microenvironment (by co-culturing gingival fibroblasts and *S. aureus*). The results of the “race for the surface” model are presented in Fig. 2.4.1. A laboratory “race for the surface” model evaluated interactions between proanthocyanidins, bacteria, and human gingival fibroblasts. Two microenvironments were simulated: oral (co-culture with *A. actinomycetemcomitans*), mucosal (co-culture with *S. aureus*).

Both PSRE and PACN (100 µg/mL) were effective in protecting the cells from bacterial infection: the number of viable cells after 24 hours of direct contact with the bacteria was comparable to that of the control group (cells cultured in medium without bacteria). Conversely, when bacteria were cultured in the cell wells in the absence of PSRE or PACN, the bacteria successfully colonized the wells, and no viable cells were detected under these conditions. These results indicate that the application of either substance effectively preserved the viability of gingival fibroblast cells by reducing bacterial proliferation. Furthermore, the study demonstrated that PACN exhibits stronger cytoprotective properties compared to the PSRE extract.

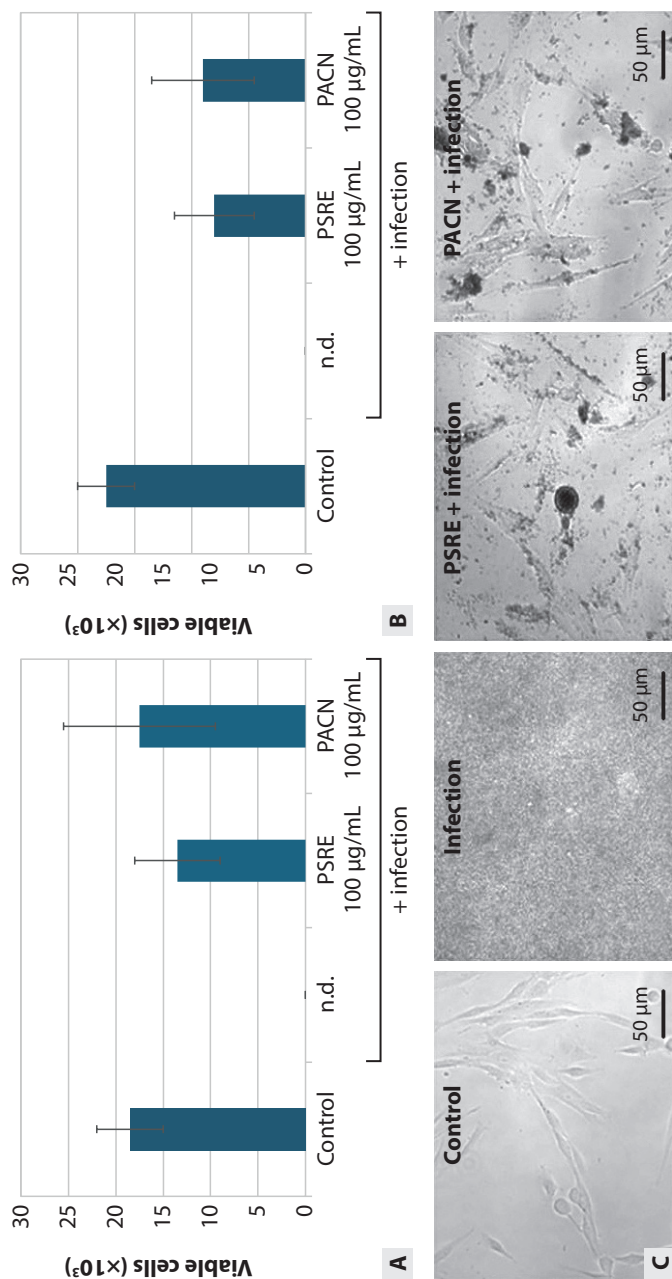


Fig. 2.4.1. Effect of *Pelargonium sidoides* root extract (PSRE) and PSRE-derived proanthocyanidins (PACN) on human gingival fibroblast viability in a mixed-culture “race for the surface” assay

Human gingival fibroblasts were infected with *A. actinomycetemcomitans* (A) or *S. aureus* (B). Columns represent means $\pm$ standard deviations of six experimental replicates. “Control” indicates uninfected cells, and “n.d.” indicates that no cells were detectable in the samples. (C) Representative images of human gingival fibroblasts co-cultured with *A. actinomycetemcomitans* after 24 hours of infection.

2.5. Effects of proanthocyanidins on cell apoptosis under bacterial infection: results of Caspase-3 and Caspase-8 level evaluation

To analyse the protective anti-apoptotic effects of PSRE and PACN, changes in the concentrations of initiator caspase-8 and effector caspase-3 were evaluated in LPS-treated fibroblast cells (Fig. 2.5.1).

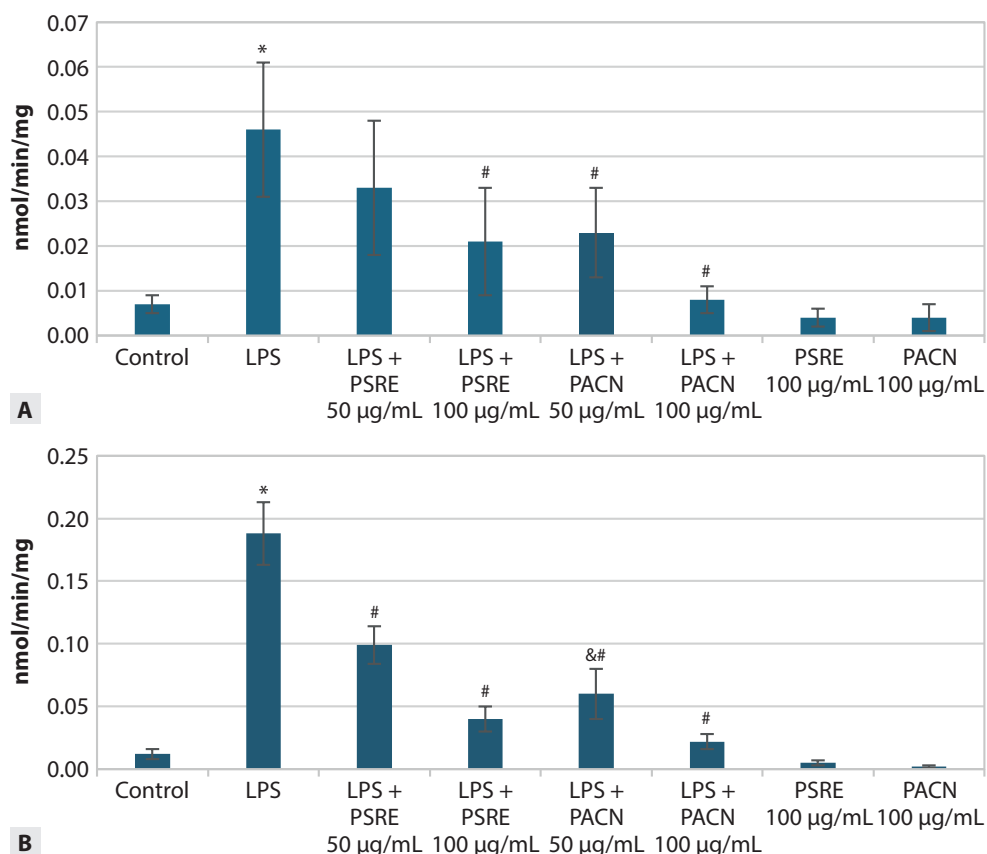


Fig. 2.5.1. Effect of *Pelargonium sidoides* root extract (PSRE) and PSRE-derived proanthocyanidins (PACN) on LPS-induced caspase-8 (A) and caspase-3 (B) activation in gingival fibroblasts.

Data are presented as means $\pm$ standard deviations of seven experimental replicates. * – significant difference compared with the untreated control group, # – significant difference compared with LPS treatment alone, & – significant difference compared with LPS + 50 µg/mL PSRE treatment, $P < 0.05$.

The results demonstrated that after 24 hours, lipopolysaccharide increased the caspase-8 concentration in control samples from 0.007 ± 0.001 nmol/min/mg to 0.047 ± 0.013 nmol/min/mg. PSRE at a concentration of 50 µg/mL did not significantly affect LPS-induced caspase-8 activity; however, treatment with 100 µg/mL PSRE, 50 µg/mL PACN, and 100 µg/mL PACN significantly reduced LPS-induced caspase-8 activation by 2.2-, 2.0-, and 5.9-fold, respectively. In the absence of lipopolysaccharide, 100 µg/mL of PSRE and PACN had no significant effect on caspase activity.

The caspase-3 measurement results showed that following 24 hours of lipopolysaccharide treatment, caspase-3 levels increased from 0.012 ± 0.01 nmol/min/mg to 0.189 ± 0.06 nmol/min/mg. Both PSRE and PACN, at all tested concentrations, significantly attenuated the effect of LPS on caspase-3 activity. When LPS was co-administered with 50 µg/mL PSRE, caspase-3 activity was nearly two-fold lower than in samples treated with LPS alone. PSRE at 100 µg/mL reduced the effect of LPS on caspase-3 activity 4.7-fold. PACN at 50 and 100 µg/mL decreased LPS-induced caspase-3 activity 3- and 8.8-fold, respectively. No significant effect on the caspase-3 substrate cleavage rate was observed following treatment with 100 µg/mL of either PSRE or PACN alone without LPS.

The evaluation of caspase activity demonstrated that both PSRE and PACN are capable of inhibiting bacterial LPS-induced apoptosis activation. Both agents exert a stronger inhibitory effect on effector caspase-3 activity compared to caspase-8. The results indicated that PACN was more effective in suppressing caspase-8 activity than PSRE, suggesting that PACN is a more potent inhibitor of apoptosis during the early stages. Neither substance exhibited toxicity toward gingival fibroblasts when exposed to 50 or 100 µg/mL of PACN or PSRE for 24 hours.

2.6. Regulation of the inflammatory response using proanthocyanidins under bacterial infection: results of cytokine measurement studies

Infection-induced inflammation is the primary factor driving periodontal tissue destruction in the pathogenesis of periodontal diseases. Subsequently, the anti-inflammatory effects of PSRE and PACN were investigated by evaluating the LPS-induced release of inflammatory mediators from gingival fibroblasts and human peripheral blood mononuclear leukocytes. An in vitro study was conducted to analyse how PSRE and PACN affect the secretion of IL-8 and PGE2 from murine gingival fibroblasts, as well as the release of IL-6 from peripheral blood mononuclear cells (Fig. 2.6.1).

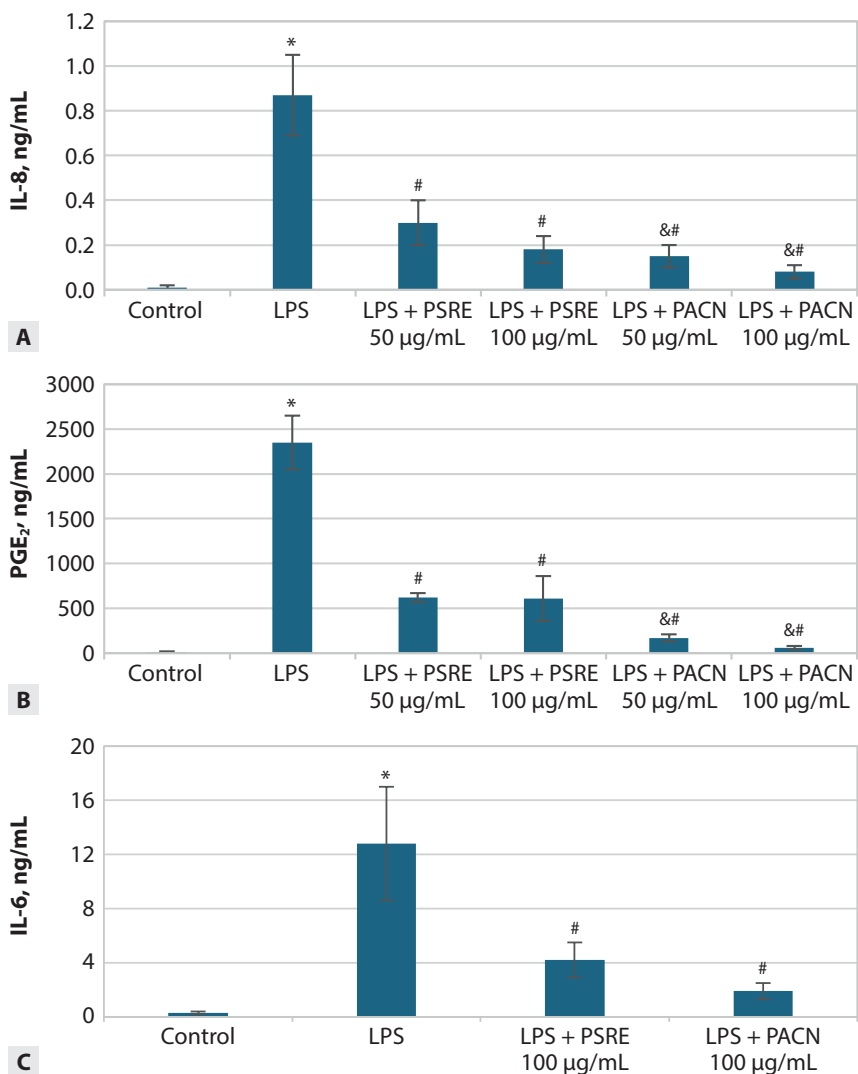


Fig. 2.6.1. Effect of *Pelargonium sidoides* root extract (PSRE) and PSRE proanthocyanidins (PACN) on (A) interleukin-8 (IL-8) and (B) prostaglandin E₂ (PGE₂) secretion from murine gingival fibroblasts, and (C) interleukin-6 (IL-6) secretion from peripheral blood mononuclear cells after LPS treatment

Data are presented as means $\pm$ SD of seven experiments. * – significant difference compared with untreated control, # – significant difference compared with LPS treatment alone, & – significant difference compared with LPS + 50 µg/mL PSRE treatment, $P < 0.05$.

