

UNIVERZITET U BEOGRADU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Marija Z. Vučković

**KOMPARATIVNA ANALIZA  
OSTEOIMUNOLOŠKIH I MIKROBIOLOŠKIH  
PROFILA PERI-IMPLANTNIH STANJA I  
OBOLJENJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Marija Z. Vučković

**COMPARATIVE ANALYSIS OF  
OSTEOIMMUNOLOGICAL AND  
MICROBIOLOGICAL PROFILES OF PERI-  
IMPLANT CONDITIONS AND DISEASES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

**Mentor:**

Doc. dr Iva Milinković

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu

**Članovi komisije:**

Prof. dr Zoran Aleksić

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu

Prof. dr Jelena Milašin

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

RJ institutski predmeti – Humana genetika

Prof. dr Saša Janković

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu

dr sci Ivana Strahinić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Laboratorija za molekularnu biologiju

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Istraživanje na osnovu koga je napisana ova doktorska disertacija realizovano je na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu i u laboratoriji za humanu genetiku, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.*

*Najpre, želim da se zahvalim svojoj mentorki, doc. dr Ivi Milinković, sa kojom sam započela ovaj projekat, definisala probleme i uz čiju podršku i pomoć sam sprovela istraživanje i napisala doktorsku disertaciju.*

*Veoma sam zahvalna prof. dr Zoranu Aleksiću i prof. dr Saši Jankoviću na konstruktivnom doprinosu u pogledu definisanja metodologije rada i finansiranja istraživanja.*

*Veliko hvala prof. dr Jeleni Milašin na rukovođenju laboratorijskog dela studije i korisnim savetima tokom izrade disertacije.*

*Zahvaljujem se dr sci Ivani Strahinić na savetima za unapređenje disertacije.*

*Zahvalnost takođe dugujem i dr sci Nađi Nikolić višem naučnom saradniku za pomoć tokom izvođenja eksperimentalnih istraživanja i statističke analize.*

*Iskrenu zahvalnost iskazujem kolektivu Klinike za parodontologiju i oralnu medicinu na pomoći oko izvođenja kliničkog dela studije, kao i kolektivu laboratorije za humanu genetiku za pomoć pruženu prilikom obrade uzoraka pacijenata.*

*Hvala svim kolegama koji su svojim doprinosom omogućili da se ova studija sprovede.*

*Na kraju, želim da izrazim veliku zahvalnost svojoj porodici i prijateljima na strpljenju, podršci i ljubavi.*

## Komparativna analiza osteoimunoloških i mikrobioloških profila peri-implantnih stanja i oboljenja

### Sažetak

**Uvod:** Primena zubnih implantata deo je svakodnevne savremene stomatološke prakse. Međutim, srazmerno sa njihovom primenom, povećava se i učestalost komplikacija vezanih za zubne implantate. Zubni implantati predstavljaju adekvatnu zamenu za izgubljene zube. Uprkos zabeleženoj visokoj stopi preživljavanja i uspeha terapije implantatima, pojava komplikacija nije retka i za posledicu može imati gubitak implantata. Jedan od glavnih uzroka gubitka implantata jesu biološke komplikacije koje se odigravaju u peri-implantnim tkivima. To su peri-implantni mukozitis i peri-implantitis. Peri-implantni mukozitis odlikuje inflamacija peri-implantnih mekih tkiva reverzibilnog karaktera, nastala kao posledica poremećaja homeostaze između domaćina i mikroorganizama na površini mukoze. Međutim, peri-implantitis karakteriše inflamacija peri-implantne mukoze udružena sa progresivnim gubitkom potpornog koštanog tkiva, što za posledicu može imati gubitak implantata. Dokumentovane su pojedine sličnosti u etiopatogenezi peri-implantnih i parodontalnih oboljenja, koje se odnose na formiranje biofilma udruženo sa izmenjenim imunim odgovorom domaćina na formiranje kolonija mikroorganizama, što dovodi do progresivne destrukcije potpornih tkiva. Mikroorganizmi, kao glavni etiološki faktori peri-implantnih oboljenja, aktiviraju imuni odgovor domaćina, koji se ogleda u ekspresiji proinflamatornih citokina, medijatora koštane remodelacije i različitih signalnih puteva, usled čega dolazi do remodelacije peri-implantnih tkiva.

**Cilj:** Ciljevi ove studije bili su da se u uzorcima peri-implantne tečnosti uzorkovane kod pacijenata sa peri-implantitisom, peri-implantnim mukozitisom i oko zdravih implantata utvrdi učestalost odabranih mikroorganizama (bakterija *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) i *Fusobacterium spp.*, Epstein-Barr virusa (*EBV*) i gljivice *Candida albicans* (*C. albicans*), kao i relativni nivoi genske ekspresije molekula Notch signalnog puta (*Notch 1*, *Notch 2*, *Jagged 1*, *Hes 1* i *Hey 1*), proinflamatornih citokina (*TNF- $\alpha$* , *IL-17*, *IL-1 $\beta$*  i *IL-6*) i medijatora koštanog remodelovanja (*RANKL* i *OPG*). Takođe, ciljevi su bili i da se utvrdi potencijalna korelacija navedenih mikroorganizama sa analiziranim genima i parodontološkim kliničkim parametrima.

**Materijal i metode:** Ova prospektivna kontrolisana kliničko-laboratorijska studija obuhvatala je 102 pacijenta i implantata. Spram dijagnostičkih kriterijuma, razlikovale su se tri grupe ispitanika: pacijenti sa peri-implantitisom (PI grupa), pacijenti sa peri-implantnim mukozitisom (PM grupa) i pacijenti sa zdravim implantatima (I grupa). Određivani su parodontološki klinički parametri: dubina sondiranja (DS), nivo ivice gingive (NIG), nivo pripojnog epitela (NPE), krvarenje na provokaciju (KNP), plak indeks (PI) i supuracija na provokaciju (SUP). Analogni parametri oko implantata, beleženi su sa sufiksom u vidu malog latiničnog slova i (DSi, NIGi, NPEi, KNPi, PIi i SUPi). Nakon kliničkog pregleda, u regiji ispitivanih implantata pomoću papirnih poena (*PerioFlow*, Amityville, NY) uzorkovana je peri-implantna cervikularna tečnost. Iz uzoraka je, u laboratorijskim uslovima, primenom metode kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (*engl. quantitative real time polymerase chain reaction – qPCR*) analizirano prisustvo odabranih mikroorganizama, kao i relativna genska ekspresija molekula Notch signalnog puta, proinflamatornih citokina i medijatora koštane remodelacije. Kod svih pacijenata sprovedena je nehirurška faza terapije parodontitisa i peri-implantnih oboljenja prateći *Full-mouth disinfection* protokol. Statistička analiza podataka vršena je pomoću SPSS statističkog paketa (*engl. Statistical Package for Social Science, version 22.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA*).

**Rezultati:** Značajno povišeni nivoi *P. gingivalis* detektovani su u PI grupi u odnosu na I ( $p=0,012$ ) i PM ( $p=0,026$ ) grupu. Takođe, *Fusobacterium spp.* je značajno zastupljeniji bio u PI ( $p=0,041$ ) i PM ( $p=0,008$ ) grupama u poređenju sa I grupom. Suprotno, *EBV* i *C. albicans* nisu pokazali statističku značajnost u uzorcima pacijenata. Klinički parametri izmereni na nivou čitavih usta, kao i na nivou implantata pokazali su statističku značajnost između sve tri grupe ( $p<0,001$ ). Analizom pozitivne korelacije mikroorganizama i kliničkih parametara na nivou usne duplje utvrđena je povezanost nivoa *P. gingivalis* sa DS ( $\rho=0,207$ ;  $p=0,037$ ) i *Fusobacterium spp.* sa NPE ( $\rho=0,224$ ;  $p=0,024$ ) i PI ( $\rho=0,228$ ;  $p=0,021$ ). Značajna pozitivna korelacija potvrđena je kod obe bakterije sa KNP - *P. gingivalis*  $\rho=0,297$ ,  $p=0,002$ , a *Fusobacterium spp.*  $\rho=0,262$ ,  $p=0,008$ . Pored toga, parametri izmereni na nivou implantata, DSi i KNPI, takođe su bili u pozitivnoj korelaciji i sa *P. gingivalis* ( $\rho=0,221$ ;  $p=0,033$  i  $\rho=0,327$ ;  $p=0,001$ ), i sa *Fusobacterium spp.* ( $\rho=0,220$ ;  $p=0,026$  i  $\rho=0,233$ ,  $p=0,018$ ). *P. gingivalis* pokazao je i značajnu pozitivnu korelaciju sa NPEi ( $\rho=0,238$ ;  $p=0,016$ ). Ovaj mikroorganizam utvrđen je kao prediktor DSi ( $\rho=0,011$ ; prilagođen  $R^2=0,063$ ), kao i NPEi ( $\rho=0,049$ ; prilagođen  $R^2=0,038$ ). Analizom molekula Notch signalnog puta, značajno smanjenje nivoa relativne ekspresije *Notch 1* gena uočeno je u PI grupi ( $p=0,018$ ) u odnosu na I grupu, dok je relativna ekspresija *Hey 1* gena bila značajno povećana u poređenju sa PM ( $p=0,003$ ) i I ( $p=0,001$ ) grupama. Kada su proinflamatorni medijatori u pitanju, u PI grupi zabeležene su visoke vrednosti nivoa *TNF- $\alpha$*  ( $p=0,001$ ) i *IL-17* ( $p=0,025$ ) u odnosu na PM. Relativni nivo genske ekspresije *IL-6* kod PI grupe bio je značajnije viši u odnosu na PM i I grupu ( $p=0,011$  i  $p=0,003$ ), dok je u okviru svih grupa uočena statistički značajna razlika u ekspresiji *IL-1 $\beta$*  u ( $p<0,05$ ). Pored toga, značajno visok nivo ekspresije *RANKL* molekula utvrđen je u PI grupi u odnosu na PM ( $p=0,006$ ) i I ( $p=0,024$ ) grupe. Na nivou čitavog uzorka pozitivna korelacija utvrđena je između *C. albicans* i *OPG* molekula ( $\rho=0,202$ ;  $p=0,042$ ), dok je poređenjem unutar grupa pokazana između *P. gingivalis* i ekspresije *Notch 2* gena ( $\rho=0,316$ ;  $p=0,047$ ) u PM grupi i *Fusobacterium spp.* i nivoa genske ekspresije *TNF- $\alpha$*  u PI grupi ( $\rho=0,419$ ;  $p=0,017$ ). Suprotno, negativna korelacija bila je između *C. albicans* i relativnog nivoa genske ekspresije *Hey 1* molekula ( $\rho=-0,292$ ;  $p=0,003$ ) na nivou čitavog uzorka, *C. albicans* i *Hey 1* relativne ekspresije gena ( $\rho=-0,565$ ;  $p=0,001$ ) u PI grupi i *C. albicans* i relativne genske ekspresije *Notch 1* ( $\rho=-0,397$ ;  $p=0,030$ ) i *Hey 1* gena ( $\rho=-0,536$ ;  $p=0,002$ ) u I grupi.

**Zaključak:** *P. gingivalis* pokazao se kao najprevalentniji mikroorganizam kod pacijenata obolelih od peri-implantitisa. Zastupljenost *Fusobacterium spp.* ne razlikuje se značajno između obolelih implantata, dok je u peri-implantnom sulkusu zdravih manje prisutan. Snižena regulacija *Notch 1* gena udružena sa povišenom ekspresijom *Hey 1* i drugih medijatora inflamacije (*TNF- $\alpha$* , *IL-17*, *IL-1 $\beta$*  i *IL-6*) može dovesti do povećane aktivnosti osteoklasta i sledstvene osteolize, karakteristične za peri-implantitis. U prilog tome ide i povećan nivo *RANKL* medijatora koštane remodelacije kod obolelih od peri-implantitisa, koji utiče na koštanu resorpciju.

**Ključne reči:** zubni implantati, peri-implantitis, peri-implantni mukozitis, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium*, Epstein-Barr virus, *Candida albicans*, citokini, Notch signalni put, *RANKL*

Naučna oblast: Medicinske nauke-stomatologija

Uža naučna oblast: Bazične i kliničke stomatološke nauke

## Comparative analysis of osteoimmunological and microbiological profiles of peri-implant conditions and diseases

### Abstract

**Introduction:** Dental implants have become a part of everyday contemporary dental practice. However, with the increasing use of dental implants, the frequency of complications is rising too. Dental implants are the best means for the replacement of lost teeth. Despite recorded high survival and success rates of implant therapy, the occurrence of complications is not rare and may result in the loss of the implant. One of the main causes of implant loss are biological complications that take place in peri-implant tissues, where peri-implant mucositis and peri-implantitis are to be distinguished. Peri-implant mucositis is a reversible disease, characterized by inflammation of the peri-implant soft tissues, caused by homeostasis disruption between the host and microorganisms on the mucosal surface. Additionally, peri-implantitis is identified by inflammation of the peri-implant mucosa associated with progressive loss of supporting bone tissue, which may result in implant loss. Certain similarities in the etiopathogenesis of peri-implant and periodontal diseases have been documented. These are related to biofilm development associated with the changed hosts' immune response to the microorganism colony formation, which leads to the progressive destruction of supporting tissues. Microorganisms, as the main etiological factors of peri-implant diseases, activate the host's immune response, which is reflected in the expression of pro-inflammatory cytokines, mediators of bone remodeling, and various signaling pathways, as a result of which the remodeling of peri-implant tissues occurs.

**Objective:** This study aimed to determine, in peri-implant fluid samples from patients with peri-implantitis, peri-implant mucositis, and around healthy implants, the prevalence of selected microorganisms (*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Fusobacterium spp.*, *Epstein -Barr virus (EBV)*, and the fungus *Candida albicans* (*C. albicans*)), as well as the relative gene expression levels of the Notch signaling pathway molecules (*Notch 1*, *Notch 2*, *Jagged 1*, *Hes 1*, and *Hey 1*), proinflammatory cytokines (*TNF- $\alpha$* , *IL-17*, *IL-1 $\beta$* , and *IL-6*), and mediators of bone remodeling (*RANKL* and *OPG*). Also, the goals were to determine the potential correlation of the mentioned microorganisms with the analyzed genes and periodontal clinical parameters.

**Material and methods:** This prospective controlled clinical-laboratory study included 102 patients and implants. According to the diagnostic criteria, three subject groups were distinguished: patients with peri-implantitis (PI group), patients with peri-implant mucositis (PM group), and patients with healthy implants (I group). Periodontal clinical parameters were determined: periodontal probing depth (PPD), gingival margin level (GML), clinical attachment level (CAL), bleeding on probing (BOP), plaque index (PI), and suppuration (SUP). Analog parameters around the implants were recorded with a suffix in the form of a small Latin letter i (PPDi, GMLi, CALi, BOPi, PIi, and SUPi). After clinical examination, peri-implant crevicular fluid was sampled in the region of the study implants using paper points (PerioFlow, Amityville, NY). The presence of selected microorganisms, as well as the relative gene expression of the Notch signaling pathway molecules, proinflammatory cytokines, and mediators of bone remodeling, were analyzed in a laboratory using the method of quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). All patients were subjected to a non-surgical periodontal and peri-implant treatment following the Full-mouth disinfection protocol. Statistical data analysis was performed using the SPSS statistical package (Statistical Package for Social Science, version 22.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

**Results:** Significantly elevated levels of *P. gingivalis* were detected in the PI group compared to the I ( $p=0.012$ ) and PM ( $p=0.026$ ) groups. Also, *Fusobacterium spp.* was significantly more prevalent in the PI ( $p=0.041$ ) and PM ( $p=0.008$ ) groups compared to the I group. Conversely, *EBV* and *C. albicans* did not show statistical significance in patient samples. Both, full-mouth clinical parameters, as well as parameters measured around implants, showed statistical significance between all three groups ( $p<0.001$ ). A positive correlation was noticed between microorganisms and full-mouth clinical parameters, the level of *P. gingivalis* was associated with the PPD ( $\rho=0.207$ ;  $p=0.037$ ) and the *Fusobacterium spp.* level with CAL ( $\rho=0.224$ ;  $p=0.024$ ) and PI ( $\rho=0.228$ ;  $p=0.021$ ). A significant positive correlation was confirmed for both bacteria with BOP, *P. gingivalis* -  $\rho=0.297$ ,  $p=0.002$ , and *Fusobacterium spp.* -  $\rho=0.262$ ,  $p=0.008$ . In addition, the parameters measured at the implant level, PPD<sub>i</sub>, and BOP<sub>i</sub>, were also positively correlated with *P. gingivalis* ( $\rho=0.221$ ;  $p=0.033$  and  $\rho=0.327$ ;  $p=0.001$ ), and *Fusobacterium spp.* ( $\rho=0.220$ ;  $p=0.026$  and  $\rho=0.233$ ,  $p=0.018$ ). *P. gingivalis* also showed a significant positive correlation with CAL<sub>i</sub> ( $\rho=0.238$ ;  $p=0.016$ ). This bacteria was found to be a predictor of PPD<sub>i</sub> ( $\rho=0.011$ ; adjusted  $R^2=0.063$ ), as well as CAL<sub>i</sub> ( $\rho=0.049$ ; adjusted  $R^2=0.038$ ). By analyzing the molecules of the Notch signaling pathway, a significant decrease in the relative expression level of the *Notch 1* gene was observed in the PI group ( $p=0.018$ ) compared to the I group, while the relative expression of the *Hey 1* gene was significantly increased compared to the PM ( $p=0.003$ ) and I ( $p=0.001$ ) groups. When it comes to pro-inflammatory mediators, high levels of *TNF- $\alpha$*  ( $p=0.001$ ) and *IL-17* ( $p=0.025$ ) were recorded in the PI group compared to the PM. The relative level of gene expression of *IL-6* in the PI group was significantly higher compared to the PM and I groups ( $p=0.011$ , and  $p=0.003$ , respectively), while within all groups a statistically significant difference was observed in the expression of *IL-1 $\beta$*  ( $p<0.05$ ). In addition, a significantly high level of *RANKL* molecule expression was found in the PI group compared to the PM ( $p=0.006$ ) and I ( $p=0.024$ ) groups. At the level of the entire sample, a positive correlation was found between *C. albicans* and *OPG* molecules ( $\rho=0.202$ ;  $p=0.042$ ), while a comparison within the groups showed a correlation between *P. gingivalis* and *Notch 2* gene expression ( $\rho=0.316$ ;  $p=0.047$ ) in PM group and *Fusobacterium spp.* and *TNF- $\alpha$*  gene expression levels in the PI group ( $\rho=0.419$ ;  $p=0.017$ ). Conversely, a negative correlation was detected between *C. albicans* and the relative gene expression level of the *Hey 1* molecule ( $\rho=-0.292$ ;  $p=0.003$ ) at the level of the whole sample, *C. albicans* and *Hey 1* relative gene expression ( $\rho=-0.565$ ;  $p=0.001$ ) in PI group and *C. albicans* and relative gene expressions of *Notch 1* ( $\rho=-0.397$ ;  $p=0.030$ ) and *Hey 1* gene ( $\rho=-0.536$ ;  $p=0.002$ ) in I group.

**Conclusion:** *P. gingivalis* proved to be the most represented microorganism in patients suffering from peri-implantitis. Levels of *Fusobacterium spp.* does not differ significantly between diseased implants, while it is less prevalent in the peri-implant sulcus of healthy ones. Downregulation of the *Notch 1* gene associated with increased expression of *Hey 1* and other inflammatory mediators (*TNF- $\alpha$* , *IL-17*, *IL-1 $\beta$* , and *IL-6*) can lead to increased osteoclast activity and consequent osteolysis, characteristic for peri-implantitis. This is supported by the increased level of *RANKL*, bone remodeling mediator, in patients with peri-implantitis, which affects bone resorption.

**Keywords:** dental implants, peri-implantitis, peri-implant mucositis, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium*, *Epstein-Barr* virus, *Candida albicans*, cytokines, Notch signaling pathway, *RANKL*

Scientific field: Medical sciences-dentistry

Scientific subfield: Basic and clinical dental sciences



# Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Klasifikacija parodontalnih i peri-implantnih oboljenja i stanja.....	3
1.2 Parodontitisi .....	5
1.2.1 Nekrotizirajuća parodontalna oboljenja.....	5
1.2.2 Parodontitis kao manifestacija sistemskih oboljenja .....	6
1.2.3 Parodontitis.....	6
1.3. Oboljenja i stanja peri-implantnih tkiva .....	9
1.3.1 Zdrava peri-implantna tkiva.....	9
1.3.2 Peri-implantni mukozitis.....	12
1.3.3 Peri-implantitis .....	13
1.4 Etiologija oboljenja implantata nastalih kao posledica bioloških komplikacija .....	16
1.4.1 Oralni mikrobiom .....	18
1.4.2 Mikroorganizmi biofilma.....	19
1.4.4 <i>Porphyromonas gingivalis</i> ( <i>P. gingivalis</i> ) .....	23
1.4.5 <i>Fusobacterium species</i> ( <i>spp.</i> ).....	24
1.4.6 Humani herpes virusi.....	25
1.4.7 <i>Candida albicans</i> ( <i>C. albicans</i> ).....	26
1.5 Patogeneza peri-implantnih oboljenja .....	28
2. CILJEVI.....	34
3. METODOLOGIJA .....	35
3.1 Dizajn studije i odabir pacijenata .....	35
3.2 Prikupljanje kliničkih podataka i uzorkovanje peri-implantne sulkusne tečnosti.....	36
3.3 Sprovođenje kauzalne faze terapije.....	38
3.4 Postupak izolovanja RNK i DNK molekula .....	39

3.5	Analiza mikroorganizama primenom qPCR metode.....	39
3.5	Analiza relativne ekspresije odabranih gena qPCR metodom .....	40
3.6	Statistička obrada podataka.....	42
4.	REZULTATI.....	43
4.1	Demografski podaci.....	43
4.2	Klinički parametri.....	46
4.3	Prevalenca patogenih mikroorganizama kod peri-implantitisa, peri-implantnog mukozitisa i pacijenata sa zdravim implantatima .....	52
4.4	Ekspresija molekula <i>Notch</i> signalnog puta kod pacijenata sa peri-implantitisom, peri-implantnim mukozitisom i zdravim implantatima .....	56
4.5	Ekspresija proinflamatornih citokina i medijatora koštane remodelacije u PI, PM i I grupama .....	58
4.6	Korelacija između ispitivanih mikroorganizama i genske ekspresije molekula Notch signalnog puta, proinflamatornih citokina i medijatora koštane remodelacije RANKL i OPG .....	61
4.7	Mikroorganizmi i klinički parametri .....	66
5.	DISKUSIJA .....	67
6.	ZAKLJUČCI.....	71
7.	LITERATURA.....	72

## 1. UVOD

Uvođenjem titanijskih zubnih implantata, započela je era moderne dentalne implantologije. Profesor anatomije *Per-Ingvar Brånemark* je 50-ih godina XX veka, proučavajući koštanu vaskularizaciju, slučajno primetio intimnu vezu između kosti i titanijskog implantata, danas poznatu kao pojam oseintegracija. Oseintegracija predstavlja direktnu strukturalnu i funkcionalnu vezu živog koštanog tkiva sa titanijumom od koga je izrađen implantat. Uvođenje principa oseintegracije prekretnica je u rešavanju različitih oblika bezubosti. Profesor *Brånemark* je tada razvio implantni sistem koji je podrazumevao specifičan protokol rada, namenjen nošenju zubnih nadoknada isključivo kod bezubih pacijenata i 1965. godine uspešno je tretiran prvi pacijent (1). Danas se implantološkoj terapiji podvrgavaju i parcijalno bezubi pacijenti. Tokom godina razvijali su se različiti implantni sistemi kao i protetske konstrukcije u odnosu na date indikacije. Najpre, kako bi bili u upotrebi, zubni implantati morali su da zadovolje određena svojstva kao što su: biokompatibilnost, funkcionalnost, otpornost i estetski zadovoljavajući efekat. Biokompatibilnost materijala podrazumeva njegovu apsolutnu neškodljivost oralnim tkivima i oralnoj sredini. Funkcionalnost i otpornost odnose se na aktivno učešće u mastikaciji i adekvatnu strukturalnu čvrstoću implantata kako bi odoleo opterećenju tokom samog akta. Takođe, dentalni implantati bi trebali da verodostojno imitiraju prirodni zub pritom ne remeteći izgled pacijenta (2-4).