Evaluation of IL-8 levels revealed that after 24 hours of LPS exposure, the concentration of the cytokine IL-8 surged to 1022 ± 75 ng/mL. PSRE (50 μ g/mL) reduced the IL-8 concentration to 344 ± 49 ng/mL, which is a three-fold decrease compared to cells not treated with the extract. Increasing the PSRE concentration to 100 μ g/mL further suppressed IL-8 release to 201 ± 33 ng/mL (a five-fold reduction compared to treatment with LPS alone). A similar level of inhibition was achieved using 50 μ g/mL of PACN, whereas at 100 μ g/mL of PACN, the IL-8 concentration following LPS stimulation decreased further to 32 ± 12 ng/mL, representing a 16-fold reduction compared to the LPS-treated group.

The study also analysed the levels of PGE₂, a mediator of the cyclooxygenase-2 inflammatory pathway, in the culture medium of murine gingival fibroblasts. In control samples, the mean PGE₂ concentration was 5 ± 2 ng/mL, but it increased to 2372 ± 194 ng/mL after 24 hours of LPS stimulation. In the presence of both 50 and 100 μ g/mL PSRE, the PGE₂ concentrations following LPS treatment were 637 ± 58 ng/mL and 613 ± 133 ng/mL, respectively, which is nearly four times lower than in the group untreated with the extract. PACN at 50 and 100 μ g/mL was even more effective: PGE₂ concentrations decreased to 174 ± 41 ng/mL and 72 ± 16 ng/mL, respectively, representing a 14- and 33-fold reduction compared to LPS application alone. Thus, the effect of PACN on LPS-stimulated PGE₂ release was significantly stronger than that of PSRE.

Measurements of IL-6 levels from PBMCs showed that PSRE and PACN at a concentration of 100 μ g/mL significantly reduced LPS-induced IL-6 secretion from PBMCs to 67% and 18% of the levels induced by LPS stimulation, respectively. Neither PSRE nor PACN was toxic to the cells at the applied concentrations, as demonstrated by the metabolic viability analysis.

The data on inflammatory mediator secretion indicate that both PSRE and PACN effectively inhibit the LPS-induced release of IL-8 and PGE₂ from murine gingival fibroblasts and the release of IL-6 from mononuclear leukocytes. PACN exhibited a slightly stronger inhibitory activity on IL-8 and IL-6 release and a significantly more potent inhibitory effect on PGE₂ secretion compared to PSRE.

2.7. Results of the comparative analysis of the effects of proanthocyanidins and chlorhexidine digluconate on gingival fibroblasts

An analysis of the effects of PSRE and chlorhexidine on HGF-1 cell proliferation was conducted (Fig. 2.7.1).

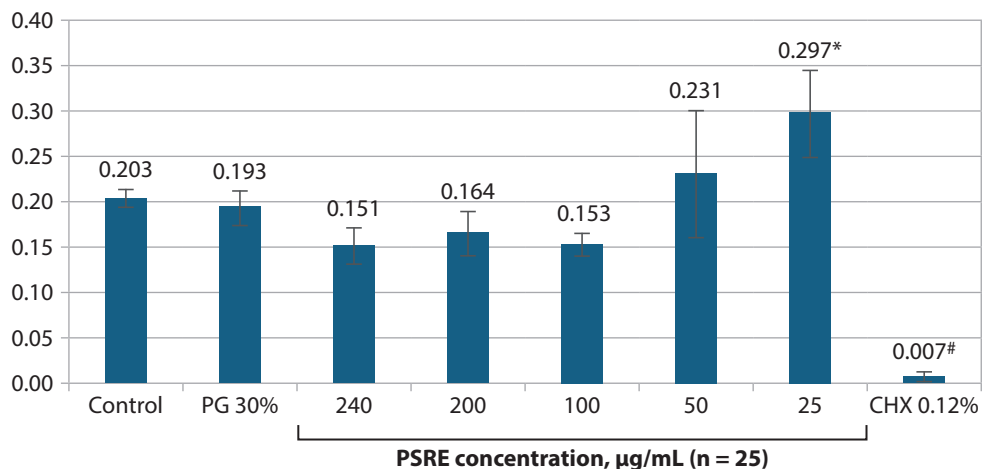


Fig. 2.7.1. Effect of PSRE and chlorhexidine on HGF-1 cell number

Cell number (relative units, mean $\pm$ SE). PG 30% – 30% polyethylene glycol solution; CHX 0.12%, – 0.12% chlorhexidine digluconate solution; One-way ANOVA followed by LSD *post hoc* test: * – control group compared with 25 $\mu\text{g/mL}$ (0.09 ± 0.03), $P = 0.006$; # – control group compared with CHX 0.12% (-0.20 ± 0.03), $P < 0.001$. Results of other groups did not differ significantly from the control group.

A low concentration of PSRE (25 $\mu\text{g/mL}$) induced a higher level of HGF-1 cell proliferation compared to higher concentrations (100 $\mu\text{g/mL}$ or higher). Conversely, the 0.12% chlorhexidine solution completely inhibited cell proliferation.

2.8. Results of the analysis of the proliferative potential of proanthocyanidins on human gingival and periodontal ligament fibroblasts (TGF- β 1 ELISA study)

The analysis of the proliferative potential of proanthocyanidins on human gingival and periodontal ligament fibroblasts was performed by measuring TGF- β 1 levels in PSRE-treated HGF-1 and HPDLF cells (Fig. 2.8.1).

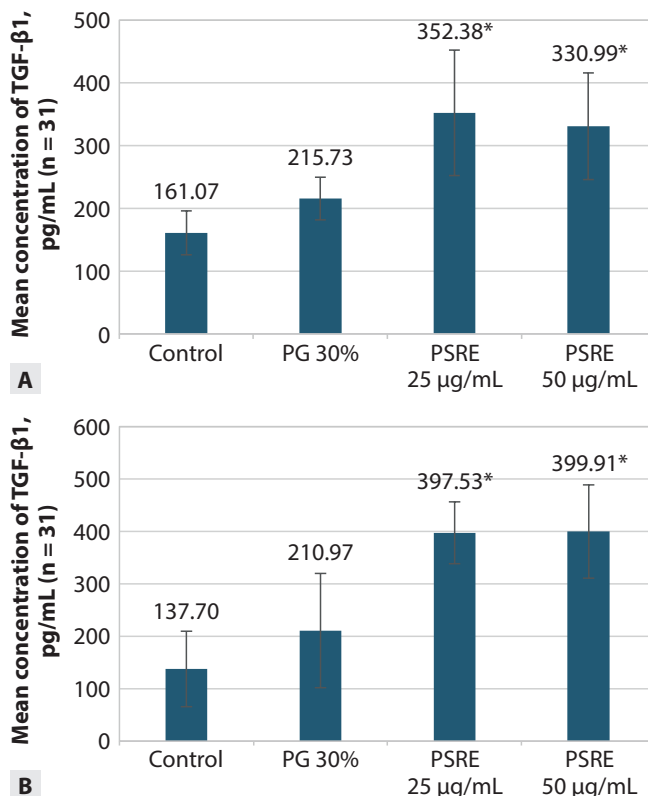


Fig. 2.8.1. TGF- β 1 levels in PSRE-treated HGF-1 (A) and HPDLF (B) cells

Average TGF- β 1 concentration (pg/mL), n = 31. One-way ANOVA followed by LSD post hoc test: * $P < 0.001$, compared with the control group. PG 30% – 30% polyethylene glycol solution; PSRE concentrations: 25–50 μ g/mL.

The results demonstrated that TGF- β 1 levels in the 25 and 50 μ g/mL PSRE groups were significantly higher compared to the control group (mean $\pm$ SE) (352.38 ± 31.32 and 330.99 ± 26.53 vs. 161.07 ± 11.04 pg/mL in HGF-1 cells; 397.53 ± 18.1 and 399.91 ± 27.61 vs. 137.7 ± 16.54 pg/mL in HPDLF cells).

2.9. Results of the clinical trial

2.9.1. Clinical trial participants

The study involved 46 participants with Stage III–IV generalized periodontitis. The patients were randomly assigned to two groups: one group received full-mouth subgingival debridement (conservative periodontal treatment) with subgingival application of hydrogels containing proanthocyanidins (MINST + PACN group), while the other group received full-mouth subgingival debridement alone (MINST group). Each group consisted of 23 patients. A schematic representation of the patient numbers is presented in the CONSORT flow diagram (Fig. 2.9.1.1).

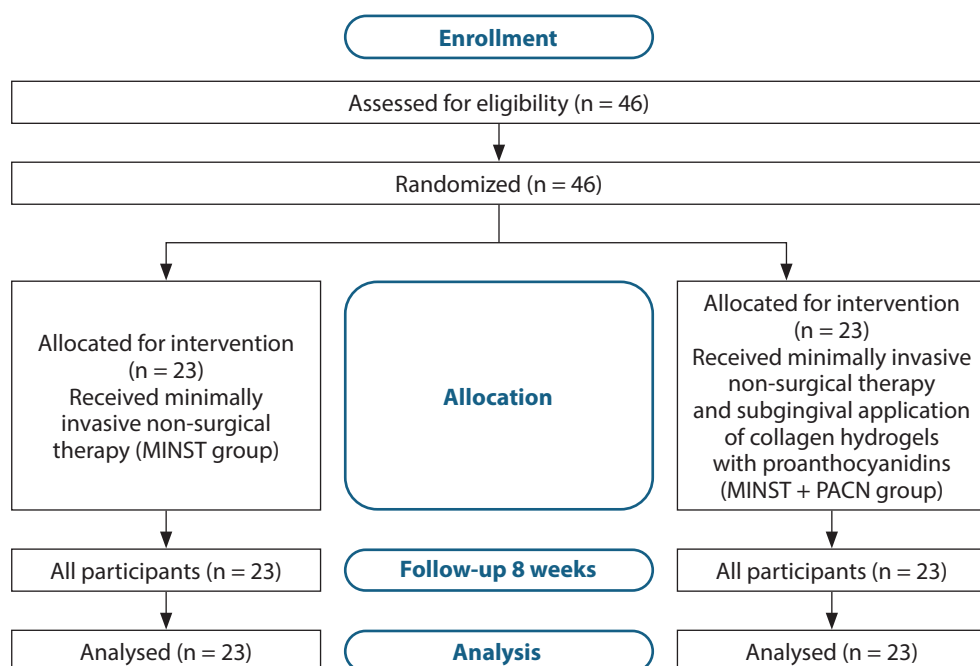


Fig. 2.9.1.1. CONSORT flow diagram

No statistically significant difference was found between the two study groups regarding age, sex, tobacco use (past or current), or periodontal disease stage at baseline (Table 2.9.1.1).

Table 2.9.1.1. *Clinical and demographical characteristics of sample population at the baseline*

Characteristic	MINST (n = 23)	MINST+PACNs (n = 23)	<i>P</i>
Age, years (mean ± SD)	46.3 ± 9.5	51.2 ± 1.5	0.109 ^a
Gender, n (%)			
Female	17 (73.9)	16 (69.6)	0.743 ^b
Male	6 (26.1)	7 (30.4)	
Tobacco use			
Current use	8 (34.8)	7 (30.4)	0.753 ^b
No use	15 (65.2)	16 (69.6)	
Periodontitis stage, n (%)			
Stage III	16 (69.6)	11 (47.8)	0.134 ^b
Stage IV	7 (30.4)	12 (52.2)	

^a Independent-samples t-test; ^b The Chi-Square (χ^2) test.

2.9.2. Changes in clinical parameters

Changes in Probing Pocket Depth (PPD). The mean dynamics of PPD per patient for moderate (baseline PPD 4–6 mm) and deep (baseline PPD ≥ 7 mm) pockets are presented visually (Table 2.9.2.1).

Table 2.9.2.1. Clinical characteristics of sample population at the baseline and after 8 weeks

Characteristic		MINST (n = 23)		MINST + PACNs (n = 23)	
		Baseline	8 week after	Baseline	8 week after
CAL, mm (mean ± SD)	Moderate pockets (4–6 mm)	6.2 ± 0.6	3.7 ± 0.5	7.0 ± 0.7	4.0 ± 0.9
	Deep pockets (≥ 7 mm)	9.2 ± 1.0	5.8 ± 1.1	9.4 ± 0.8	5.8 ± 1.0
PPD, mm (mean ± SD)	Moderate pockets (4–6 mm)	5.0 ± 0.3	2.1 ± 0.6	5.5 ± 0.3	2.1 ± 0.5
	Deep pockets (≥ 7 mm)	7.7 ± 0.6	2.7 ± 1.2	7.8 ± 0.5	2.7 ± 0.9
% pockets with PPD	Shallow sites (≤ 3 mm)	–	81.4 ± 17.2	–	85.9 ± 12.4
	Moderate pockets (4–6 mm)	81.0 ± 17.5	16.9 ± 14.4	69.1 ± 19.8	13.4 ± 11.7
	Deep pockets	19.0 ± 17.5	1.7 ± 5.7	30.9 ± 19.8	0.6 ± 1.7
	≥ 7 mm	79.7 ± 12.9	9.9 ± 12.0	94.7 ± 8.8	6.6 ± 9.9
	≥ 5 mm	41.3 ± 22.9	3.8 ± 7.7	68.6 ± 21.8	2.7 ± 5.5
	≥ 6 mm	19.0 ± 17.5	1.7 ± 5.7	30.9 ± 19.8	0.6 ± 1.7
BOP, % (mean ± SD)	≥ 7 mm	10.0 ± 12.2	0.5 ± 1.9	18.6 ± 15.8	0.0 ± 0.0
	≥ 8 mm	5.3 ± 10.7	0.1 ± 0.5	5.1 ± 6.9	0.0 ± 0.0
	≥ 9 mm	91.4 ± 16.4	13.3 ± 18.2	89.2 ± 24.5	22.9 ± 29.1
	Moderate pockets (4–6 mm)	92.1 ± 24.3	17.2 ± 27.3	91.2 ± 24.7	27.2 ± 32.2
PI, % (mean ± SD)	Deep pockets (≥ 7 mm)	57.2 ± 37.0	10.6 ± 21.8	69.5 ± 33.7	22.6 ± 33.6
	Moderate pockets (4–6 mm)	65.1 ± 40.5	11.6 ± 26.8	73.7 ± 36.8	28.8 ± 42.3

Characteristics were evaluated at baseline and 8 weeks post-treatment. Two treatment modalities were compared: MINST and MINST+PACN. Significance level is 0.05 are shown in bold. *Paired-samples t-test ($\alpha = 0.05$); [†]Related-samples Wilcoxon signed rank test ($\alpha = 0.05$); [‡]One-samples t test, test value = 0 ($\alpha = 0.05$). BOP – bleeding on probing; CAL – clinical attachment level; MINST – minimally invasive nonsurgical therapy; PACN – proanthocyanidins; PI – plaque index; PPD – pocket probing depth.

At baseline, the mean PPD of moderate pockets in the MINST group differed significantly from that in the MINST+PACN group ($P < 0.001$). Since the means showed statistically significant baseline differences between the groups, subsequent analysis was conducted by comparing the mean changes in PPD at 8 weeks from baseline.

The conclusions of this study were also drawn based on the mean PPD changes. In both groups, the mean PPD per patient (for both moderate and deep pockets) decreased statistically significantly at 8 weeks compared to baseline. Specifically, at 8 weeks in the MINST group, the mean PPD per patient decreased from 5.0 (SD = 0.3) mm to 2.1 (SD = 0.6) mm in moderate pockets ($P < 0.05$) and from 7.7 (SD = 0.7) mm to 2.7 (SD = 1.2) mm in deep pockets ($P < 0.05$). The adjunctive application of PACN combined with MINST led to a mean PPD reduction per patient at 8 weeks from 5.5 (SD = 0.3) mm to 2.1 (SD = 0.5) mm in moderate pockets ($P < 0.05$) and from 7.8 (SD = 0.5) mm to 2.7 (SD = 0.9) mm in deep pockets ($P < 0.05$) (Figs. 2.9.2.1 and 2.9.2.2).

A comparison of the mean PPD change per patient between the two treatment types revealed that the mean PPD reduction in moderate pockets was statistically significantly greater in the MINST + PACN group than in the MINST group. Specifically, in moderate pockets, the adjunctive application of PACN resulted in an average of 0.5 mm greater reduction in PPD per patient ($P < 0.05$) compared to treatment with MINST alone. However, for deep pockets, no statistically significant differences in the mean PPD per patient were observed between the two treatment modalities.



Fig. 2.9.2.1. Clinical presentation prior to periodontal treatment with proanthocyanidins



Fig. 2.9.2.2. Clinical presentation 8 weeks post-periodontal treatment with proanthocyanidins

Changes in bleeding on probing parameters. The BOP dynamics for moderate and deep periodontal pockets are presented in the table below (Table 2.9.2.2).

Table 2.9.2.2. *Effect of MINST and MINST + PACN on change of clinical parameters after 8 weeks from baseline*

Reduction in characteristic at 8 week from baseline			MINST (n = 23)	MINST + PACN (n = 23)	P
CAL, mm (mean ± SD)	Moderate pockets (4–6 mm)		2.5 ± 0.6	3.1 ± 0.6	0.002*
	Deep pockets (≥ 7 mm)		3.4 ± 1.0	3.7 ± 1.0	0.455*
PPD, mm (mean ± SD)	Moderate pockets (4–6 mm)		2.9 ± 0.6	3.4 ± 0.6	0.019*
	Deep pockets (≥ 7 mm)		5.0 ± 1.1	5.1 ± 1.2	0.805*
% pockets with PPD	Moderate pockets (4–6 mm)		64.2 ± 23.4	55.6 ± 26.8	0.345 [†]
	Deep pockets	≥ 7 mm	17.2 ± 17.2	30.3 ± 19.7	0.030[†]
		≥ 5 mm	69.8 ± 17.6	88.1 ± 11.2	< 0.001[†]
		≥ 6 mm	37.4 ± 21.7	65.9 ± 23.0	< 0.001[†]
		≥ 7 mm	17.2 ± 17.2	30.3 ± 19.7	0.030[†]
		≥ 8 mm	9.4 ± 11.7	18.6 ± 15.8	0.029[†]
		≥ 9 mm	5.2 ± 10.6	5.1 ± 6.9	0.632 [†]
BOP, % (mean ± SD)	Moderate pockets (4–6 mm)		78.1 ± 28.5	66.2 ± 31.9	0.168 [†]
	Deep pockets (≥ 7 mm)		74.8 ± 32.5	64.0 ± 33.8	0.258 [†]
PI, % (mean ± SD)	Moderate pockets (4–6 mm)		46.6 ± 34.2	46.9 ± 43.9	0.783 [†]
	Deep pockets (≥ 7 mm)		53.5 ± 39.7	44.9 ± 46.4	0.663 [†]

Significance level 0.05 are shown in bold. *Independent-samples t test ($\alpha = 0.05$); [†] Independent-samples Mann-Whitney test ($\alpha = 0.05$). BOP – bleeding on probing; CAL – clinical attachment level; MINST – minimally invasive nonsurgical therapy; PACN – proanthocyanidins; PI – plaque index; PPD – pocket probing depth.

Both treatment modalities had a positive effect on reducing inflammation in moderate and deep periodontal pockets, as patient BOP scores decreased at 8 weeks compared to baseline. The reduction in patient BOP was statistically significant in both groups. However, when comparing the changes in patient BOP in moderate and deep pockets between the groups, no significant differences were found.

2.9.3. Changes in Biochemical Parameters

The aim of the biochemical study was to determine whether MMP-3 can be considered a biomarker for periodontitis. The effects of MINST and MINST+PACN treatments on salivary MMP-3 and TIMP-1 levels are presented visually (Figs. 2.9.3.1 and 2.9.3.2).

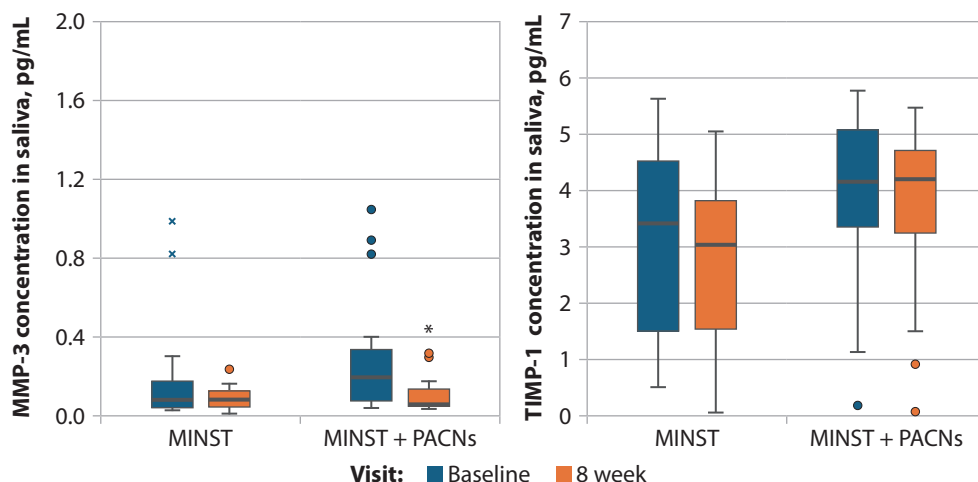


Fig. 2.9.3.1. Effect of specific periodontal treatment on MMP-3 (A) and TIMP-1 (B) concentrations in saliva in pg/ml by group and visit

The boxplots of MMP-3 and TIMP-1 concentrations in saliva are presented. # $P < 0.05$ vs MMP-3 concentration in saliva at the baseline, related samples Wilcoxon signed ranks test.

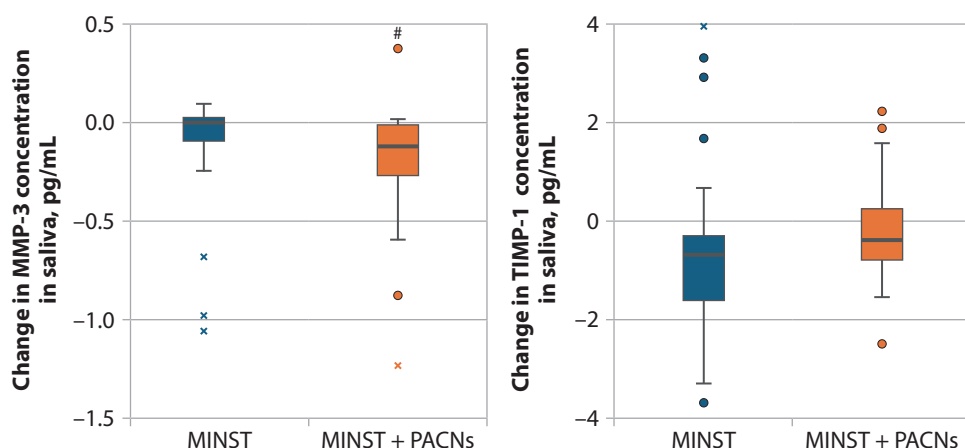


Fig. 2.9.3.2. The effect of specific periodontal treatment on change of MMP-3 and TIMP-1 concentrations in saliva by group

$P < 0.05$ vs the change in MMP-3 concentration in saliva in MINST group, Mann Whitney test.

Following treatment, the MMP-3 concentration in the MINST + PACN group decreased statistically significantly compared to baseline. In contrast, the MMP-3 concentration in the MINST group showed no statistically significant difference compared to baseline. At 8 weeks, no statistically significant improvement in salivary TIMP-1 concentrations was observed in either group compared to baseline. The study demonstrated that salivary MMP-3 levels in the MINST + PACN group decreased to a greater extent than in the MINST group, and this result was statistically significant. Analysis of the changes in TIMP-1 concentration revealed that there were no statistically significant improvements or differences in salivary TIMP-1 levels between the groups.

2.9.4. Adverse effects

No adverse effects were recorded throughout the entire study period.

2.9.5. Economic considerations

Economic assumptions were utilized to evaluate the cost-effectiveness of PACN as a product. It can be assumed that adjunctive materials (e.g., chlorhexidine films, tetracycline fibers) exhibit comparable cost-effectiveness to PACN hydrogel films.

CONCLUSIONS

1. Evaluation of the interactions among proanthocyanidins, bacteria, and cells revealed that proanthocyanidins exhibit selective antibacterial activity against periodontal pathogenic microflora (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), while preserving non-pathogenic microflora in *in vitro* studies.
2. Investigation of the interactions among proanthocyanidins, bacteria, and cells demonstrated that proanthocyanidins preserved cell viability by reducing bacterial proliferation and inhibited the secretion of inflammatory mediators.
3. Comparative analysis of the effects of proanthocyanidins and chlorhexidine digluconate indicated that low concentrations of proanthocyanidins promoted the proliferation of gingival and periodontal ligament fibroblasts, in contrast to chlorhexidine digluconate, which exerted a cytotoxic effect.

4. Analysis of the proliferative capacity of proanthocyanidins showed that proanthocyanidins stimulated the proliferation of gingival and periodontal ligament fibroblasts.
5. The adjunctive use of proanthocyanidins during conservative periodontitis treatment resulted in a significant reduction in clinical parameters (probing pocket depth) compared to conservative periodontitis treatment alone.
6. The adjunctive use of proanthocyanidins during conservative periodontitis treatment led to a further reduction in biochemical parameters (salivary MMP-3 levels) compared to conservative periodontitis treatment alone.

BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS

1. Nascimento GG, Alves-Costa S, Romandini M. Burden of severe periodontitis and edentulism in 2021, with projections up to 2050: The Global Burden of Disease 2021 study. *J of Periodontal Research*. 2024 Oct;59(5):823–67. doi:10.1111/jre.13337
2. Jevdjevic M, Listl S. Global, Regional, and Country-Level Economic Impacts of Oral Conditions in 2019. *J Dent Res*. 2025 Jan;104(1):17–21. doi:10.1177/00220345241281698
3. Botelho J, Machado V, Leira Y, Proença L, Chambrone L, Mendes JJ. Economic burden of periodontitis in the United States and Europe: An updated estimation. *Journal of Periodontology*. 2022 Mar;93(3):373–9. doi:10.1002/JPER.21-0111
4. Sanz M, Herrera D, Kerschull M, Chapple I, Jepsen S, Berglundh T, Sculean A, Tonetti MS, EFP Workshop Participants and Methodological Consultants Treatment of Stage I–III Periodontitis – The EFP S3 Level Clinical Practice Guideline. *J Clinic Periodontology*. 2020;47:4–60. doi:10.1111/jcpe.13290.
5. Fiorillo L, D’Amico C, Mehta V, Cicciù M, Cervino G. Chlorhexidine Cytotoxicity on Oral Behaviors: Last 20 Years Systematic Review. *Oral Oncology Reports*. 2024; 9:100245. doi:10.1016/j.oor.2024.100245.
6. Azzimonti B, Cochis A, Beyrouthy M, Iriti M, Uberti F, Sorrentino R, Landini M, Rimondini L, Varoni E. Essential Oil from Berries of Lebanese *Juniperus Excelsa* M. Bieb Displays Similar Antibacterial Activity to Chlorhexidine but Higher Cytocompatibility with Human Oral Primary Cells. *Molecules*. 2015;20:9344–57. doi:10.3390/molecules20059344.
7. Liu JX, Werner J, Kirsch T, Zuckerman JD, Virk MS. Cytotoxicity Evaluation of Chlorhexidine Gluconate on Human Fibroblasts, Myoblasts, and Osteoblasts. *J. Bone Joint Infect*. 2018;3:165–72. doi:10.7150/jbji.26355.
8. Belibasakis GN, Belstrøm D, Eick S, Gursøyr UK, Johansson A, Könönen E. Periodontal Microbiology and Microbial Etiology of Periodontal Diseases: Historical Concepts and Contemporary Perspectives. *Periodontology 2000*. 2023;00:1–17. doi:10.1111/prd.12473.
9. Soares GMS, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC, Duarte PM, Feres M. Mechanisms of Action of Systemic Antibiotics Used in Periodontal Treatment and Mechanisms of Bacterial Resistance to These Drugs. *J. Appl. Oral Sci*. 2012;20:295–309, doi:10.1590/S1678-77572012000300002.
10. Kumar A, Schweizer H. Bacterial Resistance to Antibiotics: Active Efflux and Reduced Uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57:1486–513. doi:10.1016/j.addr.2005.04.004.
11. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and Resistance Mechanisms of Antibiotics: A Guide for Clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2017;33:300. doi:10.4103/joacp.JOACP_349_15.
12. Willis JR, Gabaldón T. The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. *Microorganisms*. 2020;8:308. doi:10.3390/microorganisms8020308.
13. Lv JM, Wang MT, Zhou WT, Chen JC, Sun CD, Qi XJ. Recent advances in proanthocyanidins: Source valorization, functional potentials, and delivery innovations. *Food Research International*. 2026 Jun;233:118942. doi:10.1016/j.foodres.2026.118942