Zubni implantati dokumentovani su kao sredstva za postizanje kompletne rehabilitacije usne duplje i poboljšanje kvaliteta života kod parcijalno i totalno bezubih pacijenata, sa visokim stepenom uspešnosti i preživljavanja nakon ugradnje (5, 6). Međutim, literaturni podaci sve češće ukazuju na pojavu komplikacija, kao i na porast stepena neuspeha terapije dentalnim implantatima (7). Uspeh implantatne terapije odnosi se na postojanje implantata u ustima, kao i postojanost protetske konstrukcije na njemu u funkciji najmanje 5 godina bez pojave znakova komplikacija, dok se stepen preživljavanja odnosi isključivo na fizičko prisustvo implantata u usnoj duplji. Preživljavanje se može kategorisati na zadovoljavajuće stanje i stanje koje karakteriše ugrožen opstanak implantata. Potpunim neuspehom implantološke terapije smatra se potreba za eksplantacijom ili gubitak implantata (8).

Razlikujemo dve kategorije komplikacija koje mogu pratiti implantatnu terapiju, a to su tehničke (mehaničke) i biološke komplikacije. Tehničke komplikacije mogu biti u vezi sa implantatom ili u vezi sa protetskim komponentama. Odnose se na smetnje u povezivanju implantata sa protetskim delom i frakture delova implantata ili protetskih komponenti (9). S druge strane, biološke komplikacije predstavljaju poremećaje u funkciji implantata usled bioloških procesa koji utiču na peri-implantna tkiva. Gubitak implantata klasifikuje se kao biološka komplikacija i razlikujemo rani i kasni gubitak.

Rani gubitak implantata nastaje kao posledica poremećaja procesa oseintegracije uzrokovanog različitim faktorima (10). Nemogućnost uspostavljanja direktnog kontakta između implantata i kosti ima za posledicu formiranje fibroznog ožiljnog tkiva i apikalno urastanje epitela, što rezultira povećanom mobilnošću implantata i na kraju njegovim gubitkom (11-13). Faktori koji mogu uticati na rani gubitak implantata jesu: kvalitet i kvantitet koštanog tkiva, hirurška tehnika i protokol ugradnje, neophodnost augmentacije kosti tokom hirurškog postupka ugradnje, same karakteristike implantata (makrodizajn i mikrodizajn), kao i faktori vezani za pacijenta (sistemska oboljenja i pušenje) i hirurga (iskustvo) (14, 15).

Kasni gubitak povezan je s inflamatornim procesima koji se javljaju u peri-implantnim tkivima. Ovi inflamatorni procesi indukovani su najčešće mikroorganizmima biofilma, koji se nalazi na okolnim mekim i čvrstim zubnim tkivima, kao i na površinama implantata eksponiranim oralnoj sredini (16). Ove biološke komplikacije manifestuju se u dve forme, kao peri-implantni mukozitis i peri-implantitis. Peri-implantni mukozitis je reverzibilno stanje, odlikuje se inflamacijom mekih peri-implantnih tkiva (krvarenje i/ili supuracija na provokaciju) ali bez gubitka marginalne kosti. Ovo stanje primarno je uzrokovano narušavanjem homeostaze između domaćina i mikroorganizama na površini peri-implantne mukoze (17). S druge strane, peri-implantitis karakteriše inflamacija peri-implantne mukoze (manifestuje se krvarenjem i/ili supuracijom na provokaciju) koja je udružena sa progresivnim gubitkom potpornog koštanog tkiva. Odsustvo lamine dure u kresalnoj regiji peri-implantnog koštanog tkiva na radiogramu, udruženo sa detekcijom dubokog peri-implantnog džepa ukazuje na gubitak peri-implantne kosti (18). Za razliku od drugih znakova koji se mogu detektovati kliničkim pregledom, gubitak koštanog tkiva definitivno se otkriva pomoću radiografije. Postoji nekoliko radiografskih tehnika pomoću kojih se može ustanoviti morfologija peri-implantnog koštanog tkiva. Razlikujemo dvodimenzionalne (2D) kao što su intraoralni radiogrami (retroalveolarni i retrokoronarni) i ortopantomogram i trodimenzionalne (3D) poput kompjuterizovane tomografije (*engl. computed tomography - CT*) i kompjuterizovane tomografije konusnog snopa (*engl. cone-beam computed tomography - CBCT*). Poredeći 3D i 2D radiografske metode, *Sebastian Kühn* i saradnici zaključili su da retroalveolarni radiogram ima najbolje karakteristike u pogledu otkrivanja koštanih defekata u regiji implantata (19, 20). Radiografski izmeren gubitak kosti koji iznosi 3mm ili više predstavlja jedan od dijagnostičkih kriterijuma peri-implantitisa (16). Peri-implantitis se odlikuje brzim, agresivnim i nelinearnim tokom i može dovesti do gubitka implantata (18).

Imajući u vidu etiopatogenezu peri-implantnih bioloških komplikacije, uočavaju se određene sličnosti u etiopatogenezi parodontalnih i peri-implantnih oboljenja (21). Parodontitis je hronično, multifaktorijalno, inflamatorno oboljenje koje zahvata potporna tkiva zuba – gingivu, cement, periodoncijum i alveolarnu kost (22). Uzrokovano je primarno mikroorganizmima dentalnog plaka, koji, izazivajući inflamaciju tkiva, menjaju imuni odgovor domaćina usled čega dolazi do progresivne destrukcije parodonticijuma. Iako se zub i implantat dosta razlikuju strukturno i histološki, klinička slika, koju odlikuje najpre inflamacija gingive u početnom stadijumu, praćena kasnije gubitkom koštanog tkiva i formiranjem džepa, povezuje ova dva oboljenja. Sličnost parodontitisa i peri-implantnih bolesti ogleda se i u etiopatogenetskom mehanizmu. Važnu ulogu u patogenezi različitih oboljenja usne duplje, uključujući parodontitis i peri-implantitis, ima međusobni odnos mikroorganizama usne duplje. Razvoj patoloških procesa započinje prevagom patogenih mikroorganizama u odnosu na saprofitnu floru kompatibilnu sa domaćinom (21). Parodontitis je jedan od glavnih uzročnika gubitka zuba kod odraslih, a dentalni implantati se veoma često upotrebljavaju u cilju njihove nadoknade (23, 24). *Quirynen* je sa saradnicima demonstrirao često prisustvo parodontopatogena u subgingivalnoj regiji implantata u slučajevima kada su isti mikroorganizmi bili prisutni i u regiji preostalih zuba (25). Različite studije pokazale su da čak i nakon gubitka zuba, glavni parodontopatogeni i dalje kolonizuju oralnu sredinu, stoga je i postojanje parodontitisa u pozitivnoj korelaciji sa gubitkom peri-implantnog koštanog tkiva i nastankom peri-implantitisa. Meka oralna tkiva mogu takođe biti rezervoar patogenih mikroorganizama koji mogu kolonizovati peri-implantni sulkus, odnosno džep. (26-29). Stoga, prisustvo parodontalnih patogena dovodi se u vezu i sa oboljenjima peri-implantnih tkiva. Ovi mikroorganizmi kolonizuju peri-implantnu regiju i indukuju imuni odgovor domaćina, što za posledicu ima ireverzibilnu i progresivnu destrukciju potpornih tkiva (18, 30).

## 1.1 Klasifikacija parodontalnih i peri-implantnih oboljenja i stanja

Kako bi se postavila dijagnoza i isplanirala odgovarajuća terapija, neophodno je postojanje adekvatne klasifikacije oboljenja parodontijuma. Sa novim saznanjima i napretkom nauke, javljale su se potrebe u modifikaciji klasifikacije oboljenja i stanja koje proučava parodontologija. Poslednja modifikacija ustanovljena je na svetskoj radionici parodontologa 2017. godine u Čikagu koja je okupila stručnjake Evropske federacije za parodontologiju (EFP) i Američke akademije za parodontologiju (AAP). Prvi put se u klasifikaciji oboljenja potpornog aparata zuba nalaze i peri-implantna oboljenja i stanja. Nova klasifikacija obuhvata stanja i oboljenja kako parodontalnih, tako i peri-implantnih tkiva (Tabela 1).

Do formiranja nove klasifikacije, gotovo 20 godina je u upotrebi bila prethodna, ustanovljena 1999. godine od strane AAP. Ona je podrazumevala preko 40 različitih oboljenja gingive, nekoliko kliničkih formi parodontopatije, parodontalne apscese, endoparodontalne lezije i stečene i razvojne deformitete i stanja parodontijuma. U osnovi razlikovala su se oboljenja gingive uzrokovana dentalnim plakom i ona koja nisu uzrokovana dentalnim plakom. Parodontopatija je bila klasifikovana kao hronična parodontopatija, agresivna parodontopatija, parodontopatija kao manifestacija sistemskih oboljenja i nekrozna oboljenja parodontijuma (ulceronekrozni gingivitis i ulceronekrozna parodontopatija) (31).

Prema poslednjoj i aktuelnoj klasifikaciji, oboljenja i stanja parodontijuma podrazumevaju (32):

- zdrav parodontijum, oboljenja i stanja gingive
- parodontitise, i
- druga stanja koja utiču na parodontijum.

Stanja i oboljenja peri-implantnih tkiva dele se na (32):

- zdrava peri-implantna tkiva
- peri-implantni mukozitis
- peri-implantitis, i
- deficijencije peri-implantnih mekih i čvrstih tkiva.

Tabela 1 - Klasifikacija parodontalnih i peri-implantnih oboljenja i stanja; tabela preuzeta iz rada *Caton i sar. 2018. (32)* prevedena i modifikovana.

<b>Stanja i oboljenja parodoncijuma</b>										
<b>Zdrav parodoncijum, oboljenja i stanja gingive</b>			<b>Parodontitisi</b>			<b>Druga stanja koja utiču na parodoncijum</b>				
Chaple, Mealey i sar. 2018. Trombelli i sar. 2018.			Papapanou, Sanz i sar. 2018. Jepsen, Caton i sar. 2018. Tonetti, Greenwell, Kornman 2018.			Jepsen, Caton i sar. 2018. Papapanou, Sanz i sar. 2018.				
Zdrav parodoncijum i zdrava gingiva	Gingivitis uzrokovani dentalnim biofilmom	Oboljenja gingive koja nisu uzrokovana dentalnim biofilmom	Nekrotizirajuća parodontalna oboljenja	Parodontitis	Parodontitis kao manifestacija sistemskih oboljenja	Sistemska oboljenja i stanja koja utiču na parodoncijum	Parodontalni apsces i endodontsko-parodontalne lezije	Mukogingivalni deformiteti i stanja	Traumatske okluzalne sile	Faktori povezani sa zubom ili protezom
<b>Stanja i oboljenja peri-implantnih tkiva</b>										
Berglundh, Armitage i sar. 2018.										
<b>Zdrava peri-implantna tkiva</b>	<b>Peri-implantni mukozitis</b>	<b>Peri-implantitis</b>	<b>Deficijencije čvrstih i mekih peri-implantnih tkiva</b>							

## 1.2 Parodontitisi

Parodontitisi predstavljaju multifaktorijalna, hronična, inflamatorna i destruktivna oboljenja koja zahvataju sve delove potpornog aparata zuba (gingivu, alveolarnu kost, cement korena zuba i parodontalni ligament). Pre poslednje modifikacije klasifikacije parodontalnih oboljenja, 19 godina je u upotrebi bila klasifikacija iz 1999. godine koja je razlikovala hroničnu i agresivnu parodontopatiju (lokalizovanu i generalizovanu), ulceronekrozu parodontopatiju i parodontopatiju kao manifestaciju sistemskih oboljenja. Novom klasifikacijom je termin parodontopatije zamenjen terminom parodontitisi i danas razlikujemo 3, a ne 4 kliničke forme. S toga prema etiologiji i toku oboljenja razlikujemo sledeće tipove parodontitisa:

- Nekrotizirajuća parodontalna oboljenja
- Parodontitis kao manifestacija sistemskih oboljenja, i
- Parodontitis.

Diferencijalna dijagnoza među pomenutim tipovima parodontitisa ogleda se u anamnezi i specifičnim znacima i simptomima nekrotizirajućeg parodontitisa, ili prisustvu, odnosno odsustvu nekog specifičnog sistemskog oboljenja koje menja imuni odgovor domaćina. Parodontitis nastao kao manifestacija sistemske bolesti treba da prati klasifikaciju primarne bolesti prema kodovima odgovarajuće Međunarodne statističke klasifikacije oboljenja i srodnih zdravstvenih problema (*ICD – International Classification of Diseases*). Preostali klinički slučajevi parodontitisa koji nemaju lokalne karakteristike nekrotizirajućeg parodontitisa ili karakteristike retkog sistemskog imunološkog poremećaja sa sekundarnom manifestacijom parodontitisa dijagnostikuju se kao „parodontitis“ koji je dalje okarakterisan sistemom stadijuma i stepena na osnovu kliničke slike, toka i prognoze (30, 33, 34).

### 1.2.1 Nekrotizirajuća parodontalna oboljenja

Nekrotizirajuće bolesti parodontijuma predstavljaju infektivna oboljenja koja imaju kao zajedničku karakteristiku nekrozu tkiva parodontijuma. Razlikujemo nekrotizirajući gingivitis, nekrotizirajući parodontitis i nekrotizirajući stomatitis. Nekrotizirajući gingivitis karakteriše pojava nekroze i ulceracija interdentalnih papila, krvarenje gingive i bol, dok se kod nekrotizirajućeg parodontitisa pored toga javlja i nekroza dubljih parodontalnih tkiva, odnosno rapidan gubitak potporne kosti. Od ostalih simptoma i znakova mogu se javiti halitoza, groznica, regionalna limfadenopatija, sijaloreja i pseudomembrane na gingivalnom tkivu. Ukoliko se ne tretiraju pravovremeno mogu progredirati u nekrotizirajući stomatitis, koji predstavlja teško inflamatorno stanje usne duplje, gde usled brzog napredovanja nekrotičnih promena može uslediti denudacija koštanog tkiva. Nastanak nekrotizirajućih parodontalnih oboljenja u bliskoj je vezi s oštećenim imunim sistemom domaćina. Najčešće se javlja kod imunodeficijentnih pacijenata kao što su oboleli od AIDS-a (*engl. Acquired immunodeficiency syndrome*), pothranjene dece i odraslih koji žive u lošim socio-ekonomskim uslovima ili pate od teških infekcija. Pored toga mogu se razviti i kod pacijenata sa psihološkim i socijalnim poremećajima, kao i kod pušača (30, 35).

### 1.2.2 Parodontitis kao manifestacija sistemskih oboljenja

Mnoga sistemska oboljenja i stanja mogu uticati kako na sam nastanak parodontitisa, tako i na tok i prognozu samog oboljenja. Parodontitis nastao kao manifestacija sistemskih oboljenja karakterišu destrukcija i gubitak tkiva potpornog aparata zuba koji se javlja kao posledica imunoloških poremećaja uzrokovanih prisustvom sistemskog oboljenja (33, 34).

### 1.2.3 Parodontitis

U odnosu na stepen oštećenja parodonticijuma i kompleksnost oboljenja i terapije razlikuju se 4 stadijuma parodontitisa (Tabela 2):

- I – inicijalni (početni) parodontitis
- II – umereni parodontitis
- III – uznapredovali parodontitis sa rizikom od daljeg gubitka zuba
- IV - uznapredovali parodontitis sa rizikom od gubitka svih zuba.

Stepen oštećenja procenjuje se spram najveće interdentalne vrednosti nivoa pripojnog epitela, gubitka alveolarne kosti na radiogramu i broja izgubljenih zuba, dok kompleksnost oboljenja i terapije definišu: dubina sondiranja, tip gubitka alveolarne kosti, furkacioni defekti, broj preostalih zuba, stepen labavljenja zuba, deformiteti grebena i mastikatorne disfunkcije. U odnosu na formu i zahvaćenost zuba postoje lokalizovana, generalizovana i incizivi-molari forma parodontitisa. Lokalizovanom formom smatra se parodontitis gde je manje od 30% zuba zahvaćeno oboljenjem (32).

Kada je u pitanju stepen progresije parodontitisa i predviđen odgovor domaćina na terapiju, razlikujemo (Tabela 3):

- Step A – spora progresija
- Step B – umerena progresija
- Step C – brza progresija

Rizik za progresiju oboljenja određuju direktni (radiografski gubitak kosti ili nivoa pripojnog epitela u funkciji vremena) ili indirektni dokazi (procenat izgubljene kosti u odnosu na starost), kao i prisustvo/odsustvo modifikujućih faktora (pušenje i dijabetes). Predviđen odgovor na terapiju zavisi od individualnog profila pacijenta i genetske predispozicije (32).



Tabela 2 - Klasifikacija parodontitisa prema stadijumima oboljenja u odnosu na stepen oštećenja parodoncijuma i kompleksnost.

Stadijum	Stepen oštećenja			Kompleksnost
	Interdentalni NPE	Radiografski gubitak kosti	Broj izgubljenih zuba	
<b>I</b>	1-2mm	< 15% u koronarnoj trećini	/	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DS ≤ 4mm</li> <li>- Horizontalni gubitak kosti</li> </ul>
<b>II</b>	3-4mm	15% - 33% u koronarnoj trećini	/	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DS ≤ 5mm</li> <li>- Horizontalni gubitak kosti</li> </ul>
<b>III</b>	≥ 5mm	Do sredine ili apikalne trećine korena	≤ 4 zuba	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DS ≥ 6mm</li> <li>- Vertikalni gubitak kosti ≥ 3mm</li> <li>- FUR II ili III klase</li> <li>- Umeren defekt grebena</li> </ul>
<b>IV</b>	≥ 5mm	Do sredine ili apikalne trećine korena	≥ 5 zuba	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Neophodna kompleksna rehabilitacija</li> <li>- Mastikatorna disfunkcija</li> <li>- Sekundarni okluzalni traumatizam ILZ ≥ 2mm</li> <li>- Opsežan defekt grebena</li> <li>- Pad vertikalne dimenzije zagrižaja</li> <li>- Manje od 10 parova antagonista</li> </ul>

DS - dubina sondiranja; NPE - nivo pripojnog epitela; FUR - furkacija; ILZ - indeks labavljenja zuba; mm - milimetar.

Tabela 3 - Klasifikacija parodontitisa u odnosu na stepen progresije i predviđen odgovor na terapiju.

Stepen oštećenja			A spora progresija	B umerena progresija	C brza progresija
Primarni kriterijumi	Direktni dokazi	Rdg gubitak kosti ili Gubitak NPE	nema gubitka kosti > 5 god	< 2mm za > 5 god	≥ 2mm za > 5 god
	Indirektni dokazi	% gubitka kosti/starosna dob	< 0,25	0,25 – 1	> 1
		Klinička slika	Obilne naslage biofilma i nizak stepen destrukcije	Destrukcija srazmerna količini biofilma	Destrukcija veća od očekivane u odnosu na količinu biofilma
Modifikatori stepena oštećenja	Faktori rizika	Pušenje	Nepušač	Pušač < 10 cigareta dnevno	Pušač ≥ 10 cigareta dnevno
		Dijabetes	Bez dijagnoze dijabetesa	HbA1c < 7%	HbA1c ≥ 7%

NPE - nivo pripojnog epitela; Rdg gubitak kosti - radiografski gubitak kosti; god - godina; HbA1c - glikozilirani hemoglobin; mm - milimetar.

### 1.3. Oboljenja i stanja peri-implantnih tkiva

Oboljenja peri-implantnih tkiva (peri-implantni mukozitis i peri-implantitis) su prvi put definisana 1993. godine na prvoj evropskoj parodontološkoj radionici održanoj u Švajcarskoj. Godinama su se brojne radionice bavile definisanjem, prevalencom, kao i terapijom ovih oboljenja (36, 37). Da bi se održalo zdravlje implantata ili blagovremeno prepoznali znaci određenih patoloških procesa i shodno tome sprovela terapija, važno je poznavati odlike peri-implantnih tkiva kako u zdravlju, tako i u bolesti. Stoga, precizna i uniformna definicija stanja peri-implantnih tkiva, od ključnog je značaja za rano otkrivanje oboljenja.

#### 1.3.1 Zdrava peri-implantna tkiva

Iako se smatra da zubni implantati trenutno predstavljaju najverodostojniju zamenu izgubljenom zubu, ipak postoje određene biološke razlike između peri-implantnog kompleksa i parodontijuma prirodnog zuba (Slika br. 1). Odsustvo periodontalnog ligamenta je najupadljivija razlika i definiše neelastičnu vezu između implantata i koštanog tkiva za razliku od one kod zuba. Usled nedostatka proprioceptora periodoncijuma, implantati nemaju fiziološku pokretljivost kao zub u alveoli u slučaju prevremenog ili traumatskog kontakta, zbog čega postojanje okluzalne disharmonije može biti veoma štetno (38).

Peri-implantna tkiva su ona koja se nalaze oko oseointegriranih dentalnih implantata. Razlikujemo mekotkivni deo – peri-implantnu mukožu koja se formira u fazi zarastanja nakon konekcije suprastrukture sa implantatom, i deo čvrstih tkiva, odnosno koštani deo koji formira čvrstu vezu sa implantatom (39, 40). Anatomico-histološke karakteristike mekog tkiva omogućavaju zaštitu koštanog tkiva, koje pruža potporu samom implantatu. Stoga promene koje rezultiraju destrukcijom peri-implantnih tkiva mogu značajno ugroziti kako uspeh, tako i preživljavanje samog implantata (41, 42).

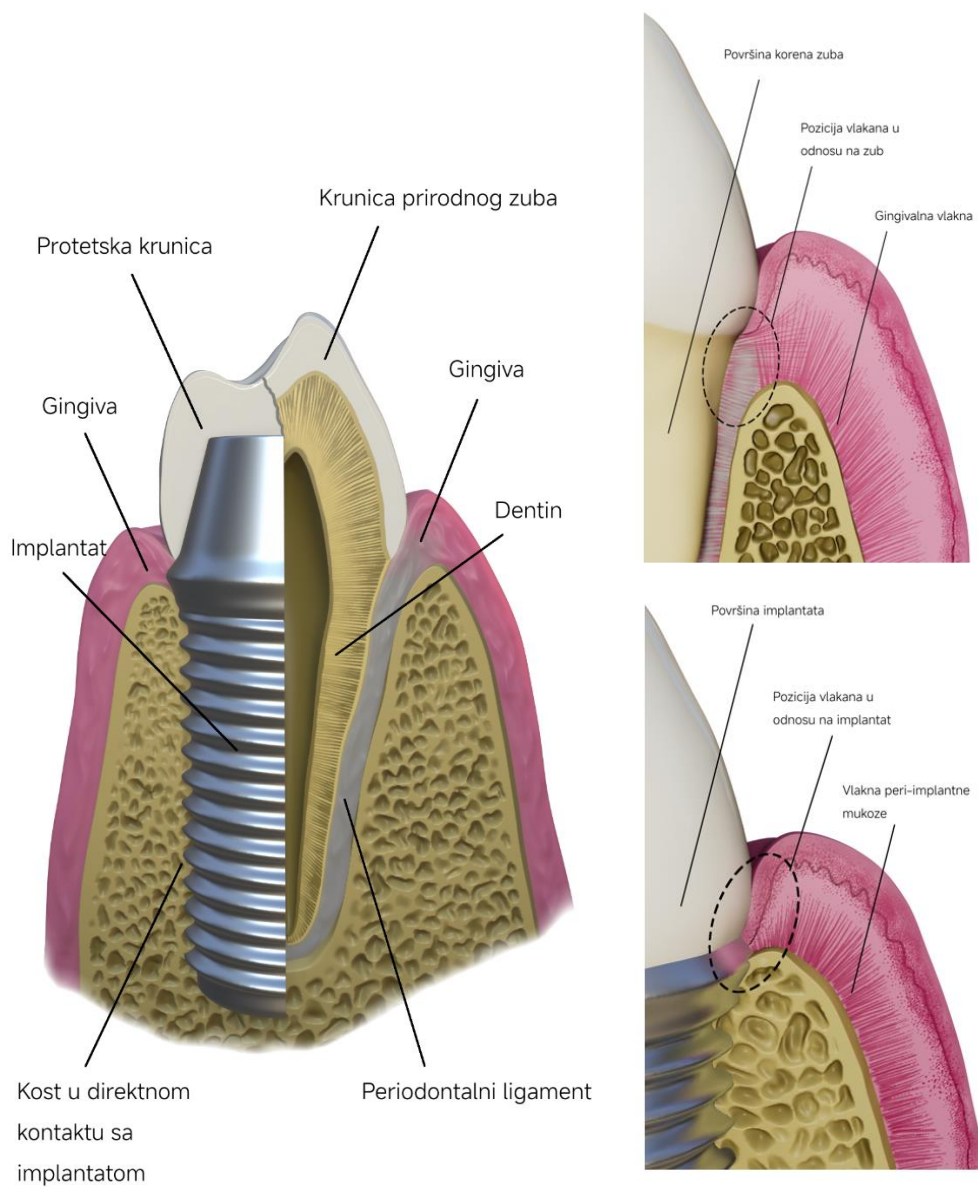
Zdravlje peri-implantnih tkiva ogleda se u odsustvu svih znakova inflamacije, od kojih je na prvom mestu krvarenje gingive na provokaciju. Klinički zdrava peri-implantna mukoza formira čvrstu vezu oko transmukoznih komponenti implantata, kao što su suprastruktura ili protetski rad (16). Histološke studije na životinjama pokazale su da se mukoza koja okružuje implantat u osnovi sastoji od vezivnog tkiva, čiji sastav 85% čine kolagena vlakna i elementi matriksa, 3% fibroblasti i 5% krvni sudovi. Sa spoljašnje strane prekrivena je pločasto slojevitim epitelom koji orožava. Unutrašnji sloj, koji je u kontaktu sa implantatom (odnosno suprastrukturom implantata), razlikuje dva dela: koronarni deo koji čine sulkusni epitel i tanka epitelna barijera nalik pripojnom epitelu gingive i apikalni deo koji predstavlja zonu vezivnog tkiva koje je u direktnom kontaktu s površinom implantata (42, 43). Vaskularni pleksus sličan dentogingivalnom, značajno je zastupljen u koronarnom segmentu peri-implantnog vezivnog tkiva, lateralno od barijernog i sulkusnog epitela. Nasuprot tome, apikalna zona vezivnog tkiva snabdevena je manjom količinom krvnih sudova. Osnovna kolagena vlakna se u peri-implantnoj mukozi pružaju paralelno sa površinom dentalnog implantata, usidrena samo jednim svojim krajem u alveolarnoj kosti (44, 45). U pogledu dimenzija zdrave peri-implantne mukoze, *Araujo* i *Lindhe* su na osnovu dostupnih životinjskih i humanih studija, na poslednjem konsenzusu zaključili da njena visina iznosi 3-4 mm, od čega je epitel dugačak 2mm. Istraživanja su takođe pokazala da je meko tkivo oko implantata manje rezistentno prilikom sondiranja u odnosu na gingivu oko zuba, što se pripisivalo nedostatku cementa korena kao i paralelnoj orijentaciji kolagenih vlakana u odnosu na površinu implantata.

Prilikom transmukoznog sondiranja, dimenzije peri-implantne mukoze iznosile su 1 do 1,5mm više u odnosu na gingivu odgovarajućeg zuba suprotne strane. Takođe veće dimenzije su detektovane kod pacijenata sa debljim paradontalnim fenotipom. Visina papile u regiji implantata zavisi od visine potporne kosti, kao i kod prirodnih agonista. U zdravlju, između krune na implantatu i zuba papila iznosi  $\leq 5\text{mm}$ , dok je detektovana srednja vrednost visine inter-implantatne papile 3mm (46-50). S druge strane, podaci su o širini keratinizovane gingive su kontraverzni. Naime, jedna grupa autora tvrdi da dimenzija keratinizovane mukoze ne utiče na zdravlje implantata, dok sve više njih pak sugerise da u slučaju širine keratinizovanog tkiva  $< 2\text{ mm}$ , usled akumulacije biofilma, brže dolazi do propagacije inflamacije (51-55).

Pored mekotkivnog kompleksa implantata, veliki uticaj na sam uspeh i preživljavanje implantata ima pre svega koštano tkivo, odnosno veza koju ostvaruje sa njim. Histološki koštano tkivo bezubog grebena u većoj meri čine lamelarna kost i koštana srž (46% i 23%), pored čega se u manjem procentu nalaze fibrozno tkivo i osteoid (12% i 4%). Nakon ugradnje implantata dolazi do formiranja čvrste veze između implantata i koštanog tkiva. Ova veza determinisana je kao oseointegracija, „direktna funkcionalna i strukturna veza između žive kosti i površine opterećenog implantata”(1, 38, 40, 56). Nakon ugradnje implantata i njegovog opterećenja, javljaju se različiti procesi modelacije i remodelacije okolnog koštanog tkiva, tokom čega dolazi do gubitka određene količine krestalne kosti. Na gubitak krestalne kosti mogu uticati različiti faktori, međutim 75% implantata nakon inicijalne faze zarastanja oseointegrise, bez dalje koštane resorpcije. U najvećem broju slučajeva gubitak krestalne kosti ne prelazi 1mm, dok se 2mm i više već pripisuju nekim patološkim procesima (41). Bez obzira što dubina sondiranja u regiji implantata zavisi i od visine gingivalnog kompleksa, a ne samo nivoa koštanog tkiva, u zdravoj regiji ne iznosi više od 5mm (42). Pored toga, treba napomenuti da zdravlje peri-implantnog tkiva može postojati i nakon lečenja peri-implantitisa, ali sa redukovanim nivoom koštane potpore (16).

Na osnovu svih ovih podataka, *Renvert* i autori su 2018. definisali peri-implantno zdravlje spram sledećih parametara (16):

1. Odsustvo vizuelnih znakova inflamacije peri-implantnog tkiva (svetlo ružičasta, neotečena, rigidna mukoza, nasuprot crvenoj, otečenoj meke konzistencije);
2. Odsustvo profuznog krvarenja na provokaciju prilikom sondiranja;
3. Dubina sondiranja zavisi od visine mekotkivnog kompleksa u regiji implantata, međutim povećanje dubine sondiranja u funkciji vremena kosi se za peri-implantnim zdravljem;
4. Izostanak gubitka kosti većeg od inicijalne resorpcije tokom zarastanja, koja ne sme biti veća od 2 mm.



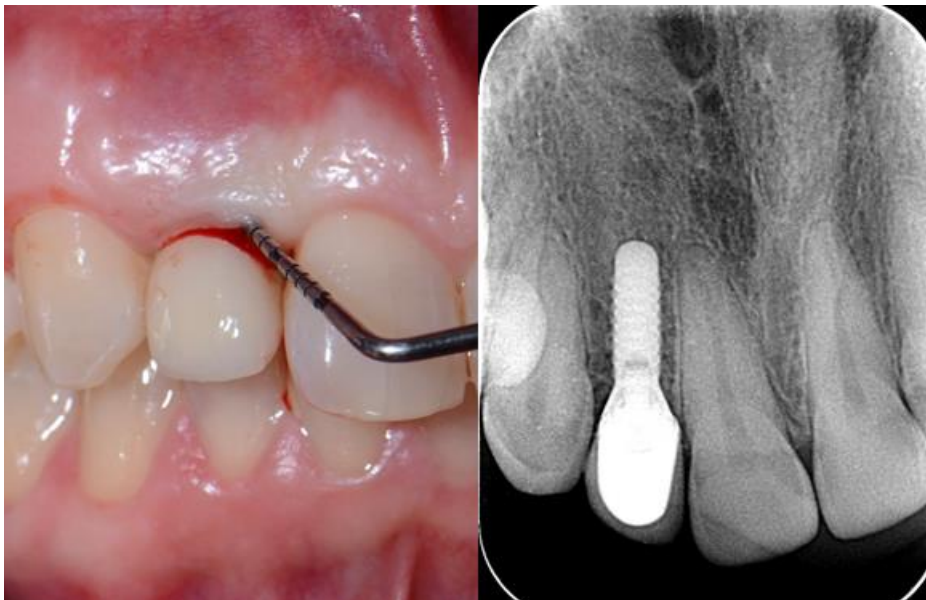
Slika br. 1 – Šematski prikaz anatomo-histoloških razlika između prirodnog zuba i implantata

### 1.3.2 Peri-implantni mukozitis

Prema poslednjoj svetskoj radionici, peri-implantni mukozitis definisan je kao „inflamatorna lezija sluzokože koja okružuje endoosealni implantat bez gubitka potporne peri-implantne kosti”. Reverzibilnog je karaktera, i nastaje najpre usled poremećaja homeostaze mikroorganizama i domaćina na nivou mekog tkiva. Klinički peri-implantni mukozitis karakteriše prisustvo osnovnih znakova inflamacije, od kojih je prvi krvarenje gingive na provokaciju, međutim mogu se takođe javiti enanem i otok, u određenim slučajevima čak i supuracija. Peri-implantni mukozitis smatra se prekursorom peri-implantitisa, stoga je veoma važno na vreme sprovesti terapijske mere u vidu eliminacije glavnog etiološkog faktora – biofilma, kao i uspostavljanja njegove kontrole od strane pacijenta radi održavanja zdravog tkiva (17, 32).

Klinička definicija slučaja peri-implantnog mukozitisa (16):

1. Inspekcijom se uočavaju znaci inflamacije peri-implantnog tkiva – crvena, otečena peri-implantna mukoza meke konzistencije;
2. Prisustvo profuznog krvarenja i/ili supuracije na sondiranje;
3. Povećanje dubine sondiranja u odnosu na inicijalnu;
4. Nema gubitka koštanog tkiva većeg od onog koje se dešava po ugradnji implantata, nakon opterećenja (gubitak krestalne kosti do 2mm tokom procesa zarastanja).



Slika br. 2 – Prikaz kliničkog slučaja peri-implantnog mukozitisa.

### 1.3.3 Peri-implantitis

Peri-implantitis predstavlja oboljenje peri-implantnih tkiva koje je okarakterisano prisustvom inflamacije peri-implantne mukoze koja je udružena sa progresivnim gubitkom alveolarne kosti (18, 37, 57). Smatra se da peri-implantitis nastaje progresijom peri-implantnog mukozitisa, međutim egzaktni patogenetski mehanizam tranzicije iz jednog stanja u drugo još uvek nije jasno definisan. Gubitak kosti oko implantata u funkciji koji je veći od 2mm tokom prvih godinu dana smatra se peri-implantitisom. Iz ovih razloga veoma je važno pratiti sve promene koje se dešavaju na nivou peri-implantnih tkiva od samog početka, od ugradnje i postavljanja protetskog rada, sa fokusom na prisustvo krvarenja na provokaciju ili supuracije jer oni mogu biti prvi znaci ovog oboljenja. Takođe važno je i radiografski pratiti nivo alveolarne kosti oko implantata (Slika br. 2) (18).

Definicija kliničkog slučaja peri-implantitisa (16):

1. Inflamacija peri-implantnog mekog tkiva uz prisustvo krvarenja na provokaciju i/ili supuracije;
2. Povećanje dubine sondiranja u odnosu na inicijalnu situaciju;
3. Progresivni gubitak koštanog tkiva oko implantata u prvih godinu dana od predavanja protetskog rada uočljiv na radiogramu;
4. U odsustvu inicijalnih podataka, radiografski gubitak kosti  $\geq 3\text{mm}$  i/ili dubina sondiranja  $\geq 6\text{mm}$  u kombinaciji sa profuznim krvarenjem na provokaciju definišu peri-implantitis.



Slika br. 3 – Prikaz kliničkog slučaja peri-implantitisa.

#### 1.3.4 Deficijencije čvrstih i mekih peri-implantnih tkiva

Nakon gubitka zuba, tokom procesa zarastanja dolazi do promena i čvrstih i mekih tkiva u pogledu dimenzija, koje za posledicu mogu imati deficijenciju ovih tkiva. Nedostatak peri-implantnog tkiva karakterišu gubitak marginalne kosti, kao i inflamacija ili recesija mekog tkiva (58, 59). Ove promene mogu uzrokovati pojavu komplikacija i samim tim ugroziti implantat, stoga zahtevaju tretiranje. Defekti čvrstih tkiva u regiji implantata mogu biti intra-alveolarni, horizontalni i vertikalni defekti bezubog alveolarnog grebena, fenestracije i dehiscencije. Deficit peri-implantnog mekog tkiva manifestuje se u vidu neadekvatnog kvaliteta i volumena, odnosno nedostatka keratinizovanog tkiva (60-62). Razlikujemo faktore pre i nakon ugradnje implantata koji doprinose razvoju deficijencija peri-implantnih tkiva (62, 63).

Uzroci nedostatka koštanog tkiva pre ugradnje implantata:

- Gubitak zuba,
- Trauma (uzrokovana ekstrakcijom zuba ili na drugi način),
- Parodontitis,
- Vertikalna fraktura korena zuba,
- Infekcije endodontskog i drugog porekla,
- Sistemska oboljenja koja utiču na koštanu morfogenezu,
- Povećana pneumatizacija maksilarnog sinusa,
- Kombinacija navedenih faktora.

Uzroci nedostatka koštanog tkiva nakon ugradnje implantata:

- Neadekvatna pozicija implantata,
- Mehaničko preopterećenje,
- Peri-implantitits,
- Tanak fenotip mukoze,
- Sistemska oboljenja,
- Defekti u zdravom stanju nastali iz nepoznatih razloga.



Faktori prisutni pre ugradnje implantata koji utiču na pojavu deficijencije mekog peri-implantnog tkiva:

- Gubitak zuba,
- Parodontitis,
- Sistemska oboljenja.

Faktori nakon ugradnje dentalnog implantata koji mogu dovesti do deficijencije mekog tkiva:

- Nedostatak bukalne koštane lamele,
- Širina i debljina keratinizovane gingive,
- Visina papile (implantat-zub / implantat-implantat),
- Migracija zuba,
- Skeletne promene koje nastaju u funkciji starenja organizma.

## 1.4 Etiologija oboljenja implantata nastalih kao posledica bioloških komplikacija

Novije studije pokazale su da mikroorganizmi biofilma imaju važnu ulogu u etiologiji i patogenezi peri-implantnih oboljenja (64). Slično prirodnim zubima, na implantatima i njihovim eksponiranim delovima takođe se formira biofilm (16). Biofilm koji nastanjuje peri-implantna tkiva i eksponirane površine samog implantata sastoji se od širokog spektra mikroorganizama koji mogu izazvati inflamaciju, i posledičnu progresivnu destrukciju potpornih tkiva. Samo 30 minuta od ugradnje implantata, mikroorganizmi adheriraju na njegovu površinu, a kroz par meseci, u peri-implantnom tkivu razvija se zajednica mikroorganizama slična onoj oko prirodnih zuba (65). Kako parodontalna i peri-implantna oboljenja dele brojne faktore rizika, i kako veću i češću tendenciju ka komplikacijama pokazuju implantati kod parodontološki kompromitovanih pacijenata, parodontitis se može posmatrati kao jedan od faktora rizika za nastanak peri-implantnih oboljenja (18, 26, 27, 66). Kod prirodnih zuba formiranje dentalnog plaka (biofilma) započinje veoma brzo, čak samo nekoliko minuta nakon pranja zuba i odvija se u 3 faze:

1. Formiranje sekundarne (stečene) dentalne pelikule
2. Inicijalna (primarna) kolonizacija sekundarne dentalne pelikule mikroorganizmima
3. Sekundarna kolonizacija mikroorganizmima iz usne duplje – sazrevanje biofilma

Dentalni biofilm čini složena zajednica mikroorganizama u matriksu glikoproteina. On predstavlja bezbojnu i opalescentnu, organsku bakterijsku naslagu koja se akumulira na zubima, mekim tkivima usne duplje, zubnim nadoknadama, ispunima, kao i ortodontskim aparatima i drugim materijalima prisutnim u ustima kao što su implantati. Čvrsto je vezan za površinu zuba, zbog čega se isključivo može ukloniti mehanički. Razlikujemo supragingivalni i subgingivalni dentalni biofilm. Supragingivalni biofilm se formira u gingivalnoj trećini krunice zuba i u direktnom je kontaktu sa slobodnom gingivom, dok je subgingivalni lokalizovan u gingivalnom sulkusu ili gingivalnom i parodontalnom džepu (67-69).

Odmah nakon čišćenja, površina zuba dolazi u kontakt sa produktima pljuvačke, gingivalne tečnosti i bakterija i najpre se formira sekundarna, odnosno stečena dentalna pelikula. Reč je o organskoj naslazi na površini zuba nastaloj deponovanjem pozitivno naelektrisanih molekula kao što su glikoproteini i lipidi pljuvačke, proteini bogati prolinom, statherin, histatin i alfa-amilaza. Ovi pozitivno naelektrisani molekuli bivaju privučeni negativno naelektrisanim jonima hidroksiapatita zuba (70). Uloge sekundarne pelikule ogledaju se u zaštiti zuba od isušivanja i u redukciji atricije zuba usled mastikacije jer se ponaša i kao lubrikant. Takođe, veoma je dobra podloga za adheziju mikroorganizama iz usne duplje. Stečena zubna pelikula održava visoku koncentraciju kalcijuma, s toga učestvuje i u remineralizaciji zuba (71, 72). Pored stečene, razlikujemo i primarnu dentalnu pelikulu (*Nasmyt*-ovu membranu) koja se formira u toku nicanja zuba, a isčezava kasnije usled abrazivnog dejstva hrane kada zubi dostignu svoju punu funkciju (67).

Veoma brzo nakon formiranja sekundarne zubne pelikule, započinje inicijalna kolonizacija gram-pozitivnim mikroorganizmima. Gram-pozitivne koke i bacili se, pomoću specifičnih molekula koje poseduju na svojim površinama – adhezina i specijalnih vlaknastih produžetaka – fimbrija, vezuju za stečenu dentalnu pelikulu (73). Nakon prvobitne adhezije, nastaje nagomilavanje bakterija koje se dalje razmnožavaju, pa se kolonije šire, uvećavaju i međusobno spajaju. U ovoj fazi formira se nezreli dentalni plak, u kome dominiraju anaerobni mikroorganizmi, pretežno gram-pozitivne koke kao što su *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* i bakterije iz roda *Neisseria* (68, 74). U uslovima neadekvatne oralne higijene, nastavlja se dalje formiranje, odnosno sazrevanje dentalnog plaka. Nezreli dentalni plak poput semipermeabilne membrane, propušta hranljive sastojke uglavnom ugljene hidrate, ali i druge materije koje primarnim kolonizatorima služe kao izvor energije (67).

Sazrevanje dentalnog plaka karakteriše sekundarna kolonizacija mikroorganizmima koja se odvija od drugog do četvrtog dana. Nakon adhezije primarnih kolonizatora, nastavlja se dalje formiranje biofilma, umnožavanjem istih i koagregacijom sekundarnih mikroorganizama. Ove bakterije imaju sposobnost da se vežu za primarni sloj i takođe da to omoguće i organizmima koji ne poseduju takve osobine. Vremenom se troši kiseonik što omogućava dalje naseljavanje biofilma anaerobnim mikroorganizmima. Sekundarni kolonizatori su uglavnom gram-negativne bakterije kao što su *Actinomyces* vrste, *Capnocytophaga* vrste, *Prevotella intermedia* i *Fusobacterium nucleatum*. Koagregacija primarnih i sekundarnih kolonizatora omogućena je proteinima i ugljenim hidratima koji se nalaze na membranama bakterijskih ćelija i pomoću *Van der Waals*-ovih sila. Ovakva koagregacija koka i filamentoznih bakterija na mikroskopskom nalazu daje specifičan izgled dentalnom biofilmu koji podseća na „klip kukuruza” (75, 76). Ukoliko se ne ometa sazrevanje dentalnog plaka u periodu od 7 dana, menja se njegov mikrobiološki profil, gde gram-negativne anaerobne bakterijske vrste pojačano kolonizuju sredinu. U ove mikroorganizme ubrajaju se *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Treponema denticola*. Na samo formiranje, sazrevanje i mikrobiološki sastav dentalnog plaka mogu uticati različiti faktori. Mikrobiološki sastav biofilma zavisi od starosti plaka, njegove lokalizacije, elektrohemijske sredine, kao i stanja parodontijuma (67).

U slučaju zubnih implantata, razlike u histološkoj građi potpornih tkiva zuba i implantata, čine sam implantat podložniji nastanku infekcije. Za razliku od zuba implantati ne poseduju periodoncijum i cement, usled čega formiraju direktan kontakt sa koštanim tkivom (oseointegracija) (77). Peri-implantna mukoza je strukturno sačinjena od oralnog epitela sa spoljašnje strane, kome sa unutrašnje odgovara sulkusni epitel. Oralni epitel je po građi pločasto slojeviti epitel koji orožava, dok je sulkusni pločasto slojeviti epitel bez orožavanja. Apikalnije od njih, nalazi se pripojni epitel koji je po histološkim karakteristikama sličan istoimenom oko prirodnih zuba. Ovaj epitel udaljen je 1-1,5mm od koštanog tkiva od koga je odvojen vezivnim tkivom koje takođe ima određene sličnosti sa onim u regiji prirodnih zuba. Međutim, kao što je već spomenuto, ove strukture su slične, ali ne i iste. Razlike se zapravo ogledaju u ćelijskom sastavu i orijentaciji kolagenih vlakana (43, 77, 78).