14. Schoetz K, Erdelmeier C, Germer S, Hauer H. A Detailed View on the Constituents of EPs 7630. *Planta Med.* 2008;74:667–74. doi:10.1055/s-2008-1074515.
15. Reina BD, Malheiros SS, Vieira SM, Ferreira De Andrade P, Dovigo LN. Unlocking the therapeutic potential of *Pelargonium sidoides* natural extract: A scoping review. *Heliyon.* 2024 Dec;10(23):e40554. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e40554
16. Özden FO, Sakallioğlu EE, Sakallioğlu U, Ayas B, Erişgin Z. Effects of Grape Seed Extract on Periodontal Disease: An Experimental Study in Rats. *J Appl Oral Sci.* 2017;25:121–9. doi:10.1590/1678-77572016-0298.
17. Toker H, Balci Yuce H, Lektetur Alpan A, Gevrek F, Elmastas M. Morphometric and Histopathological Evaluation of the Effect of Grape Seed Proanthocyanidin on Alveolar Bone Loss in Experimental Diabetes and Periodontitis. *J Periodontal Res.* 2018;53:478–86. doi:10.1111/jre.12536.
18. Qi Q, Chu M, Yu X, Xie Y, Li Y, Du Y, Liu X, Zhang Z, Shi J, Yan N. Anthocyanins and Proanthocyanidins: Chemical Structures, Food Sources, Bioactivities, and Product Development. *Food Reviews International.* 2023;39:4581–609. doi:10.1080/87559129.2022.2029479.
19. Nawrot-Hadzik I, Matkowski A, Kubasiewicz-Ross P, Hadzik J. Proanthocyanidins and Flavan-3-Ols in the Prevention and Treatment of Periodontitis – Immunomodulatory Effects, Animal and Clinical Studies. *Nutrients.* 2021;13:239. doi:10.3390/nut13010239.
20. Galarraga-Vinueza ME, Dohle E, Ramanauskaite A, Al-Maawi S, Obreja K, Magini R, Sader R, Ghanaati S, Schwarz F. Anti-Inflammatory and Macrophage Polarization Effects of Cranberry Proanthocyanidins (PACs) for Periodontal and Peri-Implant Disease Therapy. *J Periodontal Res.* 2020;55:821–9. doi:10.1111/jre.12773.
21. Nawrot-Hadzik I, Matkowski A, Hadzik J, Dobrowolska-Czopor B, Olchowcy C, Dominiak M, Kubasiewicz-Ross P. Proanthocyanidins and Flavan-3-Ols in the Prevention and Treatment of Periodontitis-Antibacterial Effects. *Nutrients.* 2021;13:165. doi:10.3390/nut13010165.
22. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Tran MX, Stohs SJ. Oxygen Free Radical Scavenging Abilities of Vitamins C and E, and a Grape Seed Proanthocyanidin Extract in Vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1997;95:179–89.
23. Larrauri M, Zunino MP, Zygadlo JA, Grosso NR, Nepote V. Chemical Characterization and Antioxidant Properties of Fractions Separated from Extract of Peanut Skin Derived from Different Industrial Processes. *Industrial Crops and Products.* 2016;94:964–71. doi:10.1016/j.indcrop.2016.09.066.
24. Li S, Xu M, Niu Q, Xu S, Ding Y, Yan Y, Guo S, Li F. Efficacy of Procyanidins against In Vivo Cellular Oxidative Damage: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE.* 2015;10:e0139455, doi:10.1371/journal.pone.0139455.
25. Yun JH, Pang EK, Kim CS, Yoo YJ, Cho KS, Chai JK, Kim CK, Choi SH. Inhibitory Effects of Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin Gallate on the Expression of Matrix Metalloproteinase-9 and on the Formation of Osteoclasts. *J Periodontal Res.* 2004;39:300–7. doi:10.1111/j.1600-0765.2004.00743.x
26. Tanabe S, Santos J, La VD, Howell AB, Grenier D. A-Type Cranberry Proanthocyanidins Inhibit the RANKL-Dependent Differentiation and Function of Human Osteoclasts. *Molecules.* 2011;16:2365–74. doi:10.3390/molecules16032365.
27. La VD, Howell AB, Grenier D. Anti-*Porphyromonas Gingivalis* and Anti-Inflammatory Activities of A-Type Cranberry Proanthocyanidins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:1778–84. doi:10.1128/AAC.01432-09.

28. Bodet C, Piché M, Chandad F, Grenier D. Inhibition of Periodontopathogen-Derived Proteolytic Enzymes by a High-Molecular-Weight Fraction Isolated from Cranberry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;57:685–90. doi:10.1093/jac/dkl031.
29. Huang J, Liu L, Jin S, Zhang Y, Zhang L, Li S, Song A, Yang P. Proanthocyanidins Promote Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Fibroblasts in Inflammatory Environment Via Suppressing NF- κ B Signal Pathway. *Inflammation*. 2020;43:892–902. doi:10.1007/s10753-019-01175-y.
30. Yang H, Liu WC, Liu X, Li Y, Lin C, Lin YM, Wang AN, Nguyen TT, Lin YC, Chung RJ. Study on Proanthocyanidins Crosslinked Collagen Membrane for Guided Bone Tissue Regeneration. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2021;19:22808000211005379. doi:10.1177/22808000211005379.
31. Tenkumo T, Aobulikasimu A, Asou Y, Shirato M, Shishido S, Kanno T, Niwano Y, Sasaki K, Nakamura K. Proanthocyanidin-Rich Grape Seed Extract Improves Bone Loss, Bone Healing, and Implant Osseointegration in Ovariectomized Animals. *Sci Rep* 2020, 10, 8812, doi:10.1038/s41598-020-65403-4.
32. Niwano Y, Shishido S, Shirato M, Kohzaki H, Nakamura K. Therapeutic Potential of Proanthocyanidins in Dentistry: A Focus on Periodontal Disease and on Dental Implants in Osteoporotic Patients. *Antioxidants*. 2025;14:850. doi:10.3390/antiox14070850.
33. Preshaw PM. Detection and Diagnosis of Periodontal Conditions Amenable to Prevention. *BMC Oral Health*. 2015;15:S5. doi:10.1186/1472-6831-15-S1-S5.
34. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and Grading of Periodontitis: Framework and Proposal of a New Classification and Case Definition. *J Periodontol*. 2018;89(Suppl 1):S159–S172. doi:10.1002/JPER.18-0006.
35. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global Burden of Severe Periodontitis in 1990–2010: A Systematic Review and Meta-Regression. *J Dent Res*. 2014;93:1045–53. doi:10.1177/0022034514552491.
36. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, Murray CJL, Marcenes W, GBD 2015 Oral Health Collaborators, Abyu GY, et al. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res*. 2017;96:380–7. doi:10.1177/0022034517693566.
37. Sun R, Pan Q, Zhou Y, Wang R, Guo Y, Huo Y, et al. Global and regional incidence burden of periodontal diseases. *The Journal of the American Dental Association*. 2026 Jan;157(1):83-94.e4. doi:10.1016/j.adaj.2025.09.018
38. World Health Organization. (2024). Global health estimates: Leading causes of death [Data set]. who.int.
39. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontology*. 2018 Jun;45(S20). doi:10.1111/jcpe.12946
40. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2013 Jun;62(1):59–94. doi:10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x
41. Darby I. Risk factors for periodontitis & peri-implantitis. *Periodontology* 2000. 2022 Oct;90(1):9–12. doi:10.1111/prd.12447
42. Bosshardt DD. The Periodontal Pocket: Pathogenesis, Histopathology and Consequences. *Periodontology* 2000. 2018;76:43–50. doi:10.1111/prd.12153.

43. Hans M, Hans VM. Toll-like Receptors and Their Dual Role in Periodontitis: A Review. *Journal of Oral Science*. 2011;53:263–71. doi:10.2334/josnusd.53.263.
44. Van Winkelhoff AJ, Loos BG, Van Der Reijden WA, Van Der Velden U. Porphyromonas Gingivalis, Bacteroides Forsythus and Other Putative Periodontal Pathogens in Subjects with and without Periodontal Destruction. *J Clinic Periodontology*. 2002; 29:1023–8. doi:10.1034/j.1600-051X.2002.291107.x.
45. Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T. Mixed Red-Complex Bacterial Infection in Periodontitis. *International Journal of Dentistry*. 2013;2013:587279. doi:10.1155/2013/587279.
46. Martínez-García M, Hernández-Lemus E. Periodontal Inflammation and Systemic Diseases: An Overview. *Front. Physiol*. 2021;12:709438. doi:10.3389/fphys.2021.709438.
47. Lin B, Fan Y, Yang X, Pathak J, Zhong M. MMP-12 and Periodontitis: Unraveling the Molecular Pathways of Periodontal Tissue Destruction. *JIR*. 2024 Oct;Volume 17:7793–806. doi:10.2147/JIR.S480466
48. Mendoza-Juárez D, Sánchez-Gutiérrez M, Izquierdo-Vega AJ, Madrigal-Santillán EO, Velázquez-González C, Izquierdo-Vega JA. Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Their Potential Clinical Application in Periodontitis. *Diseases*. 2025 Sep 6; 13(9):296. doi:10.3390/diseases13090296
49. Alarcón-Sánchez MA, Rodríguez-Montañó R, Mosaddad SA, Heboyán A. Levels of IL-1 β , MMP-8, and MMP-9 in the Saliva of Subjects With Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Laboratory Analysis*. 2025 May;39(10): e70040. doi:10.1002/jcla.70040
50. Kwon T, Lamster IB, Levin L. Current Concepts in the Management of Periodontitis. *International Dental Journal*. 2021 Dec;71(6):462–76. doi:10.1111/idj.12630
51. Lang NP, Bartold PM. Periodontal Health. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20):S9–S16. doi:10.1111/jcpe.12936.
52. Pihlstrom BL. Measurement of attachment level in clinical trials: probing methods. *J Periodontol*. 1992 Dec;63(12 Suppl):1072–7. doi:10.1902/jop.1992.63.12s.1072
53. Lang NP, Joss A, Orsanic T, Gusberti FA, Siegrist BE. Bleeding on Probing. A Predictor for the Progression of Periodontal Disease? *J Clinic Periodontology*. 1986; 13:590–6. doi:10.1111/j.1600-051X.1986.tb00852.x.
54. Jacobs R, Fontenele RC, Lahoud P, Shujaat S, Bornstein MM. Radiographic Diagnosis of Periodontal Diseases – Current Evidence versus Innovations. *Periodontology* 2000. 2024;95:51–69. doi:10.1111/prd.12580.
55. Kim T, Obst C, Zehaczek S, Geenen C. Detection of Bone Loss With Different X-Ray Techniques in Periodontal Patients. *Journal of Periodontology*. 2008;79:1141–9. doi:10.1902/jop.2008.070578.
56. Kim GY, Kim S, Chang JS, Pyo, S.-W. Advancements in Methods of Classification and Measurement Used to Assess Tooth Mobility: A Narrative Review. *JCM*. 2023; 13(1):142. doi:10.3390/jcm13010142.
57. Laster L, Laudendach KW, Stoller NH. An Evaluation of Clinical Tooth Mobility Measurements. *Journal of Periodontology*. 1975;46:603–7. doi:10.1902/jop.1975.46.10.603.
58. Wasserman BH, Geiger AM, Turgeon LR. Relationship of Occlusion and Periodontal Disease Part VII – Mobility. *Journal of Periodontology*. 1973;44:572–8. doi:10.1902/jop.1973.44.9.572.
59. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4:1–6. doi:10.1902/annals.1999.4.1.1.