Suprakrestalni tkivni pripoj implantata (raniji nazivan biološka širina) čine pripojni epitel i vezivno tkivo. Pripojni epitel je u direktnom kontaktu sa glatkom površinom suprastrukture ili implantata, sastoji se iz manje redova ćelija i tanji je i duži od pripojnog epitela oko prirodnog zuba (43, 79). Zatim, usled nedostatka periodontalnog ligamenta, vaskularizacija je ograničena samo na suprapariostalne krvne sudove, a samim tim je limitirana i ekstravazacija nutrijenata i ćelija imunog sistema koje imaju odbrambenu ulogu u ranoj fazi infekcije. Dodatno, kolagena vlakna koja se nalaze u suprakrestalnom vezivnom tkivu oko implantata poreklom su iz periosta alveolarne kosti. Ova vlakna organizovana su u najvećem broju paralelno, a poneka i cirkumferencijalno u odnosu na površinu implantata (80). Pružajući se u apiko-koronarnom pravcu, prostiru se i prepliću u mekom tkivu i ne uspostavljaju nikakvu vezu sa površinom implantata. Jednim krajem nalaze se u kosti, dok se drugim završavaju u mekom tkivu. Kod prirodnih zuba u periodoncijumu kolagena vlakna orijentisana su perpendikularno, jednim svojim krajem inserirana su u cement korena zuba, dok se drugim krajem nalaze u koštanom tkivu. Ovakav položaj snopova kolagenih vlakana kod zuba predstavlja uporište sulkusnom epitelu, sprečava migraciju pripojnog epitela i ometa invaziju mikroorganizama u dublja tkiva parodonticijuma (81). Snopovi vlakana u regiji prirodnih zuba pričvršćeni su za cement duž čitave površine korena, stvarajući više odeljaka, koji predstavljaju multiple prepreke i na taj način sprečavaju širenje i napredovanje oboljenja. Nasuprot tome, kod implantata postoji samo jedan odeljak, sačinjen od vlakana suprakrestalnog vezivnog tkiva koje okružuje implantat. Usled nastanka i razvoja parodontitisa, u regiji zuba u najvećem broju slučajeva se formiraju jasno lokalizovani supra- ili infrakoštani defekti, dok je za peri-implantitis karakterističnija pojava cirkumferencijalnih koštanih defekata ili kratera oko implantata (82). Ove razlike peri-implantnu mukožu čine slabijom fizičkom barijerom protiv prodora mikroorganizama (65, 83, 84).

#### 1.4.1 Oralni mikrobiom

Od samog rođenja humani organizam nastanjuju brojni mikroorganizmi koji žive u simbiozi sa svojim domaćinom i imaju ulogu u njegovoj zaštiti. Ovi saprofiti učestvuju u mnogim procesima koji se odigravaju u organizmu i na taj način grade naš imuni sistem (85-87). Mikrobna flora kože, digestivnog trakta, respiratornog trakta i usne duplje međusobno se razlikuju bez obzira što se konstantan transfer mikroorganizama vrši između ovih sistema. Ova raznolikost mikrobioloških profila posledica je značajnih fizioloških i bioloških razlika među samim sistemima (88).

Razvojem nauke u pogledu metoda za detekciju i raspoznavanje mnogobrojnih mikroorganizama, poboljšalo se i znanje o oralnom mikrobiomu, njegovom uticaju na zdravlje usne duplje i oboljenja koja se mogu javiti u njoj, kao i na sistemsko zdravlje (89, 90). U usnoj duplji, mikroorganizmi mogu nastaniti različita tkiva, bogata raznovrsnim nutrijentima, dajući uslove za njihov razvoj, što doprinosi kolonizaciji različitih mikrobni zajednica. Kolonije različitih bakterijskih vrsta mogu se pronaći na različitim mestima u usnoj duplji. Takođe i u uslovima zdravlja prisutne su individualne varijacije mikrobiološkog profila (91-93).

Poznavanje mikrobiološkog sastava usne duplje od značaja je radi boljeg razumevanja njegove uloge u razvoju oralnih oboljenja. Usna duplja je veoma kompleksan ekosistem sačinjen od velikog broja različitih bakterijskih vrsta, ali takođe i drugih tipova mikroorganizama kao što su virusi, gljivice, arheje i protozoe (94). Više od 700 bakterijskih vrsta identifikovano je u oralnim uzorcima. Ovi mikroorganizmi uglavnom žive u simbiozi sa domaćinom, međutim u određenim situacijama mogu biti pokretači mnogih oboljenja (95). Kvalitativne i/ili kvantitativne promene oralnog mikrobioma mogu dovesti do disbioze, odgovorne za razvoj oboljenja uzrokovanih mikroorganizmima (96). Kao i paradontalni džepovi, peri-implantantni džepovi predstavljaju idealnu sredinu za rast i razvoj mikroorganizama, s anaerobnim uslovima i nutrijentima prisutnim u gingivalnoj, odnosno peri-implantnoj tečnosti (87).

#### 1.4.2 Mikroorganizmi biofilma

Biofilm može nastaniti različite površine kao što su prirodni materijali iznad i ispod zemlje, plastika, metal, biljna i humana tkiva, kao i materijale od kojih su izrađena medicinska pomagala - implantati. Mikroorganizmi biofilma formiraju kolonije od kojih je svaka nezavisna zajednica prilagođena sopstvenim potrebama za život. Usna duplja kao vlažna sredina predstavlja veoma povoljnu sredinu za rast i razvoj mnogih mikroorganizama, koji naseljavaju mukozu i zubna tkiva formirajući raznovrsne trodimenzionalne, strukturno organizovane zajednice koje nazivamo biofilm (97). Usled procesa keratinizacije mekih tkiva usne duplje, na mukozu se ne zadržava veća količina, međutim, na čvrstim površinama kao što su zubna tkiva i površine dentalnih implantata, biofilm se u većoj meri može formirati i akumulirati. Kao što je pomenuto, smatra se da peri-implantitis ima sličnosti sa parodontitisom u pogledu određenih mikroorganizama, pre svega parodontopatogena iz dentalnog biofilma koji nastanjuju i peri-implantni sulkus, a prepoznati su kao glavni uzročnici ovih oboljenja (98). Na sastav oralnog mikrobioma utiče više faktora: oralna higijena, način ishrane i života pacijenta, sistemska oboljenja, fiziološka stanja, kao i uzrast. Pušenje favorizuje prisustvo određenih patogenih mikroorganizama u biofilmu. Takođe, dokazano je da su pojedini gram-negativni mikroorganizmi u većoj meri zastupljeni u dentalnom biofilmu obolelih od dijabetesa. Mikrobiološki profil nije isti kod dece tokom nicanja zuba i u starosti sa smanjenim imunim sposobnostima domaćina. Prevalenca određenih patogenih mikroorganizama u biofilmu može biti i hormonski uslovljena tokom trudnoće (99, 100). Jednom uspostavljena mikrobiološka kompozicija biofilma stabilna je u funkciji vremena, međutim, svaka promena može poremetiti ravnotežu između mikroorganizama i uzrokovati nastanak oboljenja. Dentalni biofilm formira se tačno utvrđenim sledom događaja, što kao rezultat ima stvaranje funkcionalne zajednice mikroorganizama, dok patogenost samog dentalnog biofilma određuju specifične karakteristike pojedinih mikroorganizama (101).

*Socransky* i saradnici (89) su pomoću klaster analize klasifikovali mikroorganizme subgingivalnog biofilma po kompleksima različitih boja. Klaster analiza je statistička istraživačka tehnika koja se odnosi na otkrivanje još uvek nepoznatih zajednica. Primarni cilj ovakve analize jeste grupisanje, u ovom slučaju mikroorganizama sličnih karakteristika i svojstva (102). Spram ovoga razlikuju se žuti, zeleni, ljubičasti, narandžasti i crveni bakterijski kompleksi subgingivalne regije prikazani u Tabeli br. 4. Uloga ovih bakterijskih mikroorganizama do sada je vrlo dobro utvrđena u etiopatogenezi paradontalnih oboljenja. Mikroorganizmi crvenog i narandžastog kompleksa poznati su parodontopatogeni.

Prilikom ispitivanja prevalencije ovih mikroorganizama u odnosu na dubinu prisutnih džepova, vrste iz crvenog kompleksa bile su dominantnije. Zastupljenost bakterija *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* i *Treponema denticola* direktno je proporcionalna povećanju dubine džepa. Takođe, sve vrste narandžastog kompleksa, pogotovo *Prevotella intermedia* i *Fusobacterium nucleatum*, pokazale su značajnu povezanost sa povećanjem dubine džepova. Suprotno tome, bakterije preostalih kompleksa nisu bile prevalentne u dubokim džepovima. Crveni kompleks i pojedinačne vrste ove grupe dovode se i u blisku vezu sa krvarenjem gingive pri sondiranju (89).

Tabela 4 – Subgingivalni mikroorganizmi razvrstani po kompleksima

Žuti kompleks	Zeleni kompleks	Ljubičasti kompleks	Narandžasti kompleks	Crveni kompleks
Streptococcus mitis	Capnocytophaga gingivalis	Actinomyces odontolyticus	Prevotella intermedia	Porphyromonas gingivalis
Streptococcus sanguis	Capnocytophaga sputigena		Prevotella nigrescens	
Streptococcus oralis	Capnocytophaga ochracea	Veillonella parvula	Streptococcus constelatus	Tannerella forsythia
Streptococcus gordonii	Agregatibacter actinomycetemcomitans serotip A		Campylobacter gracilis	
Streptococcus intermedius	Eikenella corrodens		Campylobacter rectus	
	Campylobacter concisus		Campylobacter showae	Treponema denticola
			Eubacterium nodatum	
			Fusobacterium nucleatum podvrste	
			Fusobacterium periodonticum	
			Peptostreptococcus micros	
Bakterije nesvrstane u komplekse	Actinomyces naeslundii 2 Selenomonas noxia Agregatibacter actinomycetemcomitans serotip B			

### 1.4.3 Mikrobiološke karakteristike peri-implantne niše

Materijali koji se koriste u stomatologiji su plak prijemčivi, zbog čega je i povećan rizik od nastanka oboljenja uzrokovanih dentalnim plakom, odnosno biofilmom (103). Nakon ugradnje dentalnog implantata i postavljanja protetskih komponenti njegove površine izložene oralnoj sredini gotovo odmah obloži salivarna pelikula. Salivarna pelikula predstavlja dobru podlogu za adherenciju mikroorganizama iz usne duplje, usled čega najpre dolazi do adhezije primarnih bakterijskih kolonizatora. Primarni kolonizatori pomoću receptora prisutnih na svojim površinama, dalje obezbeđuju uslove za koadheziju kasnih (sekundarnih) kolonizatora (104). Dok stečena dentalna pelikula koja pokriva zube ima zaštitnu ulogu, salivarna pelikula koja se formira na stomatološkim materijalima olakšava adheziju bakterija i sazrevanje biofilma. Takođe, fizičko-hemijske osobine materijala mogu uticati na formiranje pelikule kao i kompoziciju mikroorganizama koji će se vezati za nju (103). Bez obzira na do sada pokazane mikrobiološke sličnosti u etiopatogenezi parodontalnih i peri-implantnih oboljenja, ipak postoje određene molekularne razlike u pelikuli koja oblaže metalne površine implantata i onoj koja pokriva gleđ krunice zuba. Pokazalo se da titanijumske pelikule formirane u *in vitro* uslovima sadrže proteine bogate prolinom, sekretorni imunoglobulin A (IgA),  $\alpha$ -amilazu i mucine visoke molekularne težine. Od dentalne pelikule razlikuje se po nedostatku cistatina i mucina manje molekularne težine (105). Samim tim raznolikost taksonomskog sastava biofilma koji pokriva implantate nije značajna u prvim mesecima od ugradnje i siromašnija je od mikrobioma susednih zuba (106). U ovoj fazi, bakterijske zajednice koje kolonizuju peri-implantnu nišu uspostavljaju simbiozu sa domaćinom i povezani su sa zdravljem peri-implantne regije. Ipak, ukoliko su prisutni faktori koji promovišu rast biofilma, inflamatorni procesi bivaju inicirani, usled čega dolazi i do promene u sastavu mikrobioma peri-implantnog sulkusa. Modifikacije mikrookruženja zauzvrat rezultiraju mikrobiološkom disbiozom, progresijom inflamacije, što konačno remeti zdravlje peri-implantnih tkiva i funkcionalnost samih implantata (83, 107).

Ranije su se za identifikaciju mikroorganizama, prevashodno bakterijskih, povezanih sa peri-implantnim infekcijama, najčešće koristile tehnike uzgoja zasnovane na anaerobnoj kulturi i mikroskopiji faze kontrasta. Shodno tome, u peri-implantnom zdravlju uglavnom su detektovane gram-pozitivne koke i nepokretni bacili. U lezijama peri-implantnog mukozitisa ove metode pokazale su povećano prisustvo koka, pokretnih bacila i spiroheta, dok su kod peri-implantitisa bile prisutne gram-negativne anaerobne vrste (108).

Molekularnim tehnikama za analizu genetskog materijala, kao što su lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase chain reaction* - PCR), fluorescentna *in situ* hibridizacija i hibridizacija DNK-DNK ploče, preciznije su definisane vrste bakterija pronađene kod peri-implantnih oboljenja. Vrste pronađene ovom metodologijom bili su uobičajeni parodontopatogeni pripadnici crvenog kompleksa *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* i *Treponema denticola*, kao vrste iz narandžastog kompleksa *Prevotella intermedia*, *Bacteroides* i *Filifactor spp.* (109-111). Takođe, prisustvo *Fusobacterium nucleatum-a* se navodi u studijama, međutim pojedini autori zaključuju da ovaj mikroorganizam sa patogenima, kao što su *Prevotella intermedia* i *Porphyromonas gingivalis* koegzistiraju i u zdravlju i u bolesti peri-implantnog tkiva sa većom relativnom zastupljenošću na obolelim mestima (112). Ovu tvrdnju podržale su i studije koje su poredile mikrobiom zdravog i obolelog tkiva koje okružuje implantate, koje su takođe peri-implantitis povezale sa visokim brojem bakterijskih vrsta kao što su *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (113).

Skorija meta-analitička studija je pomoću lančane PCR metode pokazala veću prevalencu bakterija *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Prevotella intermedia* u biofilmu peri-implantitisa u odnosu na zdrave implante. Nasuprot tome, nekoliko istraživanja obuhvaćenih ovom meta-analizom, pokazali su prisustvo *Actinomyces spp.*, *Porphyromonas spp.* and *Rothia spp.* i kod zdravih, kao i kod uzoraka parodontopatije i uzoraka sa peri-implantitisom, na osnovu čega je zaključeno da nalazi ove meta-analize ne pokazuju dosledan i specifičan mikrobiološki profil (114).

Pored bakterija, neki humani virusi iz porodice Herpes virusa, kao što su *Epstein-Barr virus (EBV)*, *Cytomegalovirus (CMV)* i Herpes simpleks virus 1 (*HSV 1*), takođe su identifikovani kao stanovnici parodontalnih lezija (115). Ovi herpes virusi su pronađeni u značajno većem broju kod parodontološki kompromitovanih pacijenata u poređenju sa zdravim ispitanicima (116). Virusno-bakterijska superinfekcija doprinosi destrukciji parodontalnih tkiva, sa uticajem virusa na oslobađanje proinflamatornih citokina i aktivaciju osteoklastnih signalnih puteva takođe (115, 116). Pored toga, u porastu su i dokazi da u etiopatogenezi peri-implantnih oboljenja ne učestvuju samo anaerobne bakterije, već i virusi koji su isto tako odgovorni za stimulanse koji izazivaju destrukciju tkiva sličnu onoj kao kod parodontitisa (117). Kod peri-implantitisa, povećana je učestalost humanih herpes virusa, što utiče na razvoj proinflamatornog okruženja koje karakterišu povećani nivoi salivarnog faktora nekroze tumora alfa (*engl. tumor necrosis factor alpha - TNF- $\alpha$* ) (118, 119). Osim toga visoka prevalenca *EBV*-a i *CMV*-a u peri-implantnim lezijama povezuje se sa početkom i razvojem patoloških događaja peri-implantnih oboljenja (120, 121).

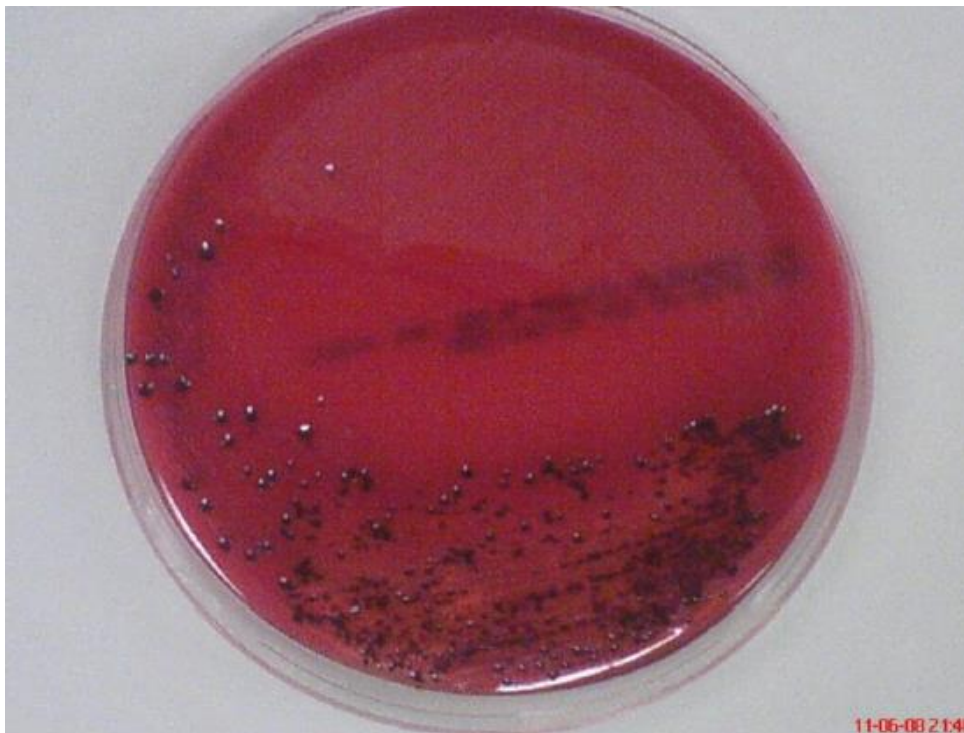
Takođe, gljivice iz roda *Candida* predstavljaju važnog stanovnika usne duplje i često se dovode u vezu sa formiranjem biofilma na medicinskim implantatnim uređajima u koje spadaju i dentalni implantati (122). Već je poznato da gljivice iz roda *Candida* koje su pronađene u subgingivalnom oralnom biofilmu imaju ulogu u nastanku parodontitisa (123). *Montelongo-Jauregui* i dr. procenjivali su učestalost peri-implantnih oboljenja u odnosu na porast gljivice *Candida albicans* i različitih bakterijskih vrsti na titanijumskim diskovima i pokazali su da korelacija ove gljivice sa određenim bakterijama biofilma dovodi do pojave rezistencije na antimikrobne lekove (124). Ovi rezultati mogu biti pokazatelj da *Candida albicans* igra određenu ulogu u etiopatogenezi peri-implantitisa, međutim ona još uvek nije egzaktno razjašnjena.



#### 1.4.4 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)

Ranije poznata kao *Bacteroides gingivalis*, a sada *P. gingivalis*, jedan je od glavnih mikroorganizama, stanovnika subgingivalne regije usne duplje kod čoveka. Predstavlja gram-negativnu, nepokretnu, asaharolitičku štapičastu bakteriju. Obligatorni je anaerob, apsolutno zavistan od gvožđa i prilikom kultivisanja na pločama krvnog agara formira crno-pigmentisane kolonije (Slika br. 4) (125, 126). Energiju proizvodi fermentacijom aminokiselina, kako bi sebi obezbedio opstanak u dubokoj subgingivalnoj regiji, gde je šećer slabo dostupan (127). *P. gingivalis* kao obligatorni anaerobni mikroorganizam svrstava se u sekundarne kolonizatore biofilma. Zajedno sa bakterijama *Treponema denticola* i *Tanarella forsythia* formira crveni kompleks mikroorganizama po *Sokranyskom* koji je prisutan kod uznapredovalih parodontitisa (89, 128).

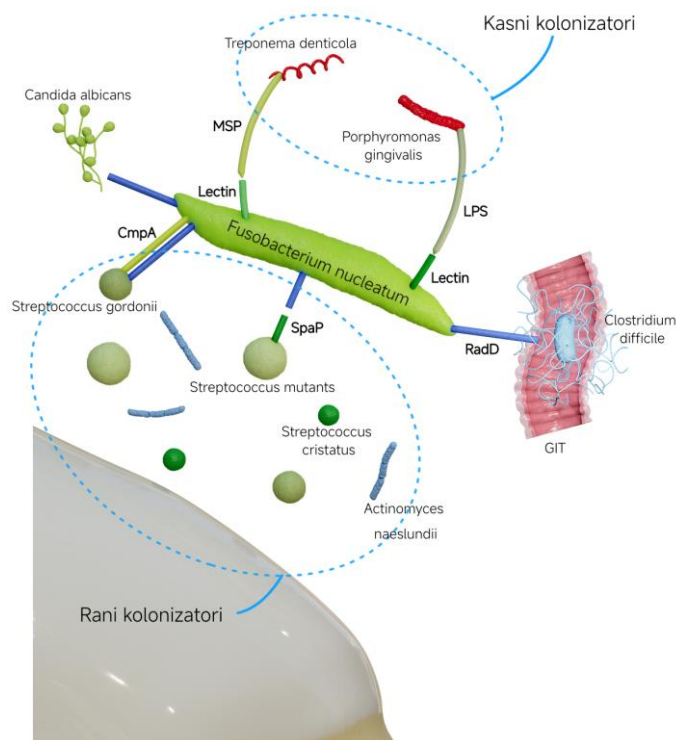
Razlikuju se invazivni i neinvazivni sojevi *P. gingivalis*-a i u *in vitro* i *in vivo* uslovima, a invazivni soj je pokazao veću patogenu aktivnost (129, 130). U interakciji s ostalim mikroorganizmima domaćina, ova bakterija sintetiše različite patogene faktore, tj. faktore virulencije. Faktori virulencije predstavljaju specifične karakteristike mikroba koji doprinose njihovoj sposobnosti da izazovu oboljenje kod domaćina. Pomoću faktora virulencije *P. gingivalis* prodire u gingivu, izaziva inflamaciju i na taj način direktno ili indirektno dovodi do destrukcije tkiva (131).



Slika br. 4 – *P. gingivalis*, crno-pigmentisane kolonije na agaru krvi; slika preuzeta iz rada *Kah Yan How i sar. 2016* (125)

### 1.4.5 *Fusobacterium species (spp.)*

*Fusobacterium spp.* predstavlja rod gram-negativnih, striktno anaerobnih štapićastih bacila. Vrste ovog roda su normalni stanovnici orofaringealnog, gastrointestinalnog i genitalnog trakta (132). *Fusobacterium spp.* izazivaju različite infekcije kod ljudi, među kojima su i oboljenja usne duplje. Glavni predstavnik ovog roda jeste bakterija *Fusobacterium nucleatum*, oportunistički patogen, stanovnik usne duplje. U zdravoj oralnoj sredini *Fusobacterium nucleatum* može uspostaviti simbiozu sa domaćinom. Međutim, prilikom interakcije sa drugim patogenima mogao bi da poremeti ravnotežu i dovede do teških oralnih infekcija (133-135). U usnoj duplji u procesu sazrevanja biofilma, *Fusobacterium nucleatum* se ponaša kao intermedijarni mikroorganizam, vezujući se za predstavnike gotovo svih kolonizatora i ranih i kasnih (136, 137). Izuzetna moć adhezije udružena sa invazivnim svojstvima ovog mikroba predstavljaju važan mehanizam koji izaziva infekciju kod domaćina (138-140). Pored toga, *Fusobacterium nucleatum* deluje i kao promoter koji poboljšava međudodnos nekih ranih i kasnih kolonizatora. Neinvazivni mikroorganizmi mogu se transportovati u epitelne ćelije domaćina usled koagregacije sa *Fusobacterium nucleatum*-om (141). *P. Gingivalis*, priznati parodontopatogen crvenog kompleksa koji učestvuje u razvoju parodontitisa, dramatično je inferioran po invazivnosti u odnosu na *Fusobacterium nucleatum*, koji se smatra virulentnijim za ćelije domaćina (142, 143). Dokazano je da koinfekcija sa *Fusobacterium nucleatum* pojačava invazioni kapacitet *P. gingivalis*-a u ćelijama oralnog epitela (144). Posedujući osobine promotera, *Fusobacterium nucleatum* predstavlja jednog od ključnih patogenih mikroorganizama u mešovitim infekcijama domaćina (145).



Slika br. 5 – *Fusobacterium nucleatum* – šematski prikaz ovog mikroorganizma kao koagregatora primarnih i sekundarnih kolonizatora

#### 1.4.6 Humani herpes virusi

Do sada je uloga humanih herpes virusa pokazana kao značajna kada je u pitanju etiopatogeneza oboljenja parodontitisa, međutim uticaj u razvoju peri-implantnih oboljenja još uvek se ispituje. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije 90 % svetske populacije zaraženo je nekim od virusa iz porodice Herpes virusa. Do danas je identifikovano osam različitih tipova humanog herpes virusa: herpes simpleks virusi tip 1 i 2 (*HSV1* i *HSV2*), *Epstein-Barr* virus (*EBV*), Citomegalovirus (*CMV*), varicela zoster virus (*VZV*) i humani herpes virusi 6, 7 i 8 (*HHV-6*, *HHV-7* i *HHV-8*) (119). Ove viruse karakteriše njihova sposobnost da se nakon primarne infekcije organizma domaćina šire do ciljanih ćelija gde opstaju i uspostavljaju latentnu formu. Kasnije, usled slabljenja imunog odgovora, stresa ili drugih stimulansa iz okoline, oni se ponovo aktiviraju izazivajući rekurentnu infekciju usled čega se može zaraziti i drugi humani organizam (146). Humani herpes virusi povezani su sa različitim oralnim lezijama i njihovo prisustvo dokazano je u različitim ćelijama kao što su epitelne ćelije i T i B limfociti (116).

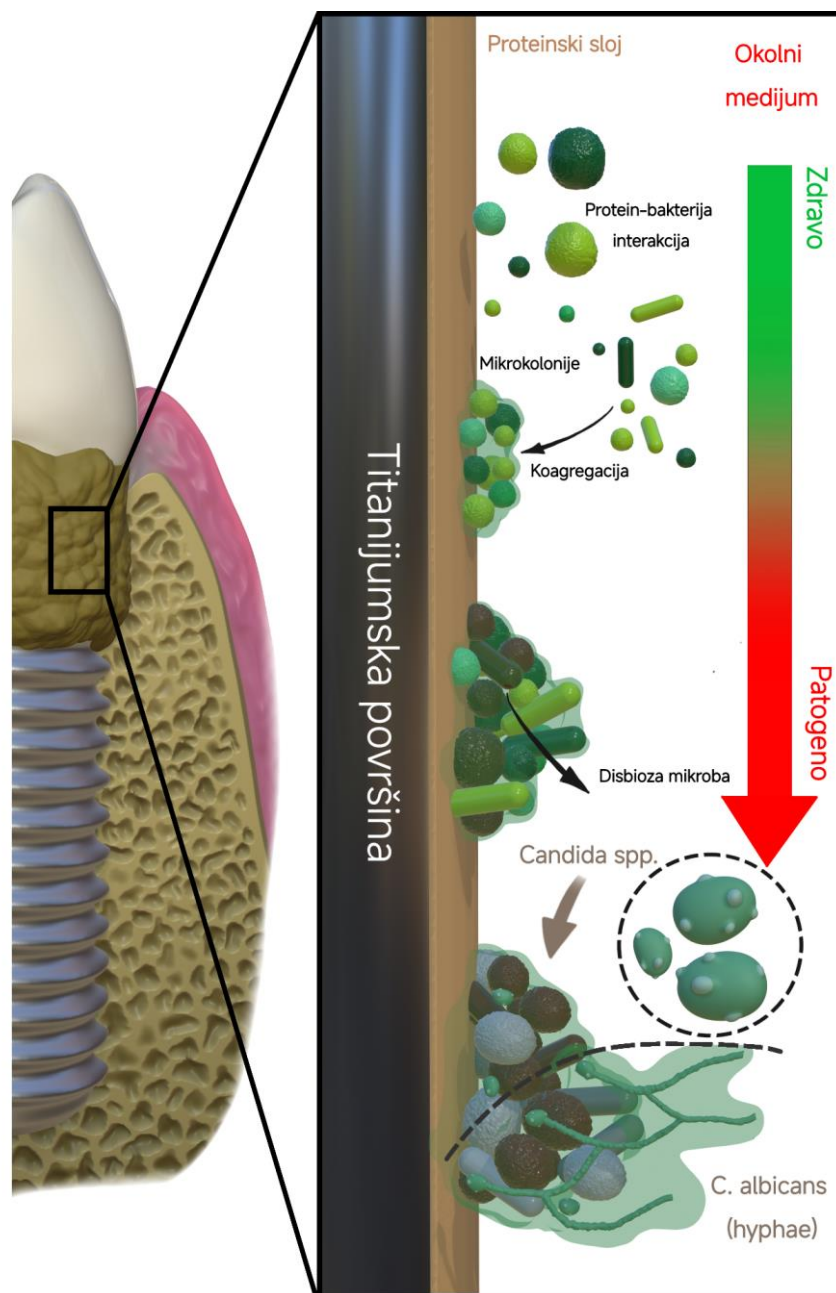
Visoka zastupljenost DNK molekula herpes virusa, kao što su *Epstein-Barr* virus (*EBV*) i *cytomegalovirus* (*CMV*) otkrivena je u uzorcima subgingivalnog dentalnog plaka kod pacijenata obolelih od parodontitisa (147-149). Pokazano je da prisustvo ovih virusa u parodontalnim lezijama menja imuni odgovor domaćina, čime se favorizuje kolonizacija subgingivalnog biofilma parodontopatogenim mikroorganizmima. *EBV* u parodonticijumu napada B-limfocite, dok *CMV* utiče na monocite/makrofage i T-limfocite. Infekcijom ćelija koje učestvuju u specifičnoj i nespecifičnoj odbrani organizma, uslovljena je povećana produkcija proinflamatornih citokina usled čega nastaje destrukcija zahvaćenih tkiva (148, 150, 151). Prisustvo *EBV*-a i *CMV*-a u parodonticijumu povezano je sa povišenim nivoima parodontopatogena *P. gingivalis* i *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (151). Obzirom na ispitanu ulogu herpes virusa u parodontitisu, može se pretpostaviti da zbog sličnog patogenetskog mehanizma ovi virusi imaju impakt i kod peri-implantnih oboljenja. Studija Jankovića i saradnika iz 2011. godine (120) potvrdila je visoku prevalencu *EBV*-a i *CMV*-a u uzorcima subgingivalnog biofilma obolelih od peri-implantitisa, što može ukazati na njihovu ulogu u etiopatogenezi ovog oboljenja. Takođe različite studije pokazale su i da patogeni potencijal ovih virusa zavisi od njihovog genotipa (152, 153). Spram polimorfizma alela u latentnim genskim sekvencama koje kodiraju *EBV* nuklearni antigen 2 (*EBNA2*), razlikujemo dva tipa *EBV*-a (*EBV-1* i *EBV-2*). Humani *CMV* klasifikuje se u četiri genotipa prema glikoproteinu B - *gB* (*gB I*, *II*, *III* i *IV*). Ispitivani u krvi i urinu obolelih, sva četiri genotipa bila su gotovo podjednako raspodeljena, a jedina razlika ogledala se u tome da *gB* tip I, u *in vivo* uslovima ne inficira T limfocite (153). Podaci istraživanja *Wu*-a i saradnika (154) jasno ukazuju da su tipovi *EBV-1* i *CMV gB-II* dominantaniji u subgingivalnim uzorcima biofilma obolelih od parodontitisa. Takođe, koinfekcija *EBV-1* i *CMV gB-II* usko je povezana sa inflamacijom i destrukcijom parodonticijuma. Suprotno tome, *EBV-2* i *CMV gB-I* genotipovi u višim nivoima zastupljeni su kod parodontalno zdravih osoba (154).

Kada su u pitanju uzorci sakupljeni iz subgingivalne regije implantata, utvrđeno je da je nivo genotipa 1 *EBV*-a značajno povišen kod peri-implantitisa u odnosu na peri-implantni mukozitis i zdrave kontrole. Takođe, *CMV gB-II* bio je značajno više prisutan kod pacijenata sa peri-implantitisom, nego kod ispitanika sa zdravim implantatima. Suprotno, prevalenca genotipa 2 *EBV*-a i genotipa *gB-I* *CMV*-a nije pokazala statističku značajnost među uzorcima sa peri-implantnim oboljenjima i onih iz regije zdravih implantata. Takođe, isti istraživači uvideli su da je kod peri-implantnog mukozitisa zastupljeniji bio *EBV-1*, dok je *CMV gB-II* bio dominantniji u lezijama sa peri-implantitisom (155).

#### 1.4.7 *Candida albicans* (*C. albicans*)

*C. albicans*, oportunistički stanovnik usne duplje, predstavlja najčešće izolovanu gljivicu sa površina oralne mukoze kod 75% zdravih osoba (156). Iako u oralnoj sredini najčešće živi kao saprofitni mikroorganizam (kvasnica), u određenim okolnostima može dovesti do teških infekcija usne duplje (157). *C. albicans* poznata je kao gljivica koja uglavnom kolonizuje orofaringealnu i vaginalnu mukozu uzrokujući kandidiozu (158). Međutim, takođe je opisana kao zastupljeni patogen subgingivalne regije kod pacijenata obolelih od parodontitisa. Prevalenca ove gljivice kod obolelih od parodontitisa u direktnoj je korelaciji sa težinom oboljenja, kao i povećanjem dubine sondiranja i gubitkom nivoa pripojnog epitela (123, 159, 160). S pojavom dentalnih implantata, *C. albicans* je istaknuta kao jedna od najčešće zastupljenih gljivičnih vrsta peri-implantne regije (161). Sposobnost *C. albicans* da kolonizuje titanijumske površine implantata pokazana je u radu Schwartz-a i saradnika gde je njena zastupljenost na površini implantata bila češća i veća u odnosu na zube, i kod peri-implantitisa, pa čak i kod zdravih implantata (162). Virulencija *C. albicans* ogleda se u njenoj sposobnosti da formira hife, luči hidrolitičke enzime i aktivira imuni odgovor domaćina, uzrokujući ekspresiju različitih inflamatornih ćelija i citokina koji dovode do destrukcije tkiva (163, 164). Razvoj hifa i ekspresija faktora virulencije zavise od različitih faktora životne sredine kao što su sadržaj hranljivih materija i gasovita atmosfera (165, 166).

Prema novijim saznanjima prilikom transformacije iz kvasnice u hifu, *C. albicans* luči citolitički peptidni toksin - kandidalizin (167, 168). Ovaj toksin oštećuje epitelne ćelije i menja imuni odgovor domaćina (169). Takođe, *C. albicans* oslobađa i metalopeptidazu koja razgrađuje proteine mukozne barijere, kao što su kolagen, fibronektin i laminin (170). Mikrobiološki profil usne duplje razlikuje više od 100 gljivičnih vrsti, od kojih je većinu nemoguće kultivisati (171). Gljivice pored mukoze i zuba mogu adherirati i na druge površine koje nisu organskog porekla a nalaze se u usnoj duplji kao što su ispuni, protetski radovi i dentalni implantati. Istraživanja su pokazala da je *C. albicans* zastupljenija u subgingivalnom biofilmu implantata u odnosu na onaj koji prekriva suprastrukture i u slučaju oboljenja pretpostavlja se da promene bakterijskog profila utiču na virulentnost ove gljivice (124, 172) (Slika br. 6). Gljivica iz roda *C. albicans* igra važnu ulogu u formiranju i stabilizaciji biofilma na titanijumskim površinama implantata, što naknadno doprinosi razvoju i kolonizaciji parodontopatogenih bakterija koje modifikuju imuni odgovor i dovode do destrukcije potpornih tkiva zuba i/ili implantata (49).

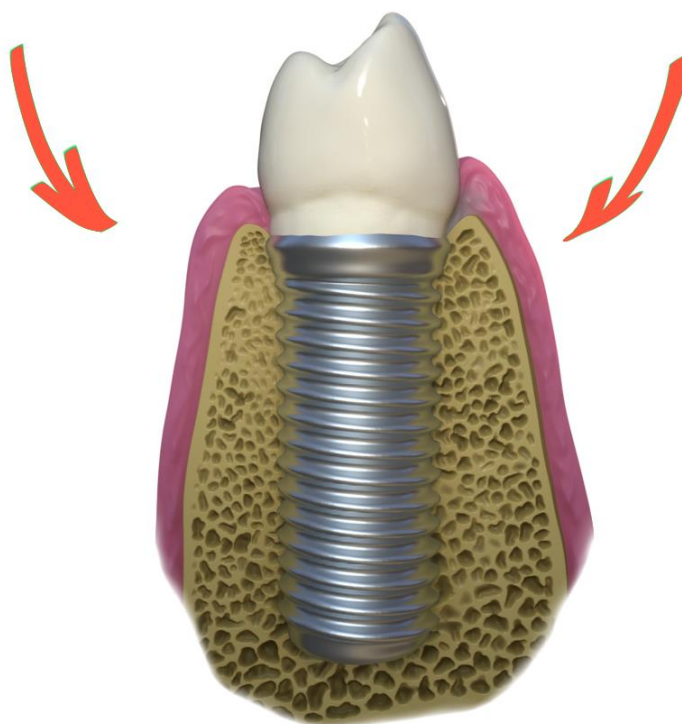
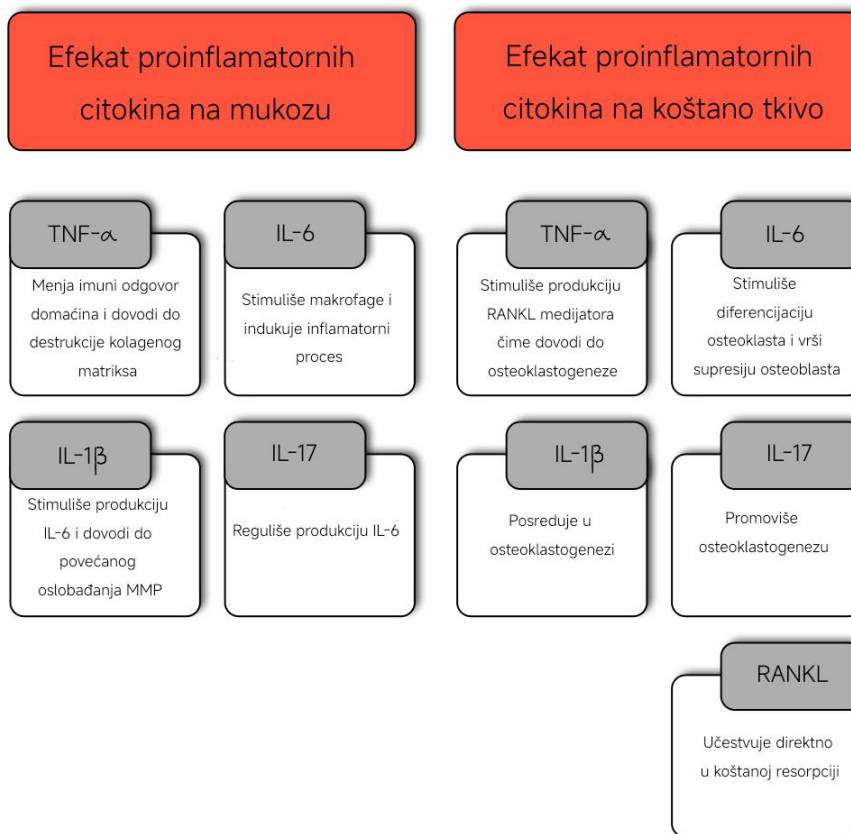


Slika br. 6 – Šematski prikaz promene virulentnosti *Candide albicans* u odnosu na lokalizaciju u peri-implantnom prostoru (dubina sulkusa/džepa)

## 1.5 Patogeneza peri-implantnih oboljenja

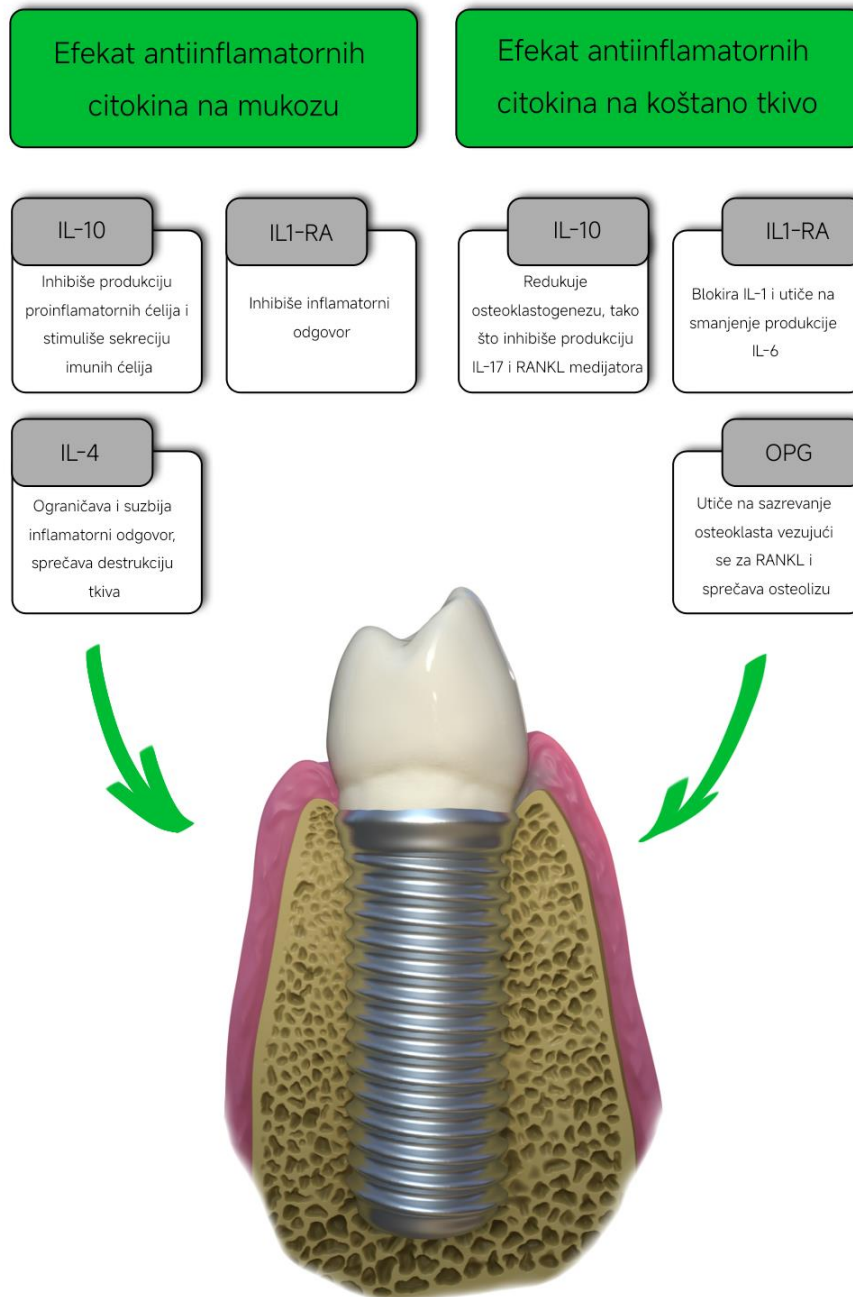
Pored toga što mikroorganizami doprinose nastanku peri-implantnih oboljenja, oni takođe podstiču imuni odovor domaćina usled čega se aktiviraju proinflamatorni medijatori i molekuli različitih signalnih puteva koji učestvuju u remodelaciji potpornog tkiva parodontijuma. Mnogi proinflamatorni citokini su istraživani, dok se neki od njih izdvajaju kao potencijalni “ključni faktori” kod peri-implantantnih oboljenja i imunog odgovora domaćina. Destrukcija peri-implantantnih tkiva dovodi se u vezu sa odgovorom citokina na produkte mikroorganizama biofilma, kao što su lipopolisaharidi i endotoksini. Rezultat ove interakcije karakteriše izraziti lokalni imuni odgovor domaćina u tkivu (173). Jačina imunog odgovora, kao i destruktivna tkiva usled infekcije, zavisiće od ravnoteže između proinflamatornih i antiinflamatornih citokina. Zapravo, imuni odgovor domaćina koncipiran je tako da citokini eksprimovani T pomoćničkim (engl. *T-helper* – Th) limfocitima 1 (proinflamatorni) indukuju ćelijski-posredovane procese, dok citokini produkovani kao odgovor Th 2 limfocitnih ćelija (antiinflamatorni) stimulišu produkciju antitela. Ovako će se usled ekspresije različitih citokina menjati i imuni odgovor domaćina (174, 175). Ovi medijatori inflamacije smatraju se važnim faktorima u regulisanju aktivnosti i diferencijacije osteoblasta i osteoklasta, odgovornih za koštanu remodelaciju (174-176).