60. Carranza FA, Newman MG. Clinical Periodontology 8th Edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia, 1996.
61. Taylor JJ, Preshaw PM. Gingival Crevicular Fluid and Saliva. Periodontology 2000. 2016;70:7–10. doi:10.1111/prd.12118.
62. Korte DL, Kinney J. Personalized Medicine: An Update of Salivary Biomarkers for Periodontal Diseases. Periodontol 2000. 2016;70:26–37. doi:10.1111/prd.12103.
63. Stadler AF, Angst PDM, Arce RM, Gomes SC, Oppermann RV, Susin C. Gingival Crevicular Fluid Levels of Cytokines/Chemokines in Chronic Periodontitis: A Meta-analysis. J Clin Periodontology. 2016;43:727–45. doi:10.1111/jcpe.12557.
64. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. In Progress in Molecular Biology and Translational Science; Elsevier, 2017; Vol. 147, pp. 1–73.
65. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and Immune Pathways in the Pathogenesis of Periodontal Disease. Periodontology 2000. 2014;64:57–80. doi:10.1111/prd.12002.
66. Zhang JM, An J. Cytokines, Inflammation, and Pain. International Anesthesiology Clinics. 2007;45:27–37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e.
67. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The Role of Matrix Metalloproteinases in the Oral Environment. Acta Odontologica Scandinavica. 2007;65:1–13. doi:10.1080/00016350600963640.
68. Gursøy UK, Könönen E, Pradhan-Palikhe P, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Suominen-Taipale L, Sorsa T. Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as Markers of Advanced Periodontitis. J Clin Periodontol. 2010;37:487–93. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01563.x.
69. Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee H, Golub LM, Brown DL, Mäntylä P. Matrix Metalloproteinases: Contribution to Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Periodontal Inflammation. Annals of Medicine. 2006;38:306–21. doi:10.1080/07853890600800103.
70. Pourtaghi N, Radvar M, Mooney J, Kinane DF. The Effect of Subgingival Antimicrobial Therapy on the Levels of Stromelysin and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in Gingival Crevicular Fluid. J Periodontol. 1996;67:866–70. doi:10.1902/jop.1996.67.9.866.
71. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, Konttinen YT, Sorsa T. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Gingival Crevicular Fluid and Saliva of Periodontitis Patients. J Clin Periodontology. 1996;23:1127–32. doi:10.1111/j.1600-051X.1996.tb01814.x.
72. Zhao Y, Jin Y, Ren YS, Song LM, Li J, Lin XP. [Expression of matrix metalloproteinase-3 in patients with rheumatoid arthritis and its correlation with chronic periodontitis and rheumatoid arthritis]. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2019;54:164–9. doi:10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2019.03.004.
73. Gonçalves PF, Huang H, McAninley S, Alfant B, Harrison P, Aukhil I, Walker C, Shaddox LM. Periodontal Treatment Reduces Matrix Metalloproteinase Levels in Localized Aggressive Periodontitis. J Periodontol. 2013;84:1801–8. doi:10.1902/jop.2013.130002.
74. Morelli T, Stella M, Barros SP, Marchesan JT, Moss KL, Kim SJ, Yu N, Aspiras MB, Ward M, Offenbacher S. Salivary Biomarkers in a Biofilm Overgrowth Model. J Periodontol. 2014;85:1770–8. doi:10.1902/jop.2014.140180.

75. Deas DE, Moritz AJ, Sagun RS, Gruwell SF, Powell CA. Scaling and Root Planing vs. Conservative Surgery in the Treatment of Chronic Periodontitis. *Periodontology* 2000. 2016;71:128–39. doi:10.1111/prd.12114.
76. Figuero E, Nóbrega DF, García-Gargallo M, Tenuta LMA, Herrera D, Carvalho JC. Mechanical and Chemical Plaque Control in the Simultaneous Management of Gingivitis and Caries: A Systematic Review. *J Clin Periodontol*. 2017; 44 (Suppl. 18): S116–S134. doi:10.1111/jcpe.12674.
77. Trombelli L, Farina R, Pollard A, Claydon N, Franceschetti G, Khan I, West N. Efficacy of Alternative or Additional Methods to Professional Mechanical Plaque Removal during Supportive Periodontal Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Periodontology*. 2020;47:144–54. doi:10.1111/jcpe.13269.
78. Lang NP, Tonetti MS. Periodontal Risk Assessment (PRA) for Patients in Supportive Periodontal Therapy (SPT). *Oral Health Prev Dent*. 2003;1:7–16.
79. Angst PDM, Finger Stadler A, Mendez M, Oppermann RV, Van Der Velden U, Gomes SC. Supportive Periodontal Therapy in Moderate-to-severe Periodontitis Patients: A Two-year Randomized Clinical Trial. *J Clin Periodontology*. 2019;46: 1083–93. doi:10.1111/jcpe.13178.
80. Suvan J, Leira Y, Moreno Sancho FM, Graziani F, Derks J, Tomasi C. Subgingival Instrumentation for Treatment of Periodontitis. A Systematic Review. *J Clin Periodontology*. 2020;47:155–75. doi:10.1111/jcpe.13245.
81. Lang NP, Tan WC, Krähenmann MA, Zwahlen M. A Systematic Review of the Effects of Full-mouth Debridement with and without Antiseptics in Patients with Chronic Periodontitis. *J Clin Periodontology*. 2008;35:8–21. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01257.x.
82. Fang H, Han M, Li QL, Cao CY, Xia R, Zhang ZH. Comparison of Full-mouth Disinfection and Quadrant-wise Scaling in the Treatment of Adult Chronic Periodontitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *J of Periodontal Research*. 2016;51: 417–30. doi:10.1111/jre.12326.
83. Pontillo V, Mizziak DB, Maller ACPA, Nassar PO, Nassar CA. Comparative Clinical Evaluation between Conventional Periodontal Treatment and Full Mouth Disinfection. *J Int Acad Periodontol*. 2018;20:123–30.
84. Santuchi CC, Cortelli JR, Cortelli SC, Cota LOM, Fonseca DC, Alencar CO, Costa FO. Scaling and Root Planing per Quadrant Versus One-Stage Full-Mouth Disinfection: Assessment of the Impact of Chronic Periodontitis Treatment on Quality of Life – A Clinical Randomized, Controlled Trial. *Journal of Periodontology*. 2016;87: 114–23. doi:10.1902/jop.2015.150105.
85. Serino G, Rosling B, Ramberg P, Socransky SS, Lindhe J. Initial Outcome and Long-term Effect of Surgical and Non-surgical Treatment of Advanced Periodontal Disease. *J Clin Periodontology*. 2001;28:910–6. doi:10.1034/j.1600-051x.2001.028010910.x.
86. Mailoa J, Lin GH, Khoshkam V, MacEachern M, Chan HL, Wang HL. Long-Term Effect of Four Surgical Periodontal Therapies and One Non-Surgical Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Periodontology*. 2015;86:1150–8. doi:10.1902/jop.2015.150159.
87. Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, Herrera D. Nonsurgical and Surgical Treatment of Periodontitis: How Many Options for One Disease? *Periodontol* 2000. 2017;75: 152–88. doi:10.1111/prd.12201.

88. Li S, Jiang G, Wang S, Wang M, Wu Y, Zhang J, Liu X, Zhong L, Zhou M, Xie S, et al. Emergence and Global Spread of a Dominant Multidrug-Resistant Clade within *Acinetobacter Baumannii*. *Nat Commun*. 2025;16:2787. doi:10.1038/s41467-025-58106-9.
89. Hong TC, El-Omar EM, Kuo YT, Wu JY, Chen MJ, Chen CC, Fang YJ, Leow AHR, Lu H, Lin JT, et al. Primary Antibiotic Resistance of *Helicobacter Pylori* in the Asia-Pacific Region between 1990 and 2022: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 2024;9:56–67. doi:10.1016/S2468-1253(23)00281-9.
90. Da Costa LFNP, Amaral CDSF, Barbirato DDS, Leão ATT, Fogacci MF. Chlorhexidine Mouthwash as an Adjunct to Mechanical Therapy in Chronic Periodontitis. *The Journal of the American Dental Association*. 2017;148:308–18. doi:10.1016/j.adaj.2017.01.021.
91. Herrera D, Matesanz P, Martín C, Oud V, Feres M, Teughels W. Adjunctive Effect of Locally Delivered Antimicrobials in Periodontitis Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Periodontology*. 2020;47:239–56. doi:10.1111/jcpe.13230.
92. Kayser O, Kolodziej H. Antibacterial Activity of Extracts and Constituents of *Pelargonium Sidoides* and *Pelargonium Reniforme*. *Planta Med*. 1997;63:508–10. doi:10.1055/s-2006-957752.
93. Chen ZY, Chan PT, Ho KY, Fung KP, Wang J. Antioxidant Activity of Natural Flavonoids Is Governed by Number and Location of Their Aromatic Hydroxyl Groups. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1996;79:157–63. doi:10.1016/0009-3084(96)02523-6.
94. Tao W, Zhang Y, Shen X, Cao Y, Shi J, Ye X, Chen S. Rethinking the Mechanism of the Health Benefits of Proanthocyanidins: Absorption, Metabolism, and Interaction with Gut Microbiota. *Comp Rev Food Sci Food Safe*. 2019;18:971–85. doi:10.1111/1541-4337.12444.
95. Salinas-Sánchez D, Jiménez-Ferrer E, Sánchez-Sánchez V, Zamilpa A, González-Cortazar M, Tortoriello J; Herrera-Ruiz M. Anti-Inflammatory Activity of a Polymeric Proanthocyanidin from *Serjania Schiedeana*. *Molecules*. 2017;22(6):863. doi:10.3390/molecules22060863.
96. Heijnen CGM, Haenen GRMM, Van Acker FAA, Van Der Vijgh WJF, Bast A. Flavonoids as Peroxynitrite Scavengers: The Role of the Hydroxyl Groups. *Toxicology in Vitro*. 2001;15:3–6. doi:10.1016/S0887-2333(00)00053-9.
97. Ma X, Wang R, Yu S, Lu G, Yu Y, Jiang C. Anti-Inflammatory Activity of Oligomeric Proanthocyanidins Via Inhibition of NF- κ B and MAPK in LPS-Stimulated MAC-T Cells. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2020;30:1458–66. doi:10.4014/jmb.2006.06030.
98. Huo Q, Kong X, Yang X, Wang Y, Ma L, Luo M, Xu D. Molecular Modification of Proanthocyanidins. *Bioengineered*. 2016;7:274–81. doi:10.1080/21655979.2016.1197745.
99. Wang Y, Song E, Bai B, Vanhoutte PM. Toll-like Receptors Mediating Vascular Malfunction: Lessons from Receptor Subtypes. *Pharmacology & Therapeutics*. 2016;158:91–100. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.12.005.
100. Wong SW, Kwon MJ, Choi AMK, Kim HP, Nakahira K, Hwang DH. Fatty Acids Modulate Toll-like Receptor 4 Activation through Regulation of Receptor Dimerization and Recruitment into Lipid Rafts in a Reactive Oxygen Species-Dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284:27384–92. doi:10.1074/jbc.M109.044065.

101. Zhang L, Chen J, Liao H, Li C, Chen M. Anti-Inflammatory Effect of Lipophilic Grape Seed Proanthocyanidin in RAW 264.7 Cells and a Zebrafish Model. *Journal of Functional Foods*. 2020;75:104217. doi:10.1016/j.jff.2020.104217.
102. Han S, Gao H, Chen S, Wang Q, Li X, Du LJ, Li J, Luo YY, Li JX, Zhao LC, et al. Procyanidin A1 Alleviates Inflammatory Response Induced by LPS through NF- κ B, MAPK, and Nrf2/HO-1 Pathways in RAW264.7 Cells. *Sci Rep*. 2019;9:15087. doi:10.1038/s41598-019-51614-x.
103. Zughaibi TA, Suhail M, Tarique M, Tabrez S. Targeting PI3K/Akt/mTOR Pathway by Different Flavonoids: A Cancer Chemopreventive Approach. *Int J Mol Sci*. 2021; 22:12455. doi:10.3390/ijms222212455.
104. Chamcheu JC, Adhami VM, Esnault S, Sechi M, Siddiqui IA, Satyshur KA, Syed DN, Dodwad SJM, Chaves-Rodriguez MI, Longley BJ, et al. Dual Inhibition of PI3K/Akt and mTOR by the Dietary Antioxidant, Delphinidin, Ameliorates Psoriatic Features In Vitro and in an Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Disease in Mice. *Antioxid Redox Signal*. 2017;26:49–69. doi:10.1089/ars.2016.6769.
105. Chu H, Tang Q, Huang H, Hao W, Wei X. Grape-Seed Proanthocyanidins Inhibit the Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Mediator Expression in RAW264.7 Macrophages by Suppressing MAPK and NF-Kb Signal Pathways. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016;41:159–66. doi:10.1016/j.etap.2015.11.018.
106. Shuhua Y, Lingqi M, Yunlong D, He T, Yao S, Peng L. Proanthocyanidins Activate Nrf2/ARE Signaling Pathway in Intestinal Epithelial Cells by Inhibiting the Ubiquitinated Degradation of Nrf2. *BioMed Research International*. 2022:8562795. doi:10.1155/2022/8562795.
107. Wan F, Lenardo MJ. The Nuclear Signaling of NF- κ B: Current Knowledge, New Insights, and Future Perspectives. *Cell Res*. 2010;20:24–33. doi:10.1038/cr.2009.137.
108. Scheidereit C. I κ B Kinase Complexes: Gateways to NF- κ B Activation and Transcription. *Oncogene*. 2006;25:6685–705. doi:10.1038/sj.onc.1209934.
109. Martinez-Micaelo N, González-Abuín N, Ardèvol A, Pinent M, Blay MT. Procyanidins and Inflammation: Molecular Targets and Health Implications. *BioFactors*. 2012; 38:257–65. doi:10.1002/biof.1019.
110. Yang L, Xian D, Xiong X, Lai R, Song J, Zhong J. Proanthocyanidins against Oxidative Stress: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *BioMed Research International*. 2018;2018:1–11. doi:10.1155/2018/8584136.
111. Jekabsone A, Sile I, Cochis A, Makrecka-Kuka M, Laucaityte G, Makarova E, Rimondini L, Bernotiene R, Raudone L, Vedlugaite E, et al. Investigation of Antibacterial and Antiinflammatory Activities of Proanthocyanidins from Pelargonium Sidoides DC Root Extract. *Nutrients*. 2019;11:2829. doi:10.3390/nu11112829.
112. Ye H, Sun J, He L, Ai C, Jin W, Abd El-Aty AM. Beneficial Effects of Proanthocyanidins on Skin Aging: A Review. *Front. Nutr*. 2025;12:1650328. doi:10.3389/fnut.2025.1650328.
113. Ma Y, Wang J, Fan J, Jia H, Li J. Interrelation of Natural Polyphenol and Fibrosis in Diabetic Nephropathy. *Molecules*. 2024;30(1):20. doi:10.3390/molecules30010020.
114. Meng XM, Tang PMK, Li J, Lan HY. TGF- β ²/Smad Signaling in Renal Fibrosis. *Front. Physiol*. 2015;6:82. doi:10.3389/fphys.2015.00082.
115. Mao TK, Water JVD, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. Cocoa Flavonols and Procyanidins Promote Transforming Growth Factor- β ₁ Homeostasis in Peripheral Blood Mononuclear Cells¹. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228:93–9. doi:10.1177/153537020322800113.