Aktiviranjem agresivnih enzima kao što je kolagenaza i drugih faktora inflamacije, proinflamatorni citokini oštećuju tkivo domaćina (Slika br. 7). U ovoj grupi citokina izdvajaju se interleukin 1 beta (*IL-1 $\beta$* ), interleukin 6 (*IL-6*), interleukin 12 (*IL-12*), interleukin 17 (*IL-17*), interferon-gama (*IF $\gamma$* ) i faktor nekroze tumora-alfa (*TNF- $\alpha$* ) (177-180). *IL-1 $\beta$*  zadužen je za ekspresiju prostaglandina E2, koji je povezan sa koštanom resorpcijom kod parodontitisa, što je dokazano povišenim nivoima oba medijatora u gingivalnoj cervikularnoj tečnosti obolelih (181, 182). *IL-6* može samostalno ili udružen sa drugim proinflamatornim citokinima takođe indukovati resorpciju kosti, a utvrđeno je i njegovo sinergističko dejstvo sa *IL-1 $\beta$* . Ispitivani u regiji implantata iz uzoraka peri-implantne cervikularne tečnosti, oba medijatora pokazala su znatno veću prevalencu kod peri-implantitisa u odnosu na zdrave regije (173, 183). Uzorkovanje peri-implantne cervikularne tečnosti česta je i veoma pogodna metoda za analizu ovih molekula. Ova tečnost predstavlja eksudat poreklom iz krvnih sudova gingivalnog sulkusa oko implantata, sličnog je sastava kao gingivalna cervikularna tečnost koja ispunjava sulkus oko zuba. To je zapravo inflamatorni eksudat, koja sadrži različite ćelije odbrane i inflamatorne medijatore, enzime i njihove inhibitore, kao i produkte nastale usled razgradnje tkiva (184, 185). Takođe, *IL-17* se često dovodi u vezu kao medijator inflamacije, kada su parodontalna i peri-implantna oboljenja u pitanju, a uz njega pominju se i prethodno navedeni *IL-6* i *IL-1 $\beta$*  (186, 187). Povećana ekspresija nivoa *IL-17* pronađena je i kod peri-implantnog mukozitisa i kod peri-implantitisa (188). Međutim, povećanje ovog medijatora može takođe dovesti do povećane produkcije drugih citokina sa daleko većim uticajem na procese koštane remodelacije kao što je *TNF- $\alpha$*  (186). *TNF- $\alpha$*  jedan je od glavnih faktora inflamacije koji dovodi do oštećenja tkiva aktiviranjem različitih medijatora (189). U studijama koje su ispitivale oboljenja koja utiču na koštanu morfogenezu, poput reumatoidnog artritisa i parodontitisa, *TNF- $\alpha$*  pokazao je sposobnost da direktno podstakne resorpciju kosti, stimulišući aktivnost osteoklasta (177). Rezultati studije Duarte-a i saradnika sugerišu da ovaj medijator ima važnu ulogu u gubitku koštanog tkiva i kod peri-implantitisa (190). Pored toga, *TNF- $\alpha$*  zajedno sa *IL-17* indukuje ekspresiju receptorskog aktivatora za nuklearni faktor kapa B liganda (*RANKL*), čime indirektno stimulišu gubitak kosti (191, 192).



Slika br. 7 – Uticaj proinflamatornih citokina na meka i čvrsta peri-implantna tkiva

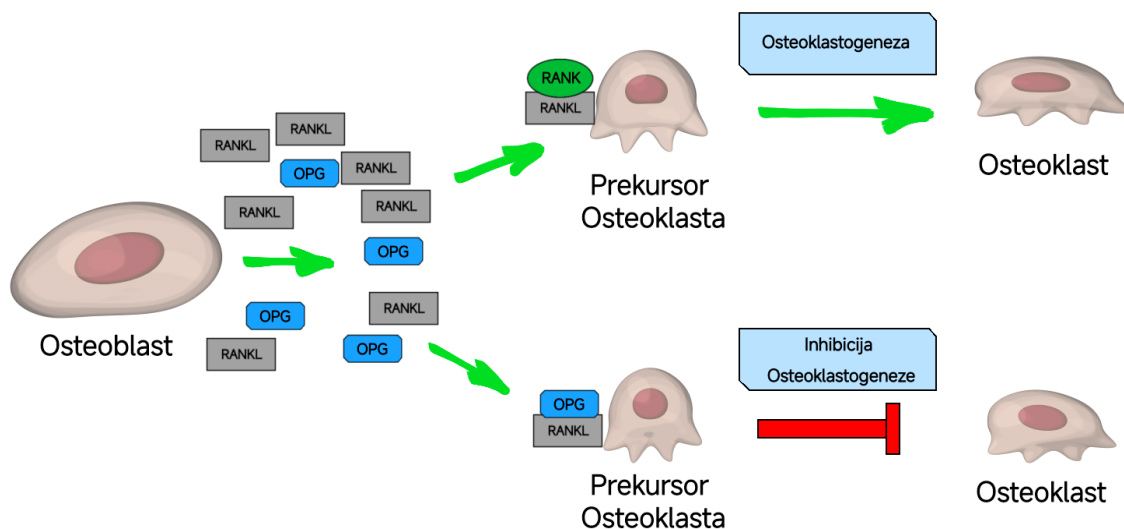
Suprotno proinflammatorym, antiinflammatory medijatori poput interleukina 10, interleukina 4 i receptora antagoniste *IL-1* (*IL-10*, *IL-4* i *IL-1-RA*) imaju ulogu da ograniče i suzbiju inflamatorne procese, čime štite tkiva od dalje destrukcije (180, 193) (Slika br. 8). Produkovani makrofagima, Th 2 i B limfocitima, *IL-10* zadužen je za inhibiciju produkcije proinflammatoryh citokina (194). Studija *Casado* i autora (195) pokazala je da su povećanje *IL-10* i smanjenje nivoa *IL-1 $\beta$*  u peri-implantnoj cervikalnoj tečnosti u direktnoj vezi sa kliničkim i radiografskim parametrima koji karakterišu peri-implantno zdravlje. Imunomodulatorske ćelije i citokini predstavljaju okidače osteoklastne aktivnosti, i kod pacijenata sa progresivnom formom peri-implantitisa mogu dovesti do gubitka implanta (196).



Slika br. 8 - Uticaj antiinflammatoryh citokina na meka i čvrsta peri-implantna tkiva

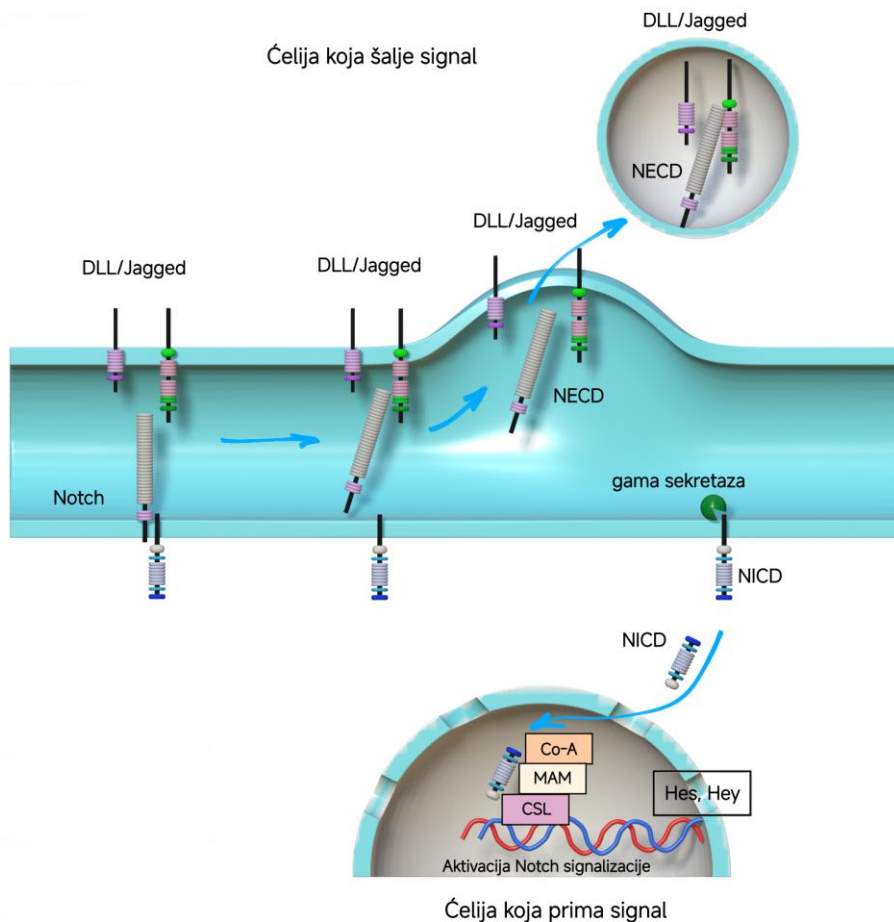


Na koštanu remodelaciju kako kod parodontitisa, tako i kod peri-implantitisa takođe utiče i sprega osteoprotežerin (*engl. Osteoprotegerin - OPG*) – *RANKL* čija je ekspresija pod kontrolom inflamatornih citokina i produkata mikroorganizama (190, 197). *RANKL*, kao jedanaesti član superfamilije faktora nekroze tumora (drugi naziv *TNSF11*) predstavlja ligand. Ekspimiran je od strane osteoblasta, fibroblasta, stromalnih ćelija i T i B limfocita. Dejstvo ostvaruje vezivanjem za receptor aktivatora za nuklearni faktor kapta B (*RANK*), koji se nalazi na površini osteoklasta i na taj način zapravo indukuje njihovu diferencijaciju i aktivaciju (198, 199). S druge strane, *OPG*, pripadnik iste familije kao i *RANKL*, ima suprotan efekat. *OPG* se ponaša kao receptor mamac za *RANKL*. Deluje kao antagonista *RANK-RANKL* interakcije i tako ispoljava inhibitoran efekat na diferencijaciju prekursora osteoklasta u zrele osteoklaste. Prema tome, *OPG* promoviše formiranje kosti inhibirajući osteoklastogenezu (200, 201). *RANKL* i *OPG* regulišu resorpciju alveolarne kosti pozitivnom ili negativnom stimulacijom *RANK* receptora koji se nalazi na površini osteoklasta (202) (Slika br. 9). Ovo ukazuje na povezanost između aktivnosti osteoklasta i ravnoteže *RANKL-OPG* odnosa (180). Ovi medijatori koštane remodelacije primećeni su kod destruktivnih koštanih oboljenja, ali i kod parodontitisa gde su studije pokazale veći relativni odnos u nivoima *RANKL-OPG* sprege na mestima sa parodontitisom u poređenju sa zdravim parodontcijumom (202). Vezivanjem *RANKL*-a za *OPG*, sprečava se njegovo vezivanje za receptore na osteoklastima i dolazi do smanjenja resorpcije kosti i očuvanja koštane mase (203, 204). Takođe, *Costa* i saradnici su u svojoj studiji prikazali značajno veću ekspresiju u *RANKL-OPG* odnosu kod pacijenata sa peri-implantitisom koji imaju istoriju parodontitisa (205). Pored toga i drugi autori istakli su ulogu *RANKL* i *OPG* koštanih markera u prognozi, nastanku i progresiji peri-implantnih oboljenja (206).



Slika br. 9 – Šematski prikaz *RANKL-OPG* sprege

U skeletnom razvoju i procesima remodelovanja kosti, utvrđeno je da je uključen i Notch signalni put (207, 208) (Slika br. 10). Reč je o sistemu ćelijske signalizacije koji igra važnu ulogu u različitim funkcijama ćelija kao što su proliferacija, diferencijacija i apoptoza (209). Životinjske i humane studije utvrdile su da ovaj signalni put podrazumeva četiri Notch receptora i pet Notch liganda. Razlikujemo *Notch 1*, *2*, *3* i *4* receptore i *Jagged 1*, *Jagged 2*, *Delta-like 1 (DLL1)*, *Delta-like 2 (DLL2)* i *Delta-like 4 (DLL4)* ligande (210). To su transmembranski proteini koji posreduju u ćelijskoj komunikaciji. *Notch 1* i *Notch 2* receptori dominantni su kod koštanih ćelija. Vezivanjem Notch liganda jedne ćelije za receptore druge ćelije aktivira se mehanizam koji, prvenstveno preko ekspresije target gena iz *Hey* i *Hes* genskih familija dovodi do ispoljavanja efekata. U pogledu koštanog tkiva, reč je o indirektnom uticaju na remodelaciju kosti. Utvrđeno je učešće ovog signalnog puta u osteogenskoj diferencijaciji i indukciji osteoklastogeneze (191, 211, 212). Ipak, delovanje Notch kaskade zavisi od ćelijskog konteksta, pa i njegovi efekti variraju u različitim fazama sazrevanja ćelije (207, 208). *Notch 1* indukuje *OPG*, što za rezultat ima snižavanje *RANKL-OPG* odnosa i podsticanje osteoblastogeneze, dok deficit *Notch 1* mehanizma povećava ovaj odnos i indirektno potencira osteoklastogenezu. Suprotno *Notch 2* pokazao je ulogu u supresiji osteoblastogeneze, indukujući osteoklastogenezu posredovanu povećanom ekspresijom *RANKL* gena (207, 213).



Slika br. 10 – Nocht signalizacija - vezivanjem *Jagged* ili *DLL* liganda za Notch receptore, aktivira se Notch signalnog put, koji preko ekspresije target gena (*Hes* i *Hey*) ispoljava efekat.

Celokupna kaskada koja povezuje sve prethodno navedene parametre, kao i njihov doprinos u nastanku peri-implantantnih oboljenja, otvara brojna nova istraživačka pitanja. Mikroorganizmi u biofilmu, kao glavni etiološki uzročnici ovih oboljenja, iniciraju i održavaju inflamatorne reakcije koje se prvo razvijaju u mukozni. Međutim, priroda samog imunog odgovora kao reakcije na inflamaciju predstavlja glavnu odrednicu za nastanak oboljenja. Paradoksalno je da ovi odbrambeni procesi, koji su primarno zaštitni, uglavnom oštećuju tkiva domaćina što dovodi do kliničkih manifestacija oboljenja (214). Pokazano je u mnogim studijama da je lokalni imuni odgovor domaćina na peri-implantna oboljenja sa imunološkog i biohemijskog aspekta veoma sličan odgovoru kod parodontalnih oboljenja (215, 216). Ravnoteža između stimulativnih i inhibišućih citokina, zajedno sa regulacijom ekspresije njihovih receptora i signalnih kaskada određuje nivo oštećenja peri-implantnih tkiva. Drugim rečima, ravnoteža između ovih medijatora na lokalnom nivou, koja utiče na aktivnost lokalnih ćelija da ih produkuju, određuje nivo destrukcije tkiva (216). Detekcija citokina koje proizvode i oslobađaju imunofektorske ćelije kao odgovor na stimulaciju bioloških agenasa može predstavljati dobru strategiju za praćenje stanja peri-implantnih tkiva.

## 2. CILJEVI

Radna hipoteza istraživanja:

Izmenjeni nivoi ekspresije molekula Notch signalnog puta, povećana ekspresija proinflammatoryh citokina i narušen odnos između medijatora koštane remodelacije, kao i veća zastupljenost patogenih mikroorganizama prisutni su kod pacijenata sa peri-implantnim oboljenjima.

Na osnovu radne hipoteze definisani su i ciljevi istraživanja:

1. U laboratorijskim uslovima, primenom metode kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. *quantitative real time polymerase chain reaction* – qPCR) utvrditi zastupljenost oralnih mikroorganizama (bakterija *Porphyromonas gingivalis* i *Fusobacterium spp*, Epstein-Barr virusa i gljivice *Candida albicans*) u uzorcima peri-implantantne tečnosti uzorkovane kod pacijenata sa peri-implantitisom, peri-implantnim mukozitisom i oko zdravih implantata.
2. Odrediti relativni nivo genske ekspresije molekula *Notch* signalnog puta - receptora *Notch 1* i *Notch 2*, liganda *Jagged 1*, kao i unutarćelijskih molekula *Hes 1* i *Hey 1* u istim uzorcima.
3. Odrediti relativni nivo genske ekspresije proinflammatoryh citokina - *TNF- $\alpha$* , *IL-17*, *IL-1 $\beta$*  i *IL-6* u istim uzorcima.
4. Odrediti relativni nivo genske ekspresije medijatora koštanog remodelovanja *RANKL* i *OPG*.
5. Utvrditi eventualno postojanje korelacije između nivoa ekspresije ovih molekula i mikroorganizama u navedenim uzorcima.
6. Utvrditi eventualno postojanje korelacije između navedenih mikroorganizama i parodontoloških kliničkih parametara.

### 3. METODOLOGIJA

#### 3.1 Dizajn studije i odabir pacijenata

Na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu sprovedena je prospektivna kontrolisana kliničko-laboratorijska studija koja je obuhvatila 102 ispitanika. Laboratorijski deo istraživanja sproveden je u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Istraživanje je prethodno odobreno od strane Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta u junu 2021. godine, pod rednim brojem 36/15. Studija je sprovedena prema protokolu Edinburške revizije Helsinške deklaracije. Nakon potpisivanja informisanog pristanka, ispitanici odabrani prema kriterijumima za uključivanje i isključivanje iz studije podeljeni su u tri grupe.

Kriterijumi za uključivanje u studiju bili su:

1. Pacijenti oba pola, stariji od 18 godina,
2. Pacijenti Klinike za parodontologiju i oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta u Beogradu voljni da učestvuju u istraživanju i koji su potpisali informisani pristanak, a kod kojih je postavljena dijagnoza peri-implantitisa i peri-implantnog mukozitisa, kao i oni sa zdravim implantatima,
3. Pacijenti koji minimum tri meseca pre uključivanja u studiju nisu primali antibiotsku terapiju bilo koje vrste,
4. Sistemski zdravi pacijenti,
5. Nepušači ili pušači do 10 cigareta/dan (engl. “*light smokers*”).

Kriterijumi za isključenje iz studije bili su:

1. Prisustvo sistemskih oboljenja koja utiču na parodonticijum i koštani matabolizam (nekontrolisani diabetes melitus, karcinom, imunodeficijencija, metabolička koštana oboljenja),
2. Pacijenti koji su na imunosupresivnoj, antiinflamatornoj ili antiresorptivnoj terapiji,
3. Pacijenti kojima je u poslednjih 6 meseci sprovedena parodontalna ili peri-implantna terapija,
4. Pacijenti koji su u poslednjih mesec dana koristili tečnosti za ispiranje usta sa antiplak učinkom,
5. Trudnoća i laktacija.

Prvu test grupu činilo je 40 pacijenata sa peri-implantitisom (PI grupa), drugu test grupu 32 pacijenta sa peri-implantnim mukozitisom (PM grupa), dok je treću, kontrolnu grupu činilo 30 pacijenata, koji poseduju zdrave implantate (I grupa). Svi pacijenti uključeni u studiju imali su ugrađen najmanje jedan implantat, koji je barem godinu dana u funkciji. U slučaju prisustva više od jednog implantata, izabran je onaj sa najtežom kliničkom slikom. Nije bilo ograničenja u pogledu titanijumskih endoosealnih implantata i protetskih rekonstrukcija, međutim cirkonijumski, zigomatični i pterigoidni implantati nisu uzimani u obzir.

Dijagnoza je postavljena na osnovu Klasifikacije parodontalnih i peri-implantnih oboljenja i stanja ustanovljene na svetskoj radionici 2017. godine:

- PI grupa:
  - Prisustvo krvarenja i/ili supuracije prilikom sondiranja,
  - Dubina sondiranja  $\geq 6$  mm, nivo kosti  $\geq 3$  mm apikalnije u odnosu na najkronarniju poziciju vratnog dela implantata (63).
- PM grupa:
  - Prisustvo krvarenja i/ili supuracije prilikom sondiranja, sa ili bez povećanja dubine sondiranja u odnosu na prethodnu posetu,
  - Bez gubitka kosti na radiogramu u odnosu na vrat implantata (63).
- I grupa:
  - Odsustvo kliničkih znakova inflamacije,
  - Odsustvo krvarenja i/ili supuracije prilikom sondiranja,
  - Bez povećanja dubine sondiranja u odnosu na poslednju posetu,
  - Bez gubitka kosti (63).

### 3.2 Prikupljanje kliničkih podataka i uzorkovanje peri-implantne sulkusne tečnosti

Prilikom kliničkog pregleda u evidencioni karton svakog ispitanika beleženi su parodontološki klinički parametri: dubina sondiranja (DS), nivo ivice gingive (NIG), nivo pripojnog epitela (NPE), krvarenje na provokaciju (KNP), plak indeks (PI) i supuracija (SUP) (Slika br. 11). Parametri su mereni parodontalnom sondom (*UNC-15 Hu-Friedy, Chicago, IL*) u šest tačaka oko svih zuba i implantata (meziobukalno, mediobukalno, distobukalno, meziolingvalno, mediolingvalno i distolingvalno). Parametri izmereni oko implantata razlikovali su se po sufiksu u vidu malog latiničnog slova i (DSi, NIGi, NPEi, KNPi, PI i SUPi). Nakon pregleda i postavljanja odgovarajuće dijagnoze po gore navedenim kriterijumima, uzorkovana je peri-implantantna tečnost u regiji odabranog implantata svakog pacijenta. Sakupljanje uzorka vršeno je pomoću papirnih poena (*PerioFlow, Amityville, NY*). Nakon uspostavljanja (relativno) suvog radnog polja primenom vaterolni i mlaza vazduha, u peri-implantantni džep ili sulkus aplikovana su po tri papirna poena (broj 30 – označeni plavom bojom) na period od 30 sekundi. Postupak se ponavljao još jednom u istoj regiji u cilju dobijanja duplikata uzoraka (187, 217, 218). Papirni poeni su zatim spremeni u sterilne ependorf tubice ispunjene rastvorom za stabilizaciju RNK (*RNAlater Stabilization Solution, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA*) (Slike br. 12 i 13). Tubice su preko noći skladištene na temperature od 2 °C do 8 °C, nakon čega je rastvor ekstrahovan i uzorci su dalje čuvani na -80 °C do vršenja planiranih laboratorijskih analiza.

### Gornja vilica

DS																				
NIG																				
NPE																				
KNP																				
PI																				
SUP																				
IMPLANTAT																				

DS \_\_\_\_\_  
 NIG \_\_\_\_\_  
 NPE \_\_\_\_\_  
 KNP \_\_\_\_\_  
 PI \_\_\_\_\_  
 SUP \_\_\_\_\_

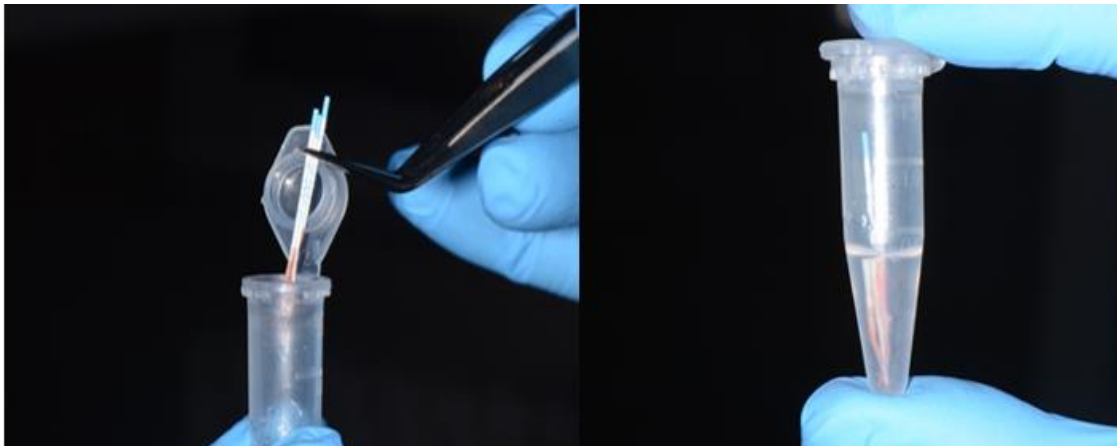
### Donja vilica

DS																				
NIG																				
NPE																				
KNP																				
PI																				
SUP																				
IMPLANTAT																				

Slika br. 11 - Primer evidencionog kartona u kome su beleženi ispitivani klinički parametri



Slika br. 12 - Postupak uzimanja uzorka peri-implantne cervikalne tečnosti pomoću papirnih poena



Slika br. 13 - Spremanje sakupljenog uzorka u ependorf tubice ispunjene rastvorom za stabilizaciju RNK

### 3.3 Sprovođenje kauzalne faze terapije

Nakon dijagnostičkog postupka i uzorkovanja, kod svih pacijenata sprovedena je nehirurška (kauzalna) faza terapije parodontitisa i peri-implantnih oboljenja po načelima *Full-mouth disinfection* protokola (219). *Full-mouth disinfection* protokol podrazumeva uklanjanje svih čvrstih i mekih supragingivalnih i subgingivalnih naslaga u jednoj ili 2 posete u okviru 24h ultrazvučnim aparatom i ručno parodontalnim kiretama. Nakon instrumentacije najpre se jezik četkao 1% gelom hlor-heksidina u trajanju od 60 sekundi, nakon čega su pacijenti ispirali usta i grlo sa 0,2% rastvorom hlor-heksidina takođe 1 minut. Dodatno, pacijentima je propisivan isti rastvor za kućnu upotrebu 2 puta dnevno u trajanju od 2 nedelje. U odnosu na kliničku sliku i dijagnozu po potrebi je propisivana i odgovarajuća antibiotska terapija. Svaki pacijent dobio je instrukcije o pravilnom održavanju oralne higijene.



### 3.4 Postupak izolovanja RNK i DNK molekula

Papirni poeni su potapani u TRIzol™ reagens (*Invitrogen, Carlsbad, CA*) uz dodatak hloroforma, nakon čega su mučkani 15 sekundi, a zatim centrifugirani kako bi se izvršila separacija smeše u tri faze. Donja, fenol-hloroform faza sa srednjom interfazom korišćena je za izolovanje DNK molekula odakle je primenom metode kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (*engl. quantitative real time polymerase chain reaction – qPCR*) analizirano prisustvo odabranih mikroorganizama. Iz gornje bezbojne vodene faze ekstrahovana je RNK. Ekstrakcija DNK iz organske faze vršena je pomoću rastvora koji se sastoji od guanidin tijocijanata, natrijum citrata i tris pufera. Po dodatku rastvora, kako bi se DNK dovela u vodenu fazu tubice su mučkane i centrifugirane. Naredni korak podrazumevao je najpre precipitaciju DNK molekula izopropanolom, nakon čega je sledilo ispiranje 70% etanolom. Postupak se završavao sušenjem DNK na vazduhu i rastvaranjem pomoću TE (tris-EDTA) pufera, nakon čega su tubice skladištene na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Iz uzorka RNK je uz pomoć enzima reverzne transkriptaze (primenom komercijalno dostupnih kitova) dobijena komplementarna DNK, koja je korišćena kao “matrica” za qPCR.

### 3.5 Analiza mikroorganizama primenom qPCR metode

Kvantitativna qPCR analiza bakterija *Porphyromonas gingivalis* i *Fusobacterium spp*, Epstein-Barr virusa i gljivice *Candida albicans* vršena je korišćenjem SsoAdvanced™ univerzalnog SYBR® green supermiksa (*Bio-Rad Laboratories, CA, USA*) i specifično dizajniranih oligonukleotidnih prajmera karakterističnih za svaku od odabranih vrsta (Tabela 5). Krive topljenja generisane su u svakom qPCR testu kako bi se potvrdila specifičnost amplifikacije i svi uzorci su rađeni u duplikatu. Uporedo sa umnožavanjem delova genoma mikroorganizama, u zasebnim tubicama umnožavao se region interne kontrole, humanog gena za prostaglandin transporter (*hPGT*). Relativni nivoi mikroorganizama iskazani su kao tzv. RQ vrednost (*engl. Relative quantity*) koja se računa kao  $2^{(-\Delta\text{Ct})}$  (220, 221).

Tabela 5 - Prajmeri korišćeni za qPCR analizu mikroorganizama

Ime prajmera	Sekvenca prajmera (5' – 3')
<b>PG F</b>	ACCTTACCCGGGATTGAAATG
<b>PG R</b>	CAACCATGCAGCACCTACATAGAA
<b>Fspp F</b>	TGTCATTCTTCCAAAAATATCA
<b>Fspp R</b>	AGATCAAGAAGGACAAGTTGCTGAA
<b>EBV F</b>	AAACCTCAGGACCTACGCTGC
<b>EBV R</b>	AGACACCGTCCTCACCAC
<b>CA F</b>	GGATCGCTTTGACAATGG
<b>CA R</b>	GCGGGTAGTCCTACCTGATTT
<b>hPGT F</b>	ATCCCCAAAGCACCTGGTTT
<b>hPGT R</b>	AGAGGCCAAGATAGTCCTGGTAA

PG - *Porphyromonas gingivalis*; Fspp – *Fusobacterium spp*; EBV - *Epstein-Barr virus*; CA - *Candida albicans*; hPGT - human prostaglandin transporter; F- engl. *Forward*; R – engl. *Reversed*

### 3.5 Analiza relativne ekspresije odabranih gena qPCR metodom

Ekspresija proinflammatoryh citokina *TNF- $\alpha$* , *IL-17*, *IL-1beta* i *IL-6*, receptora *Notch 1* i *Notch 2*, liganda *Jagged 1* i unutarćelijskih molekula *Hes 1* i *Hey 1*, kao i *RANKL* i *OPG* analizirana je primenom metoda reverzne transkripcije i qPCR metodom. Za qPCR analizu kao i kod kvantifikacije mikroorganizama korišćena je SYBR green boja uz odgovarajuće prajmere (Tabela 6). U svakoj qPCR reakciji, osim umnožavanja segmenata ispitivanih gena, umnožavan je i deo gena za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* - *GAPDH*), pa su nivoi ekspresije iskazani kao relativne vrednosti u odnosu na ekspresiju *GAPDH*.

Tabela 6 - Prajmeri korišćeni za qPCR analizu odabranih gena

Gen	Sekvenca prajmera (5' – 3')
Notch 1 F	AGCCTCAACATCCCCTACAA
Notch 1 R	CCACGAAGAACAGAAGCACA
Notch 2 F	AAAAATGGGGCCAACCGAGAC
Notch 2 R	TTCATCCAGAAGGCGCACAA
Jagged 1 F	CGGGATTTGGTTAATGGTTATC
Jagged 1 R	ATAGTCACTGGCACGGTTGTAGCAC
Hes 1 F	TCAACACGACACCGGATAAA
Hes 1 R	CCGCGAGCTATCTTTCTTCA
Hey 1 F	CGAGGTGGAGAAGGAGAGTG
Hey 1 R	CTGGGTACCAGCCTTCTCAG
TNF- $\alpha$ F	CCTGCCCAATCCCTTTATT
TNF- $\alpha$ R	CCCTAAGCCCCAATTCTCT
IL-17 F	TGAAGGCATGTGAAATCGAGA
IL-17 R	CAATGACCTGGAATTACCCAA
IL-1 $\beta$ F	ACAACAGGAAAGTCCAGGCTA
IL-1 $\beta$ R	TGGCAGAAAGGGAACAGAA
IL-6 F	TACATTTGCCGAAGAGCC
IL-6 R	GTGAGGAACAAGCCAGAGC
RANKL F	CAGAAGATGGCACTCACTGCA
RANKL R	CACCATCGCTTTCTCTGCTCT
OPG F	GGAACCCAGAGCGAAATACA
OPG R	CCTGAAGAATGCCTCCTCACA
GADPH F	TCATGACCACAGTCCATGCCATCA
GADPH R	CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT

GADPH – gliceraldehyd-3-fosfat dehidrogenazu (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*); IL- interleukin; OPG – Osteoprotežerin (engl. *osteoprotegerin*); RANKL – (engl. *receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*); TNF – faktor nekroze tumora (engl. tumor necrosis factor); F- engl. *Forward*; R – engl. *Reversed*.

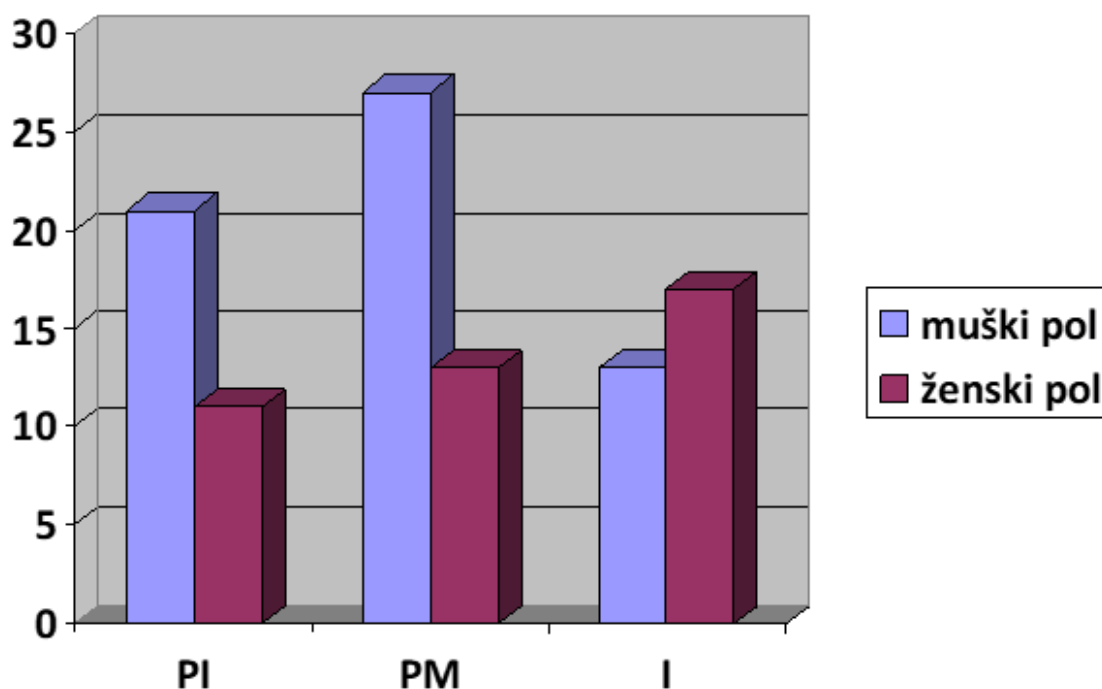
### 3.6 Statistička obrada podataka

Statistička analiza sprovedena je primenom SPSS statističkog paketa (engl. *Statistical Package for Social Science, version 22.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA*). Deskriptivna statistika prikazana je kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. Za kategoričke podatke korišćen je Hi-kvadrat test ( $\chi$ ). Normalnost raspodele ispitivana je Kolmogorov - Smirnov testom za ispitivanje normalnosti. Sve tri grupe razlikovale su se po broju pacijenata i nisu se ponašale po tipu normalne raspodele, stoga su dalje korišćeni neparametarski testovi za statističku analizu. Za komparaciju sve tri grupe korišćen je Kruskal–Wallis H-test, dok je poređenje između svake dve grupe pojedinačno vršeno Mann–Whitney U-testom. Spirmanovim koeficijentom korelacije ( $\rho$ ) ispitivana je međusobna korelacija između relativnih nivoa istraživanih mikroorganizama, kao i njihova korelacija sa relativnom genskom ekspesijom istraživanih gena. Univarijantnim i multivarijantnim modelom linearne regresije utvrđivani su prediktori promena vrednosti kliničkih parametara. Statistički značajnim smatrane su  $p$  vrednosti koje su iznosile manje od 0,05.

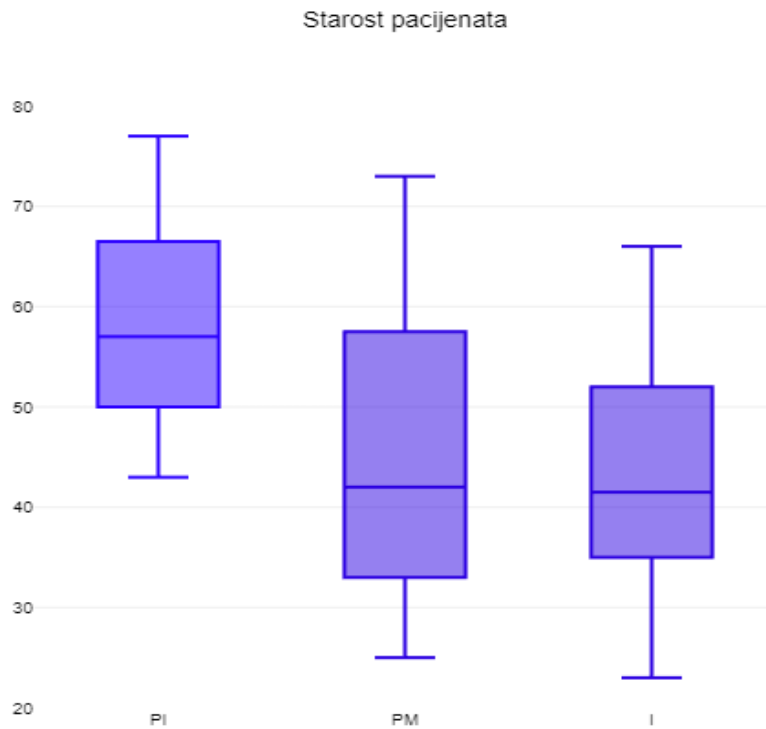
## 4. REZULTATI

### 4.1 Demografski podaci

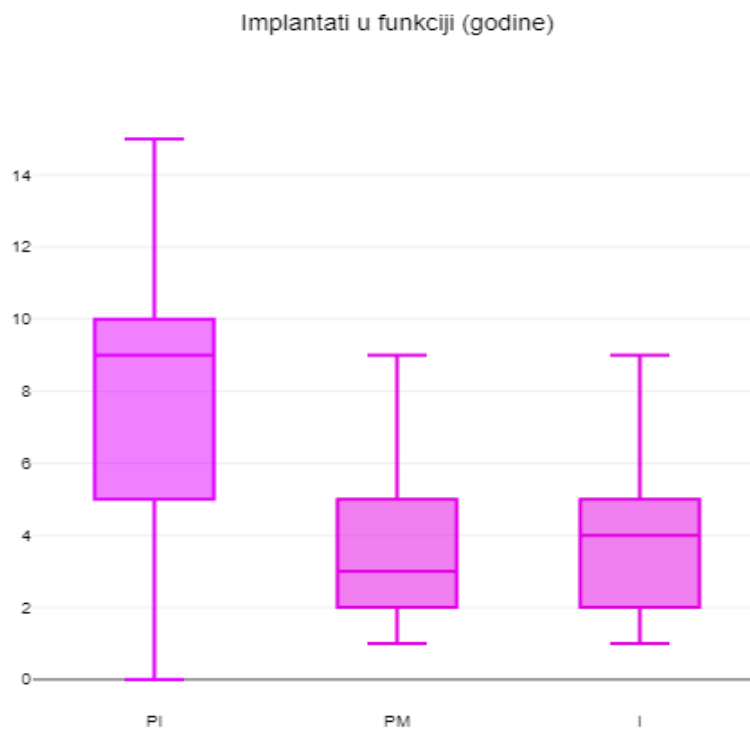
U studiji je učestvovalo ukupno 102 pacijenta, 61 muškog i 41 ženskog pola (Slika br. 14). U pogledu distribucije po polovima, nije utvrđena statistički značajna razlika između PI, PM i I grupe (Pirsonov Hi-kvadrat test,  $p = 0,090$ ). Kada su godine u pitanju (Slika br. 15), u PI grupi srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija bile su statistički značajno veće u poređenju sa PM i I grupama (Kruskal-Wallis H-test,  $p = 0,000$ ). Takođe, implantati iz PI grupe bili su u funkciji značajno duže u odnosu na preostale implantate (Kruskal-Wallis H-test,  $p = 0,000$ ) (Slika br. 16). Svi navedeni podaci prikazani su u Tabeli 7.



Slika br. 14 – Raspodela polova među grupama; PI – peri-implantitis; PM – peri-implantni mukozitis; I – zdravi implantati.



Slika br. 15 – Srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija starosti pacijenata u godinama; PI – peri-implantitis; PM – peri-implantni mukozitis; I – zdravi implantati.



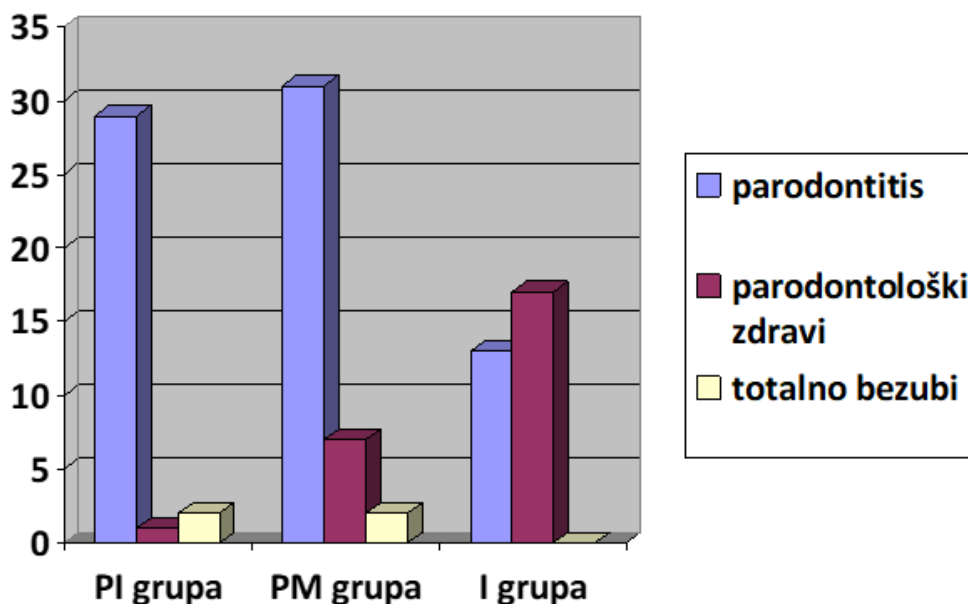
Slika br. 16 – Srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija vremena implantata u funkciji; PI – peri-implantitis; PM – peri-implantni mukozitis; I – zdravi implantati.

Tabela 7 – Prikaz srednje vrednosti ± standardna devijacije i statističke razlike u odnosu na pol, starost pacijenata i funkciju implantata u vremenu kod PI, PM i I grupe

	PI ( N=32)	PM ( N=40)	I ( N=30)	p vrednost
Pol (m/ž)	21/11	27/13	13/17	0,090 <sup>a</sup>
Godine (SV ± SD)	58,47 ± 10,03	45,45 ± 14,627	43,53 ± 11,178	0,000 <sup>b</sup>
Implanti u funkciji (godine; SV ± SD)	7,875 ± 3,6345	3,775 ± 2,380	4,117 ± 2,2271	0,000 <sup>b</sup>

PI – Peri-implantitis; PM – peri-implantni mukozitis; I - zdravi implantati; SV ± SD – srednja vrednost ± standardna devijacija; N (engl. *number*) – broj ispitanika; a – Pearsonov Hi-kvadrat test ( $\chi^2$ ), značajno za  $p < 0,05$ ; b - *Kruskal-Wallis* H-test, značajno za  $p < 0,05$ .

U celokupnom uzorku pacijenata, bilo je 25 parodontološki zdravih, 77 sa parodontitisom i 4 totalno bezuba pacijenta. Raspodela po grupama bila je nešto drugačija, PI grupu činilo je 29 pacijenata sa parodontitisom, 2 potpuno bezuba i samo jedan pacijent sa zdravim parodontcijumom. U PM grupi 31 pacijent imao je dijagnozu parodontitisa, 7 nije i 2 su imala samo implantate prisutne u ustima. U grupi sa zdravim implantatima svi pacijenti imali su zube, od čega je trinaestoro bilo parodontološki kompromitovano, a 17 potpuno zdravih. Svi bezubi pacijenti bili su implantatno-protetski rehabilitovani u potpunosti (Slika br. 17).



Slika br. 17 - Raspodela pacijenata po grupama u odnosu na parodontalno zdravlje (parodontitis, parodontološki zdravi i totalno bezubi pacijenti implantatno-protetski rehabilitovani); PI – peri-implantitis; PM – peri-implantni mukozitis; I – zdravi implantati.

## 4.2 Klinički parametri

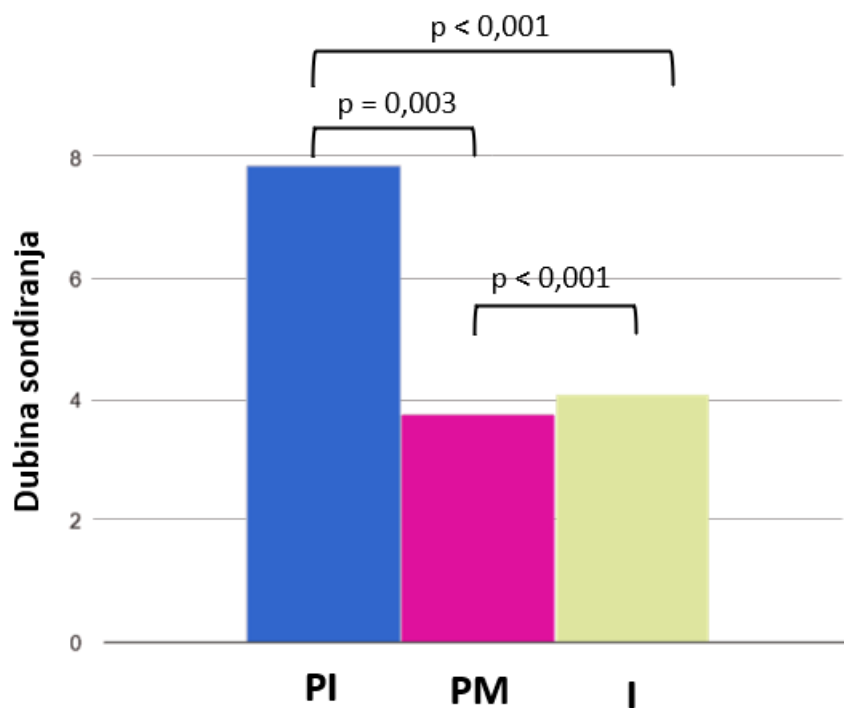
Klinički parametri na nivou usne duplje i oko implantata analizirani su deskriptivnom statistikom. Razlika između kliničkih parametara na nivou čitavih usta pokazala je statističku značajnost između sve tri grupe (*Kruskal-Wallis* test,  $p < 0,001$ ; Tabela 8). Poređenjem svake 2 grupe *Mann-Whitney* U-testom (Tabela 8), dobijene su značajne razlike u vrednostima dubine sondiranja između PI i I grupe ( $p < 0,001$ ), zatim između PM i I grupe ( $p < 0,001$ ), kao i između PI i PM grupe ( $p = 0,003$ ), što se može uočiti na slici br. 18. Isti obrazac ponavljao se i poređenjem dobijenih vrednosti NPE, KNP i PI između grupa (Slike br. 19, 20 i 21).