116. Liang J, Zhou Y, Zhang N, Wang D, Cheng X, Li K, Huang R, Lu Y, Wang H, Han D, et al. The Phosphorylation of the Smad2/3 Linker Region by Nemo-like Kinase Regulates TGF- β Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2021;296:100512. doi:10.1016/j.jbc.2021.100512.
117. Bategay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R. TGF- β Induces Bimodal Proliferation of Connective Tissue Cells via Complex Control of an Autocrine PDGF Loop. *Cell*. 1990;63:515–24. doi:10.1016/0092-8674(90)90448-N.
118. Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, Van Kooten C, Müller GA. TGF- β 1 Induces Proliferation in Human Renal Fibroblasts via Induction of Basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2). *Kidney International*. 2001;59:579–92. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.059002579.x.
119. Li AG, Wang D, Feng XH, Wang XJ. Latent TGF β 1 Overexpression in Keratinocytes Results in a Severe Psoriasis-like Skin Disorder. *EMBO J*. 2004;23:1770–81. doi:10.1038/sj.emboj.7600183.
120. Wilkes MC, Mitchell H, Penheiter SG, Doré JJ, Suzuki K, Edens M, Sharma DK, Pagano RE, Leof EB. Transforming Growth Factor- β Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Independent of Smad2 and Smad3 and Regulates Fibroblast Responses via P21-Activated Kinase-2. *Cancer Research*. 2005;65:10431–40. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1522.
121. Shi X, Young CD, Zhou H, Wang XJ. Transforming Growth Factor- β Signaling in Fibrotic Diseases and Cancer-Associated Fibroblasts. *Biomolecules*. 2020;10:1666. doi:10.3390/biom10121666.
122. Deng Z, Fan T, Xiao C, Tian H, Zheng Y, Li C, He J. TGF- β Signaling in Health, Disease and Therapeutics. *Sig Transduct Target Ther*. 2024;9:61. doi:10.1038/s41392-024-01764-w.
123. Kim TH, Jeon EJ, Cheung DY, Kim CW, Kim SS, Park SH, Han SW, Kim MJ, Lee YS, Cho ML, et al. Gastroprotective Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extracts against Nonsteroid Anti-Inflammatory Drug-Induced Gastric Injury in Rats. *Gut Liver*. 2013;7:282–9. doi:10.5009/gnl.2013.7.3.282.
124. Terra X, Pallarés V, Ardèvol A, Bladé C, Fernández-Larrea J, Pujadas G, Salvadó J, Arola L, Blay M. Modulatory Effect of Grape-Seed Procyanidins on Local and Systemic Inflammation in Diet-Induced Obesity Rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2011;22:380–7. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.03.006.
125. Chen Q, Liu XF, Zheng PS. Grape Seed Proanthocyanidins (GSPs) Inhibit the Growth of Cervical Cancer by Inducing Apoptosis Mediated by the Mitochondrial Pathway. *PLoS ONE*. 2014;9:e107045. doi:10.1371/journal.pone.0107045.
126. Kresty LA, Howell AB, Baird M. Cranberry Proanthocyanidins Induce Apoptosis and Inhibit Acid-Induced Proliferation of Human Esophageal Adenocarcinoma Cells. *J. Agric. Food Chem*. 2008;56:676–80. doi:10.1021/jf071997t.
127. Tsujita T, Shintani T, Sato H. Preparation and Characterisation of Peanut Seed Skin Polyphenols. *Food Chemistry*. 2014;151:15–20. doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.072.
128. Razavi SM, Gholamin S, Eskandari A, Mohsenian N, Ghorbanihaghjo A, Delazar A, Rashtchizadeh N, Keshtkar-Jahromi M, Argani H. Red Grape Seed Extract Improves Lipid Profiles and Decreases Oxidized Low-Density Lipoprotein in Patients with Mild Hyperlipidemia. *Journal of Medicinal Food*. 2013;16:255–8. doi:10.1089/jmf.2012.2408.

129. Liu X, Qiu J, Zhao S, You B, Ji X, Wang Y, Cui X, Wang Q, Gao H. Grape Seed Proanthocyanidin Extract Alleviates Ouabain-Induced Vascular Remodeling through Regulation of Endothelial Function. *Molecular Medicine Reports*. 2012;6:949–54. doi:10.3892/mmr.2012.1026.
130. Quesada H, Del Bas JM, Pajuelo D, Díaz S, Fernandez-Larrea J, Pinent M, Arola L, Salvadó MJ, Bladé C. Grape Seed Proanthocyanidins Correct Dyslipidemia Associated with a High-Fat Diet in Rats and Repress Genes Controlling Lipogenesis and VLDL Assembling in Liver. *Int J Obes*. 2009;33:1007–12. doi:10.1038/ijo.2009.136.
131. Preuss HG, Wallerstedt D, Talpur N, Tutuncuoglu SO, Echard B, Myers A, Bui M, Bagchi D. Effects of Niacin-Bound Chromium and Grape Seed Proanthocyanidin Extract on the Lipid Profile of Hypercholesterolemic Subjects: A Pilot Study. *J Med*. 2000;31:227–46.
132. Zhang Y, Huang Y, Pang Y, Zhu Z, Zhang Y, Liu Q, Zhang X, Liu Y. Modification of Collagen with Proanthocyanidins by Mimicking the Bridging Role of Glycosaminoglycans for Dentine Remineralization. *Materials & Design*. 2021;210:110067. doi:10.1016/j.matdes.2021.110067.
133. Enrich-Essvein T, González-López S, Rodríguez-Navarro AB, Cifuentes-Jiménez C, Maravic T, Mazzitelli C, Checchi V, Josic U, Mazzoni A, Breschi L. Effects of Proanthocyanidin-Functionalized Hydroxyapatite Nanoparticles on Dentin Bonding. *Clin Oral Invest*. 2024;28:444, doi:10.1007/s00784-024-05836-7
134. Fang M, Liu R, Xiao Y; Li F; Wang D; Hou R; Chen J. Biomodification to Dentin by a Natural Crosslinker Improved the Resin–Dentin Bonds. *Journal of Dentistry*. 2012; 40:458–66. doi:10.1016/j.jdent.2012.02.008.
135. Castellan CS, Bedran-Russo AK, Antunes A, Pereira PNR. Effect of Dentin Biomodification Using Naturally Derived Collagen Cross-Linkers: One-Year Bond Strength Study. *International Journal of Dentistry*. 2013;2013:1–6. doi:10.1155/2013/918010.
136. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Tran MX, Stohs SJ. Oxygen Free Radical Scavenging Abilities of Vitamins C and E, and a Grape Seed Proanthocyanidin Extract in Vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1997;95:179–89.
137. La VD, Howell AB, Grenier D. Cranberry Proanthocyanidins Inhibit MMP Production and Activity. *J Dent Res*. 2009;88:627–32. doi:10.1177/0022034509339487.
138. Lombardo Bedran TB, Palomari Spolidorio D, Grenier D. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate and Cranberry Proanthocyanidins Act in Synergy with Cathelicidin (LL-37) to Reduce the LPS-Induced Inflammatory Response in a Three-Dimensional Co-Culture Model of Gingival Epithelial Cells and Fibroblasts. *Archives of Oral Biology*. 2015;60:845–53. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.02.021.
139. Ben Lagha A, LeBel G, Grenier D. Dual Action of Highbush Blueberry Proanthocyanidins on *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* and the Host Inflammatory Response. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18:10. doi:10.1186/s12906-017-2072-x.
140. Ben Lagha A, Howell A, Grenier D. Cranberry Proanthocyanidins Neutralize the Effects of *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* Leukotoxin. *Toxins*. 2019;11: 662. doi:10.3390/toxins11110662.
141. Savickiene N, Jekabsone A, Raudone L, Abdelgeliel AS, Cochis A, Rimondini L, Makarova E, Grinberga S, Pugovics O, Dambrova M, et al. Efficacy of Proanthocyanidins from *Pelargonium Sidoides* Root Extract in Reducing *P. Gingivalis* Viability While Preserving Oral Commensal *S. Salivarius*. *Materials*. 2018;11:1499. doi: 10.3390/ma11091499.

142. Shahzad M, Millhouse E, Culshaw S, Edwards CA, Ramage G, Combet E. Selected Dietary (Poly)Phenols Inhibit Periodontal Pathogen Growth and Biofilm Formation. *Food Funct.* 2015;6:719–29. doi:10.1039/C4FO01087F.
143. Schmuck J, Beckert S, Brandt S, Löhr G, Hermann F, Schmidt TJ, Beikler T, Hensel A. Extract from *Rumex Acetosa* L. for Prophylaxis of Periodontitis: Inhibition of Bacterial In Vitro Adhesion and of Gingipains of *Porphyromonas Gingivalis* by Epicatechin-3-O-(4 β →8)-Epicatechin-3-O-Gallate (Procyanidin-B2-Di-Gallate). *PLoS ONE.* 2015;10:e0120130. doi:10.1371/journal.pone.0120130.
144. De La Iglesia R, Milagro FI, Campión J, Boqué N, Martínez JA. Healthy Properties of Proanthocyanidins. *BioFactors.* 2010;36:159–68. doi:10.1002/biof.79.
145. Balalaie A, Rezvani MB, Mohammadi Basir M. Dual Function of Proanthocyanidins as Both MMP Inhibitor and Crosslinker in Dentin Biomodification: A Literature Review. *Dental Materials Journal.* 2018;37:173–82. doi:10.4012/dmj.2017-062.
146. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Inhibition of Host Extracellular Matrix Destructive Enzyme Production and Activity by a High-molecular-weight Cranberry Fraction. *J of Periodontal Research.* 2007;42:159–68. doi:10.1111/j.1600-0765.2006.00929.x.
147. Sczepanik FSC, Grossi ML, Casati M, Goldberg M, Glogauer M, Fine N, Tenenbaum HC. Periodontitis Is an Inflammatory Disease of Oxidative Stress: We Should Treat It That Way. *Periodontology 2000.* 2020;84:45–68. doi:10.1111/prd.12342.
148. Wu Y, Wang X, Zhang Y, Wen Z, Li Y, Zhang K, Gosar N, Li Q, Mao J, Gong S. Proanthocyanidins Ameliorate LPS-Inhibited Osteogenesis of PDLSCs by Restoring Lysine Lactylation. *IJMS.* 2024;25:2947. doi:10.3390/ijms25052947.
149. Liu Z, Li Q, Wang X, Wu Y, Zhang Z, Mao J, Gong S. Proanthocyanidin Enhances the Endogenous Regeneration of Alveolar Bone by Elevating the Autophagy of PDLSCs. *J of Periodontal Research.* 2023;58:1300–14. doi:10.1111/jre.13186.
150. Liu WC, Wang HY, Lee TH, Chung RJ. Gamma-Poly Glutamate/Gelatin Composite Hydrogels Crosslinked by Proanthocyanidins for Wound Healing. *Materials Science and Engineering: C.* 2019;101:630–9. doi:10.1016/j.msec.2019.04.018.
151. Li S, Panda AK, Liu X, Lin YC, Huang WY, Lin C, Zhao G, Chung RJ. Preparation and Biocompatibility Studies of Collagen/Hyaluronic Acid/Oligomeric Proanthocyanidins Composites. *Materials Chemistry and Physics.* 2021;272:124959. doi:10.1016/j.matchemphys.2021.124959.
152. Li J, Zhan L, Barlow J, Lynch RJ, Zhou X, Liu T. [Effect of tea polyphenol on the demineralization and remineralization of enamel in vitro]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2004;35:364–6.
153. Epasinghe DJ, Burrow MF, Yiu CKY. Effect of Proanthocyanidin on Ultrastructure and Mineralization of Dentine Collagen. *Archives of Oral Biology.* 2017;84:29–36. doi:10.1016/j.archoralbio.2017.09.012.
154. Xie Q, Bedran-Russo AK, Wu CD. In Vitro Remineralization Effects of Grape Seed Extract on Artificial Root Caries. *Journal of Dentistry.* 2008;36:900–6. doi:10.1016/j.jdent.2008.07.011.
155. Enrich-Essvein T, Rodríguez-Navarro AB, Álvarez-Lloret P, Cifuentes-Jiménez C, Bolaños-Carmona MV, González-López S. Proanthocyanidin-Functionalized Hydroxyapatite Nanoparticles as Dentin Biomodifier. *Dental Materials.* 2021;37:1437–45. doi:10.1016/j.dental.2021.07.002.
156. Lagha AB, Groeger S, Meyle J, Grenier D. Green Tea Polyphenols Enhance Gingival Keratinocyte Integrity and Protect against Invasion by *Porphyromonas Gingivalis*. *Pathogens and Disease.* 2018, 76(4):fty030. doi:10.1093/femspd/fty030.

157. De Oliveira Caleare A, Hensel A, Mello JCP, Pinha AB, Panizzon GP, Lechtenberg M, Petereit F, Nakamura CV. Flavan-3-Ols and Proanthocyanidins from *Limonium Brasiliense* Inhibit the Adhesion of *Porphyromonas Gingivalis* to Epithelial Host Cells by Interaction with Gingipains. *Fitoterapia*. 2017;118:87–93. doi:10.1016/j.fitote.2017.03.002.
158. Polak D, Naddaf R, Shapira L, Weiss EI, Houry-Haddad Y. Protective Potential of Non-Dialyzable Material Fraction of Cranberry Juice on the Virulence of *P. Gingivalis* and *F. Nucleatum* Mixed Infection. *Journal of Periodontology*. 2013;84:1019–25. doi:10.1902/jop.2012.120331.
159. Ben Lagha A, Dudonné S, Desjardins Y, Grenier D. Wild Blueberry (*Vaccinium Angustifolium* Ait.) Polyphenols Target *Fusobacterium Nucleatum* and the Host Inflammatory Response: Potential Innovative Molecules for Treating Periodontal Diseases. *J. Agric. Food Chem*. 2015;63:6999–7008. doi:10.1021/acs.jafc.5b01525.
160. Asahi Y, Noiri Y, Miura J, Maezono H, Yamaguchi M, Yamamoto R, Azakami H, Hayashi M, Ebisu S. Effects of the Tea Catechin Epigallocatechin Gallate on *Porphyromonas Gingivalis* Biofilms. *J Appl Microbiol*. 2014;116:1164–71. doi:10.1111/jam.12458.
161. Feldman M, Grenier D. Cranberry Proanthocyanidins Act in Synergy with Licochalcone A to Reduce *Porphyromonas Gingivalis* Growth and Virulence Properties, and to Suppress Cytokine Secretion by Macrophages: Synergy between Proanthocyanidins and Licochalcone A. *J Appl Microbiol*. 2012;113:438–47. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05329.x.
162. Tomiyama K, Mukai Y, Saito M, Watanabe K, Kumada H, Nihei T, Hamada N, Teranaka T. Antibacterial Action of a Condensed Tannin Extracted from Astringent Persimmon as a Component of Food Addictive Pancil PS-M on Oral Polymicrobial Biofilms. *Biomed Res Int*. 2016;2016:5730748. doi:10.1155/2016/5730748.
163. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Cranberry Components Inhibit Interleukin-6, Interleukin-8, and Prostaglandin E₂ Production by Lipopolysaccharide-activated Gingival Fibroblasts. *European J Oral Sciences*. 2007;115:64–70. doi:10.1111/j.1600-0722.2007.00415.x.
164. Nawrot-Hadzik I, Matkowski A, Pitułaj A, Sterczała B, Olchowcy C, Szewczyk A, Choromańska A. In Vitro Gingival Wound Healing Activity of Extracts from *Reynoutria Japonica* Houtt Rhizomes. *Pharmaceutics*. 2021;13(11):1764. doi:10.3390/pharmaceutics13111764.
165. Kurauchi M, Niwano Y, Shirato M, Kanno T, Nakamura K, Egusa H, Sasaki K. Cytoprotective Effect of Short-Term Pretreatment with Proanthocyanidin on Human Gingival Fibroblasts Exposed to Harsh Environmental Conditions. *PLoS ONE*. 2014;9:e113403. doi:10.1371/journal.pone.0113403.
166. Lee HA, Song YR, Park MH, Chung H, Na HS, Chung J. Catechin Ameliorates *Porphyromonas Gingivalis*- Induced Inflammation via the Regulation of TLR2/4 and Inflammasome Signaling. *Journal of Periodontology*. 2020;91:661–70. doi:10.1002/JPER.18-0004.
167. Cai Y, Chen Z, Liu H, Xuan Y, Wang X, Luan Q. Green Tea Epigallocatechin-3-Gallate Alleviates *Porphyromonas Gingivalis*-Induced Periodontitis in Mice. *International Immunopharmacology*. 2015;29:839–45. doi:10.1016/j.intimp.2015.08.033.
168. Cho AR, Kim JH, Lee DE, Lee JS, Jung UW, Bak EJ, Yoo YJ, Chung WG, Choi SH. The Effect of Orally Administered Epigallocatechin-3-gallate on Ligature-induced Periodontitis in Rats. *J of Periodontal Research*. 2013;48:781–9. doi:10.1111/jre.12071.

169. Díaz Sánchez RM, Castillo-Dalí G, Fernández-Olavarria A, Mosquera-Pérez R, Delgado-Muñoz JM, Gutiérrez-Pérez JL, Torres-Lagares D. A Prospective, Double-Blind, Randomized, Controlled Clinical Trial in the Gingivitis Prevention with an Oligomeric Proanthocyanidin Nutritional Supplement. *Mediators of Inflammation*. 2017;2017:7460780. doi:10.1155/2017/7460780.
170. Chava VK, Vedula BD. Thermo-Reversible Green Tea Catechin Gel for Local Application in Chronic Periodontitis: A 4-Week Clinical Trial. *Journal of Periodontology*. 2013;84:1290–6. doi:10.1902/jop.2012.120425
171. Hirasawa M, Takada K, Makimura M, Otake S. Improvement of Periodontal Status by Green Tea Catechin Using a Local Delivery System: A Clinical Pilot Study. *J of Periodontal Research*. 2002;37:433–8. doi:10.1034/j.1600-0765.2002.01640.x.
172. Adyani-Fard S, Beckert S, Schmuck J, Hensel A, Beikler T. Proanthocyanidin-Enriched Extract from *Rumex Acetosa* L. as a Prophylactic Agent against *Porphyromonas Gingivalis*: A Clinical Pilot Trial. *Planta Med*. 2013;79:s-0033-1351947. doi:10.1055/s-0033-1351947.
173. Das M. Clinical Efficacy of Grape Seed Extract as an Adjuvant to Scaling and Root Planing in Treatment of Periodontal Pockets. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2021;35(2S1):5488. doi:10.23812/21-2suppl-8.
174. Rayyan M, Terkawi T, Abdo H, Abdel Azim D, Khalaf A, AlKhouli Z, Meziad M, Alshamma'a M, Abu Naim H. Efficacy of Grape Seed Extract Gel in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Randomized Clinical Study. *J of Invest & Clin Dent*. 2018;9:e12318. doi:10.1111/jicd.12318.
175. Li M, Li R, Jin Q, Pang J, Xu Z. The Efficacy of Proanthocyanidins and Secnidazole in the Treatment of Chronic Periodontitis after Scaling and Root Planing Therapy. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2017;31(1):93–7.
176. Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M. Safety Evaluation of Proanthocyanidin-Rich Extract from Grape Seeds. *Food and Chemical Toxicology*. 2002;40:599–607. doi:10.1016/S0278-6915(02)00006-6.
177. Ray S, Bagchi D, Lim PM, Bagchi M, Gross SM, Kothari SC, Preuss HG, Stohs SJ. Acute and Long-Term Safety Evaluation of a Novel IH636 Grape Seed Proanthocyanidin Extract. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2001;109:165–97.
178. Hellström J, Sinkkonen J, Karonen M, Mattila P. Isolation and Structure Elucidation of Procyanidin Oligomers from Saskatoon Berries (*Amelanchier Alnifolia*). *J. Agric. Food Chem*. 2007;55:157–64. doi:10.1021/jf062441t.
179. Knopp KL, Stenfors C, Bastrup C, Bannon AW, Calvo M, Caspani O, et al. Experimental design and reporting standards for improving the internal validity of pre-clinical studies in the field of pain: Consensus of the IMI-Europain consortium. *Scandinavian Journal of Pain*. 2015 Apr 1;7(1):58–70. doi:10.1016/j.sjpain.2015.01.006
180. Chang HY, Yang X. Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64:821–46. doi:10.1128/MMBR.64.4.821-846.2000.
181. Guo C, Rizkalla AS, Hamilton DW. FGF and TGF- β Growth Factor Isoform Modulation of Human Gingival and Periodontal Ligament Fibroblast Wound Healing Phenotype. *Matrix Biology*. 2025;136:9–21. doi:10.1016/j.matbio.2024.12.011.
182. Serafini G, Lopreiato M, Lollobrigida M, Lamazza L, Mazzucchi G, Fortunato L, Mariano A, Scotto d'Abusco A, Fontana M, De Biase A. Platelet Rich Fibrin (PRF) and Its Related Products: Biomolecular Characterization of the Liquid Fibrinogen. *JCM*. 2020;9:1099. doi:10.3390/jcm9041099.

183. Choi Y, Kim HJ, Min KS. Effects of Proanthocyanidin, a Crosslinking Agent, on Physical and Biological Properties of Collagen Hydrogel Scaffold. *Restor Dent Endod*. 2016;41:296–303. doi:10.5395/rde.2016.41.4.296.
184. Kwak SC, Cheon YH, Lee CH, Jun HY, Yoon KH, Lee MS, Kim JY. Grape Seed Proanthocyanidin Extract Prevents Bone Loss via Regulation of Osteoclast Differentiation, Apoptosis, and Proliferation. *Nutrients*. 2020;12:3164. doi:10.3390/nut12103164.
185. Tofani I, Maki K, Kojima K, Kimura M. Beneficial Effects of Grape Seed Proanthocyanidins Extract on Formation of Tibia Bone in Low-Calcium Feeding Rats. *Pediatric Dental Journal*. 2004;14:47–53. doi:10.1016/S0917-2394(04)70008-7.
186. Ming P, Liu Y, Yu P, Jiang X, Yuan L, Cai S, Rao P, Cai R, Lan X, Tao G, et al. A Biomimetic Se-nHA/PC Composite Microsphere with Synergistic Immunomodulatory and Osteogenic Ability to Activate Bone Regeneration in Periodontitis. *Small*. 2024;20:e2305490. doi:10.1002/sml.202305490.
187. Liu Q, Zhang Y, Yu S, Zhao C, Yang Y, Yan J, Wang Y, Liu D, Liu Y, Zhang X. Proanthocyanidins Modification of the Mineralized Collagen Scaffold Based on Synchronous Self-Assembly/Mineralization for Bone Regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2025;245:114290. doi:10.1016/j.colsurfb.2024.114290.
188. Ishikawa M, Maki K, Tofani I, Kimura K, Kimura M. Grape Seed Proanthocyanidins Extract Promotes Bone Formation in Rat's Mandibular Condyle. *Eur J Oral Sci*. 2005; 113:47–52. doi:10.1111/j.1600-0722.2004.00176.x.
189. Zhao J, Jiao J, Chen X, Zhang Y, Chen T, Xie J, Ou X. Procyanidin B2 Targeted CCR7 Expression to Inhibit the Senescence-Associated Secretory Phenotype through the NF- κ B Pathway to Promote Osteogenic Differentiation of Periodontal Ligament Stem Cells in Periodontitis. *Int Immunopharmacol*. 2024;143:113435. doi:10.1016/j.intimp.2024.113435.
190. Park JS, Park MK, Oh HJ, Woo YJ, Lim MA, Lee JH, Ju JH, Jung YO, Lee ZH, Park SH, et al. Grape-Seed Proanthocyanidin Extract as Suppressors of Bone Destruction in Inflammatory Autoimmune Arthritis. *PLoS ONE*. 2012;7:e51377. doi:10.1371/journal.pone.0051377.
191. Zhu W, Yin Z, Zhang Q, Guo S, Shen Y, Liu T, Liu B, Wan L, Li S, Chen X, et al. Proanthocyanidins Inhibit Osteoclast Formation and Function by Inhibiting the NF- κ B and JNK Signaling Pathways during Osteoporosis Treatment. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;509:294–300. doi:10.1016/j.bbrc.2018.12.125.
192. Liang Y, Luan X, Liu X. Recent Advances in Periodontal Regeneration: A Biomaterial Perspective. *Bioactive Materials*. 2020;5:297–308. doi:10.1016/j.bioactmat.2020.02.012.
193. Wielento A, Lagosz-Cwik KB, Potempa J, Grabiec AM. The Role of Gingival Fibroblasts in the Pathogenesis of Periodontitis. *J Dent Res*. 2023;102:489–96. doi:10.1177/00220345231151921.
194. Déziel BA, Patel K, Neto C, Gottschall-Pass K, Hurta RAR. Proanthocyanidins from the American Cranberry (*Vaccinium Macrocarpon*) Inhibit Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9 Activity in Human Prostate Cancer Cells via Alterations in Multiple Cellular Signalling Pathways. *J of Cellular Biochemistry*. 2010;111: 742–54. doi:10.1002/jcb.22761.
195. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *P T*. 2015; 40(4):277–83.

196. Shaddox LM, Walker CB. Treating Chronic Periodontitis: Current Status, Challenges, and Future Directions. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2010;2:79–91.
197. Seymour RA. Effects of Medications on the Periodontal Tissues in Health and Disease. *Periodontology* 2000. 2006;40:120–9. doi:10.1111/j.1600-0757.2005.00137.x.
198. Irie K, Novince CM, Darveau RP. Impact of the Oral Commensal Flora on Alveolar Bone Homeostasis. *J Dent Res*. 2014;93:801–6. doi:10.1177/0022034514540173.
199. Patini R, Cattani P, Marchetti S, Isola G, Quaranta G, Gallenzi P. Evaluation of Predation Capability of Periodontopathogens Bacteria by *Bdellovibrio Bacteriovorus* HD100. An in Vitro Study. *Materials*. 2019;12:2008. doi:10.3390/ma12122008.
200. Kolodziej H. Antimicrobial, Antiviral and Immunomodulatory Activity Studies of *Pelargonium Sidoides* (EPs® 7630) in the Context of Health Promotion. *Pharmaceuticals*. 2011;4:1295–314. doi:10.3390/ph4101295.
201. Moyo M, Van Staden J. Medicinal Properties and Conservation of *Pelargonium Sidoides* DC. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014;152:243–55. doi:10.1016/j.jep.2014.01.009.
202. Kolodziej H, Kayser O, Radtke OA, Kiderlen AF, Koch E. Pharmacological Profile of Extracts of *Pelargonium Sidoides* and Their Constituents. *Phytomedicine*. 2003;10:18–24. doi:10.1078/1433-187X-00307.
203. Benso B. Virulence Factors Associated with *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* and Their Role in Promoting Periodontal Diseases. *Virulence*. 2017;8:111–4. doi:10.1080/21505594.2016.1235128.
204. Lacombe A, Wu VCH. The Potential of Berries to Serve as Selective Inhibitors of Pathogens and Promoters of Beneficial Microorganisms. *Food Quality and Safety*. 2017;1:3–12. doi:10.1093/fqs/fyx001.
205. Thapa D, Losa R, Zweifel B, Wallace RJ. Sensitivity of Pathogenic and Commensal Bacteria from the Human Colon to Essential Oils. *Microbiology*. 2012;158:2870–7. doi:10.1099/mic.0.061127-0.
206. Krachler AM, Orth K. Targeting the Bacteria–Host Interface: Strategies in Anti-Adhesion Therapy. *Virulence*. 2013;4:284–94. doi:10.4161/viru.24606.
207. Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G. Membrane Toxicity of Antimicrobial Compounds from Essential Oils. *J. Agric. Food Chem*. 2007;55:4863–70. doi:10.1021/jf0636465.
208. Maisuria VB, Okshevsky M, Déziel E, Tufenkji N. Proanthocyanidin Interferes with Intrinsic Antibiotic Resistance Mechanisms of Gram-Negative Bacteria. *Advanced Science*. 2019;6:1802333. doi:10.1002/adv.201802333.
209. Trentin DS, Silva DB, Frasson AP, Rzhepishevskaya O, Da Silva MV, De L Pulcini E, James G, Soares GV, Tasca T, Ramstedt M, et al. Natural Green Coating Inhibits Adhesion of Clinically Important Bacteria. *Sci Rep*. 2015;5:8287. doi:10.1038/srep08287.
210. Ma J, Gao SS, Yang HJ, Wang M, Cheng BF, Feng ZW, Wang L. Neuroprotective Effects of Proanthocyanidins, Natural Flavonoids Derived From Plants, on Rotenone-Induced Oxidative Stress and Apoptotic Cell Death in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Front. Neurosci*. 2018;12:369. doi:10.3389/fnins.2018.00369.
211. Zhang C, Chen W, Zhang X, Zheng Y, Yu F, Liu Y, Wang Y. Grape Seed Proanthocyanidins Induce Mitochondrial Pathway-mediated Apoptosis in Human Colorectal Carcinoma Cells. *Oncol Lett*. 2017;14(5):5853–60. doi:10.3892/ol.2017.6992.

212. Ji BC, Hsu WH, Yang JS, Hsia TC, Lu CC, Chiang JH, Yang JL, Lin CH, Lin JJ, Suen LJW, et al. Gallic Acid Induces Apoptosis via Caspase-3 and Mitochondrion-Dependent Pathways in Vitro and Suppresses Lung Xenograft Tumor Growth in Vivo. *J. Agric. Food Chem.* 2009;57:7596–604. doi:10.1021/jf901308p.
213. Hikiji H, Takato T, Shimizu T, Ishii S. The Roles of Prostanoids, Leukotrienes, and Platelet-Activating Factor in Bone Metabolism and Disease. *Progress in Lipid Research.* 2008;47:107–26. doi:10.1016/j.plipres.2007.12.003.
214. Noguchi K, Ishikawa I. The Roles of Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E₂ in Periodontal Disease. *Periodontology* 2000. 2007;43:85–101. doi:10.1111/j.1600-0757.2006.00170.x.
215. Kaneko H, Mehrotra M, Alander C, Lerner U, Pilbeam C, Raisz L. Effects of Prostaglandin E₂ and Lipopolysaccharide on Osteoclastogenesis in RAW 264.7 Cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 2007;77:181–6. doi:10.1016/j.plefa.2007.09.002.
216. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *Journal of Immunology Research.* 2015;2015:615486. doi:10.1155/2015/615486.
217. Park SM, Min BG, Jung JY, Jegal KH, Lee CW, Kim KY, Kim YW, Choi YW, Cho IJ, Ku SK, et al. Combination of Pelargonium Sidoides and Coptis Chinensis Root Inhibits Nuclear Factor Kappa B-Mediated Inflammatory Response in Vitro and in Vivo. *BMC Complement Altern Med.* 2018;18:20. doi:10.1186/s12906-018-2088-x.
218. Cunha G, D'Angieri Saugo G, Gabrielli MAC, Barbeiro C de O, de Almeida LY, Bufalino A, Pereira-Filho VA. Cytotoxicity Evaluation of Chlorhexidine and Blue®M Applied to a Human Gingival Fibroblast (HGF-1) and Keratinocytes (NOK-SI): In Vitro Study. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2024;125:101923. doi:10.1016/j.jormas.2024.101923.
219. Dinu S, Matichescu A, Buzatu R, Marcovici I, Geamantan-Sirbu A, Semenescu AD, Bratu RC, Bratu DC. Insights into the Cytotoxicity and Irritant Potential of Chlorhexidine Digluconate: An In Vitro and In Ovo Safety Screening. *Dentistry Journal.* 2024;12:221. doi:10.3390/dj12070221.
220. Smiley CJ, Tracy SL, Abt E, Michalowicz BS, John MT, Gunsolley J, Cobb CM, Rossmann J, Harrel SK, Forrest JL, et al. Systematic Review and Meta-Analysis on the Nonsurgical Treatment of Chronic Periodontitis by Means of Scaling and Root Planing with or without Adjuncts. *J Am Dent Assoc.* 2015;146:508–524.e5. doi:10.1016/j.adaj.2015.01.028.
221. Iorio-Siciliano V, Ramaglia L, Isola G, Blasi A, Salvi GE, Sculean A. Changes in Clinical Parameters Following Adjunctive Local Sodium Hypochlorite Gel in Minimally Invasive Nonsurgical Therapy (MINST) of Periodontal Pockets: A 6-Month Randomized Controlled Clinical Trial. *Clin Oral Investig.* 2021;25:5331–40. doi:10.1007/s00784-021-03841-8.
222. Mancini L, Romandini M, Fratini A, Americo LM, Panda S, Marchetti E. Biomaterials for Periodontal and Peri-Implant Regeneration. *Materials (Basel).* 2021;14:3319. doi:10.3390/ma14123319.
223. 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. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01670.x.
224. Mohammed F, Smookler D, Khokha R. Metalloproteinases, Inflammation, and Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62:ii43–ii47. doi:10.1136/ard.62.suppl_2.ii43.

225. Tipton DA, Babu JP, Dabbous MKh. Effects of Cranberry Components on Human Aggressive Periodontitis Gingival Fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2013;48:433–42. doi:10.1111/jre.12023.
226. Alpagot T, Bell C, Lundergan W, Chambers DW, Rudin R. Longitudinal Evaluation of GCF MMP-3 and TIMP-1 Levels as Prognostic Factors for Progression of Periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001;28:353–9. doi:10.1034/j.1600-051x.2001.028004353.x
227. Kim HN. Changes in Salivary Matrix Metalloproteinase-3, -8, and -9 Concentrations after 6 Weeks of Non-Surgical Periodontal Therapy. *BMC Oral Health.* 2022;22:175. doi:10.1186/s12903-022-02185-3.

PRIEDAI



KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickevičiaus g. 9, LT-44307 Kaunas, tel. (+370) 37 32 68 89; el. paštas: kaunorbtek@lsmuni.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2018-03-12 Nr. BE-2-38

Biomedicininio tyrimo pavadinimas:	"Pelargonijos (Pelargonium sidoides DC) ekstrakto poveikis apydančio audinių funkcijos palaikymui".
Protokolo Nr.:	3
Data:	2018-01-09
Versija:	3
Asmens informavimo forma	Versija nr. 3, data 2018-03-12
Pagrindinis tyrėjas:	Doc. Nomedas Basevičienė
Biomedicininio tyrimo vieta:	LSMUL Kauno Klinikos,
Įstaigos pavadinimas:	Dantų ir burnos ligų klinika,
Adresas:	Eivenių g. 2, LT-50161, Kaunas

Išvada:

Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto posėdžio, įvykusio **2018 m. kovo mėn. 7 d.** (protokolo Nr. BE-10-6) sprendimu pritarta biomedicininio tyrimo vykdymui.

Mokslinio eksperimento vykdytojai įsipareigoja: (1) nedelsiant informuoti Kauno Regioninį biomedicininį Tyrimų Etikos komitetą apie visus nenumatytus atvejus, susijusius su studijos vykdymu, (2) iki sausio 15 dienos – pateikti metinį studijos vykdymo apibendrinimą bei, (3) per mėnesį po studijos užbaigimo, pateikti galutinį pranešimą apie eksperimentą.

Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto nariai			
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis	Dalyvavo posėdyje
1.	Prof. Edgaras Stankevičius	Fiziologija, farmakologija	Taip
2.	Prof. Skaidrius Miliuskas	Pulmunologija, vidaus ligos	Ne
3.	Med. dr. Jonas Andriuskevičius	Chirurgija	Ne
4.	Doc. Gintautas Gumbrevičius	Klinikinė farmakologija	Taip
5.	Prof. Kęstutis Petrikonis	Neurologija	Taip
6.	Dr. Ramunė Kasperavičienė	Filologija	Taip
7.	Eglė Vaižgelienė	Visuomenės sveikata	Ne
8.	Žydrūnė Luneckaitė	Visuomenės sveikata	Taip
9.	Jurgita Laurinaitytė	Teisė	Ne

Kauno regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininio tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros Klinikinės praktikos taisyklėmis.

Kauno RBTEK Pirmininkas

Prof. Edgaras Stankevičius



PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS DISERTACIJOS TEMATIKA

Leidiniuose, referuojamuose Mokslinės informacijos instituto (Thomson Reuters) duomenų bazėje “ISI Web of Science” ir turinčiuose citavimo rodiklį:

1. **Alkimavičienė E**, Basevičienė N, Strazdauskas A, Baniienė R, Savickienė N. Proliferative Effect of Proanthocyanidins on HGF-1 and HPDLF Cells: An In Vitro Study. *Medicina*. 2025;61:2098. doi:10.3390/medicina61122098.
2. **Alkimavičienė E**, Pušinskaitė R, Basevičienė N, Baniienė R, Savickienė N, Pacauskienė IM. Efficacy of Proanthocyanidins in Nonsurgical Periodontal Therapy. *International Dental Journal*. 2023;73:195–204. doi: 10.1016/j.identj.2022.08.006.
3. Jekabsone A, Sile I, Cochis A, Makrecka-Kuka M, Laucaityte G, Makarova E, Rimondini L, Bernotiene R, Raudone L, Alkimaviciene E (**Vedlugaite E**), et al. Investigation of Antibacterial and Antiinflammatory Activities of Proanthocyanidins from Pelargonium Sidoides DC Root Extract. *Nutrients*. 2019;11:2829. doi:10.3390/nu11112829.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS NE DISERTACIJOS TEMATIKA

Leidiniuose, referuojamuose Mokslinės informacijos instituto (Thomson Reuters) duomenų bazėje “ISI Web of Science” ir turinčiuose citavimo rodiklį:

1. Valantijene V, Mazeikiene A, Alkimavicius J, Linkeviciene L, **Alkimaviciene E**, Linkevicius T. Clinical and Immunological Evaluation of Peri-implant Tissues around Ultra-polished and Conventionally-polished Zirconia Abutments. A 1-year Follow-up Randomized Clinical Trial. *Journal of Prosthodontics*. 2023;32:392–400. doi:10.1111/jopr.13670.

Konferencijų, kuriose skelbti disertacijos metu gauti rezultatai, sąrašas:

1. Skaitytas mokslinis pranešimas „**Effectiveness of adjunctive use of Proanthocyanidins in non-surgical periodontal treatment**“ tarptautiniame kongrese „EuroPerio 10,“ pristatyti doktorantūros darbo rezultatai. Kopenhaga, Danija, 2022 06 15–18.
2. Skaitytas mokslinis pranešimas „**Response of Human Gingival Fibroblasts to Proanthocyanidins: in vitro study**“ tarptautiniame kongrese „EuroPerio 11“ pristatyti doktorantūros darbo rezultatai. Viena, Austrija, 2025 05 14–17.

CURRICULUM VITAE

Name, Surname: Evelina Alkimavičienė

Address: Department of Dental and Oral Pathology
Faculty of Odontology, Medical Academy,
Lithuanian University of Health Sciences,
Eivenių 2, LT-50161 Kaunas, Lithuania

E-mail: evelina.alkimaviciene@lsmu.lt

Education

09/2020–2026 PhD studies in Dentistry
Lithuanian University of Health Sciences,
Kaunas, Lithuania

09/2016–06/2019 Periodontology
Lithuanian University of Health Sciences,
Kaunas, Lithuania

09/2010–06/2015 Dentistry
Lithuanian University of Health Sciences,
Kaunas, Lithuania

Professional experience

2020–until now Lecturer
Department of Dental and Oral Pathology,
Lithuanian University of Health Sciences,
Kaunas, Lithuania

06/2019–until now Periodontist
Private practice „Šypsenos akademija“, „Labadenta“,
„Mažoji odontologijos klinika“, „Odontologija Jums“,
„GŽ klinika“

Professional memberships

Lithuanian Odontology Dental Chamber
Lithuanian Association of Periodontology

PADĖKA

Pirmiausia noriu padėkoti doktorantūros vadovei prof. Nomedai Basevičienei už visokeriopą pagalbą, palaikymą ir padrąšinimą žengti mokslo keliu.

Taip pat noriu išreikšti didelę padėką prof. Rasai Banienei už didelę pagalbą, šiltą bendravimą bei profesionalumą. Taip pat noriu padėkoti prof. Nijolei Savickienei už rezidentūros ir doktorantūros metu parodytą mokslo kelią ir pagalbą.

Taip pat noriu padėkoti doktorantūros bendražygiui Arvydui Strazdauskui ir rezidentūros kolegei Rasai Pušinskaitei, už besąlygišką pagalbą ir tikėjimą.

Noriu padėkoti Dantų ir burnos ligų klinikų bendradarbiams už draugystę, supratingumą ir pagalbą.

Ir svarbiausiai norėčiau padėkoti savo gyvenimo meilėms – dukrytei Izabelei, vyrui Jonui ir visai šeimai – su Jumis įmanoma viskas.