Tabela 8 - Srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija kliničkih parametara na nivou čitave usne duplje kod peri-implantitisa (PI), peri-implantnog mukozitisa (PM) i pacijenata sa zdravim implantatima (I).

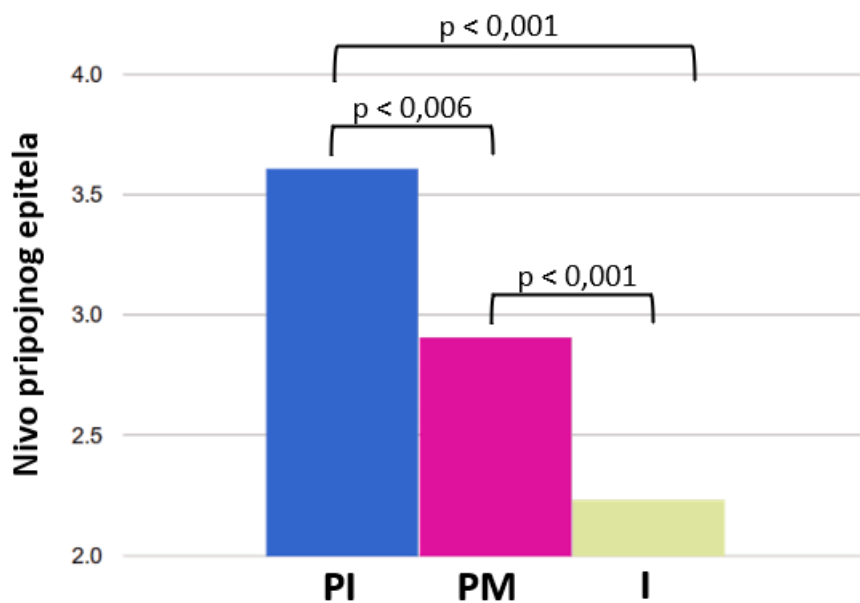
Klinički parametri (SV $\pm$ SD)	PI (N=32)	PM (N=40)	I (N=30)	p vrednost *	p vrednost **
DS	3,41 $\pm$ 0,67	2,95 $\pm$ 0,62	2,32 $\pm$ 0,39	<0,001	PI vs I p<0,001 PM vs I p<0,001 PI vs PM p=0,003
NPE	3,61 $\pm$ 1,09	2,91 $\pm$ 0,90	2,23 $\pm$ 0,65	<0,001	PI vs I p<0,001 PM vs I p<0,001 PI vs PM p<0,006
KNP	0,64 $\pm$ 0,21	0,47 $\pm$ 0,20	0,10 $\pm$ 0,09	<0,001	PI vs I p<0,001 PM vs I p<0,001 PI vs PM p=0,001
PI	0,63 $\pm$ 0,25	0,51 $\pm$ 0,21	0,17 $\pm$ 0,14	<0,001	PI vs I p<0,001 PM vs I p<0,001 PI vs PM p=0,001

SV  $\pm$  SD – srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija; DS – dubina sondiranja; NPE – nivo pripojnog epitela; KNP – krvarenje na provokaciju; PI – plak indeks; N (engl. *number*) – broj ispitanika; \* p vrednost - *Kruskal-Wallis* test, značajno za  $p < 0,05$ ; \*\* p vrednost - *Mann-Whitney* test, značajno za  $p < 0,05$ .

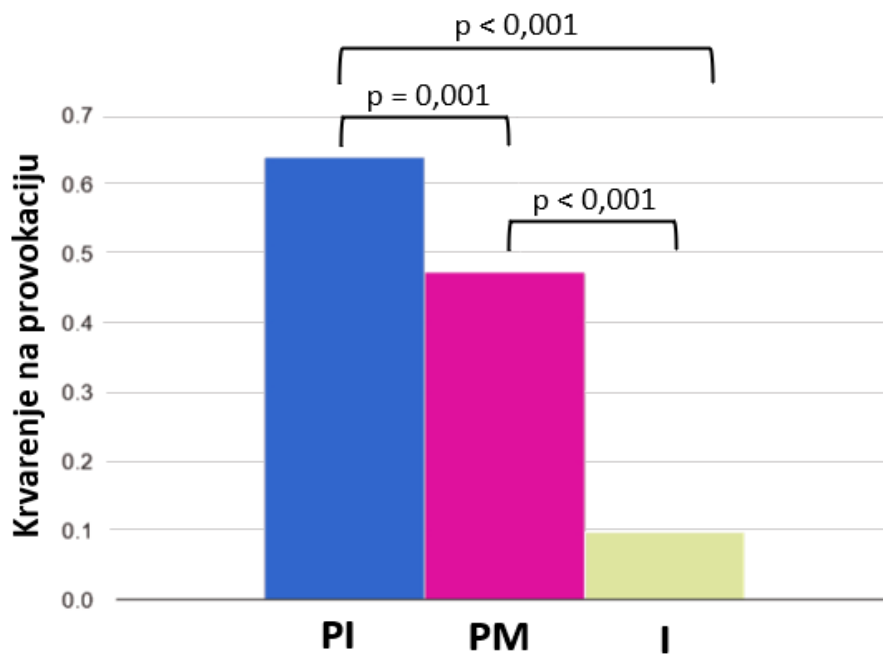




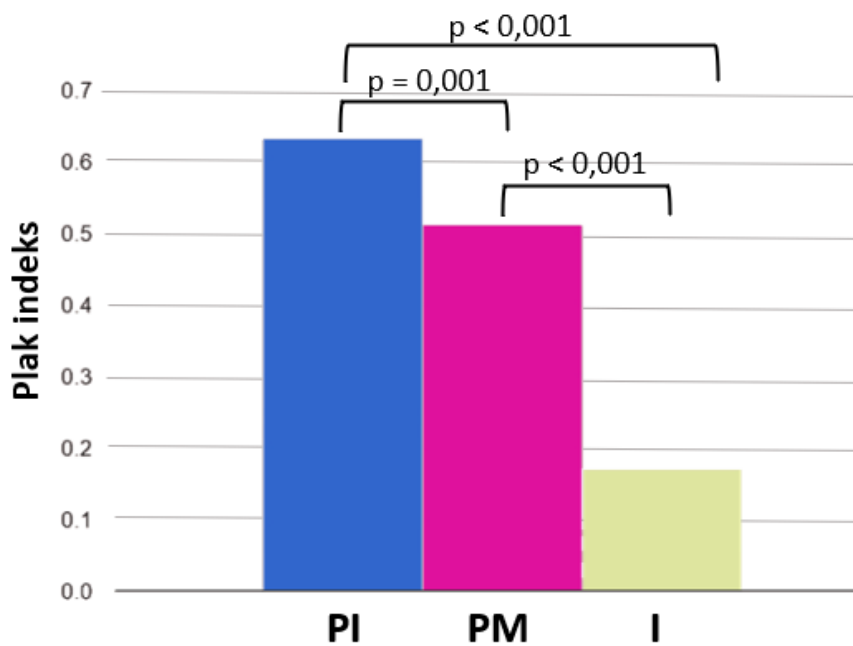
Slika br. 18 – Dubina sondiranja na nivou čitave usne duplje; poređenje pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



Slika br. 19 – Nivo pripojnog epitela na nivou čitave usne duplje; poređenje pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



Slika br. 20 – Krvarenje na provokaciju na nivou čitave usne duplje; poređenje pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



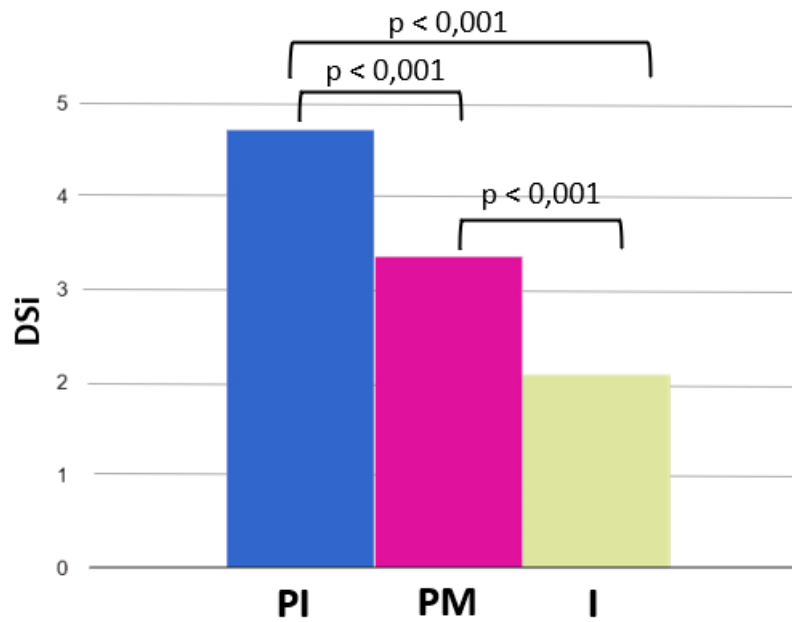
Slika br. 21 – Plak indeks na nivou čitave usne duplje; poređenje pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).

Rezultati prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija dobijeni na nivou implantata nalaze se u Tabeli 9. Klinički parametri na nivou implantata takođe su pokazali statistički značajnu razliku među sve tri grupe (*Kruskal-Wallis* test,  $p < 0,001$ ), kao i poređenjem svake dve grupe zasebno (*Mann-Whitney* U-testom), što je prezentovano u Tabeli 9 i na slikama br. 22, 23, 24, 25 i 26. Jedino se između PI i PM grupe na nivou implantata nisu statistički značajno razlikovali podaci dobijeni za KNPi ( $p = 0,669$ ) i PIi ( $p = 0,121$ ) (Slike br. 24 i 25).

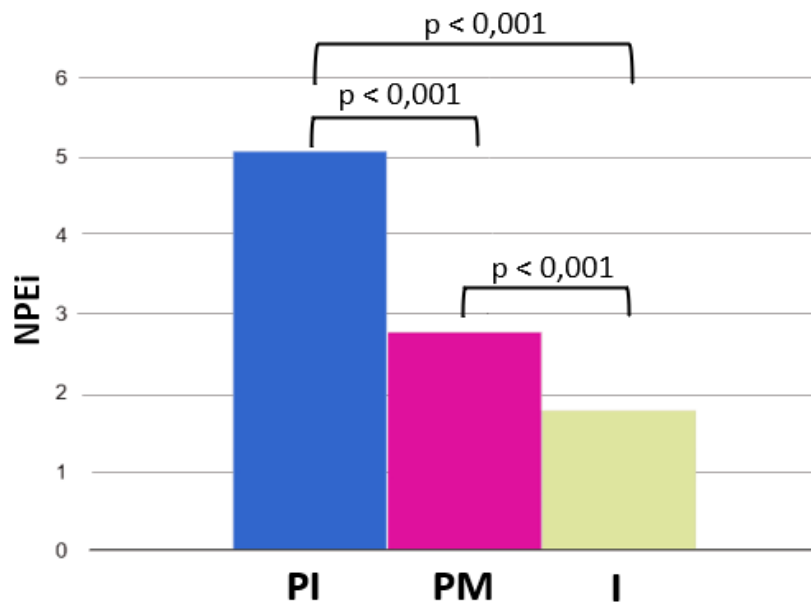
Tabela 9 - Srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija kliničkih parametara na nivou implantata kod peri-implantitisa (PI), peri-implantnog mukozitisa (PM) i pacijenata sa zdravim implantatima (I).

Klinički parametri (SV $\pm$ SD)	PI (N=32)	PM (N=40)	I (N=30)	p *	p **
DSi	4,71 $\pm$ 0,91	3,34 $\pm$ 0,45	2,08 $\pm$ 0,42	<0,001	PI vs I p<0,001 PM vs I p<0,001 PI vs PM p<0,001
NPEi	5,06 $\pm$ 1,36	2,76 $\pm$ 0,71	1,77 $\pm$ 0,50	<0,001	PI vs I p<0,001 PM vs I p<0,001 PI vs PM p<0,001
KNPi	0,83 $\pm$ 0,26	0,88 $\pm$ 0,16	0,22 $\pm$ 0,07	<0,001	PI vs I p<0,001 PM vs I p<0,001 PI vs PM p=0,669
PIi	0,69 $\pm$ 0,32	0,60 $\pm$ 0,30	0,05 $\pm$ 0,09	<0,001	PI vs I p<0,001 PM vs I p<0,001 PI vs PM p=0,121
SUPi	0,22 $\pm$ 0,29	0,93 $\pm$ 0,13	0	<0,005	PI vs I p=0,002 PM vs I p=0,002 PI vs PM p=0,047

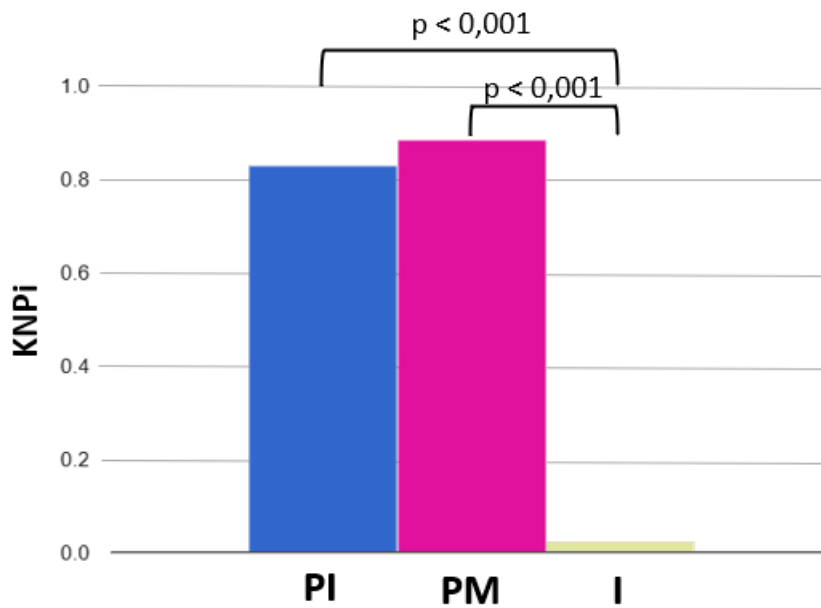
SV  $\pm$  SD – srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija; DSi – peri-implantna dubina sondiranja; NPEi – peri-implantni nivo pripojnog epitela; KNPi – peri-implantno krvarenje na provokaciju; PIi – peri-implantni plak indeks; SUPi - peri-implantna supuracija; N (engl. *number*) – broj ispitanika; \* p vrednost - *Kruskal-Wallis* test, značajno za  $p < 0,05$ ; \*\* p vrednost - *Mann-Whitney* test, značajno za  $p < 0,05$ .



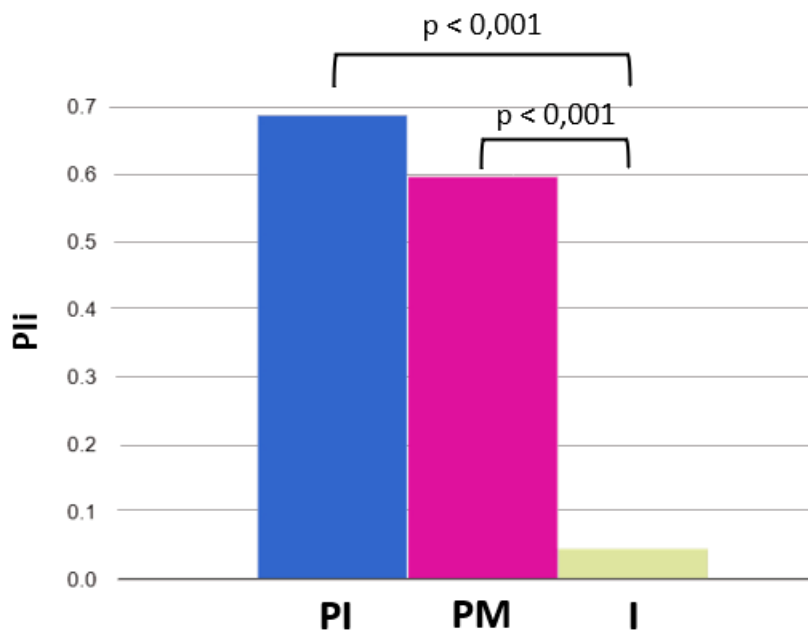
Slika br. 22 – Peri-implantna dubina sondiranja (DSi); poređenje pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



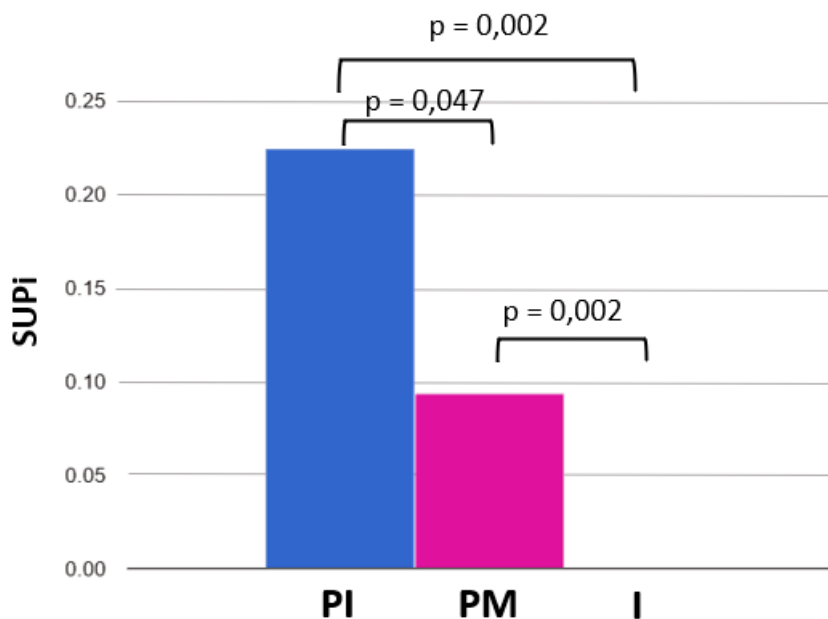
Slika br. 23 – Peri-implantni nivo pripojnog epitela (NPEi); poređenje pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



Slika br. 24 – Peri-implantno krvarenje na provokaciju; poređenje pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



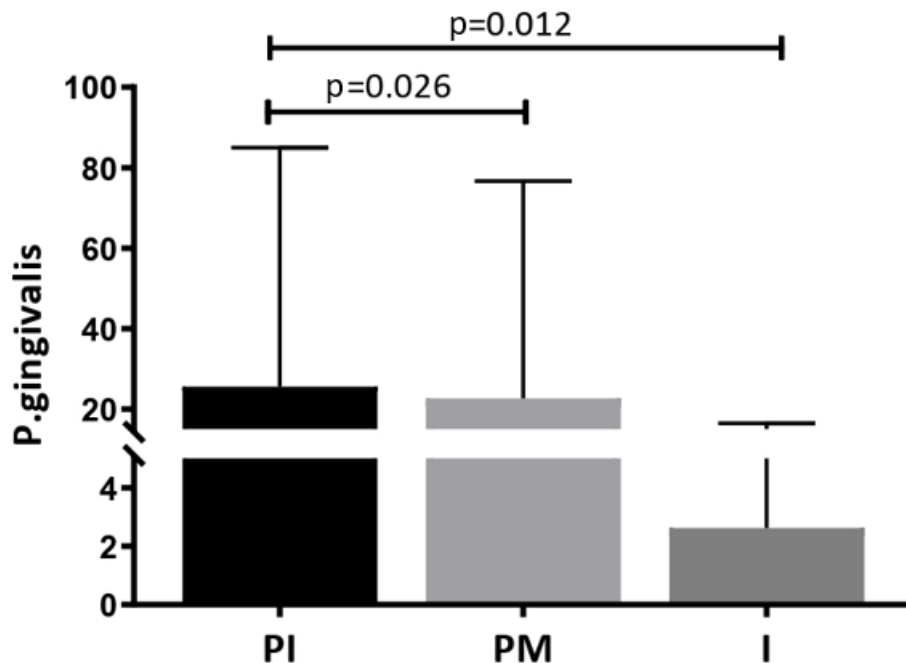
Slika br. 25 – Plak indeks u regiji implantata; poređenje pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



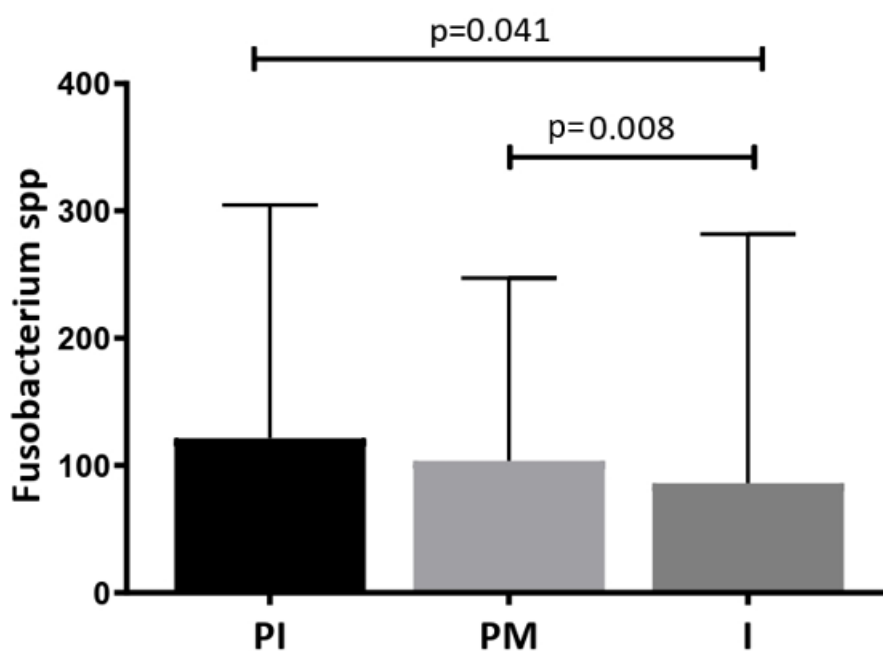
Slika br. 26 – Supuracija u regiji implantata; poređenje pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).

#### 4.3 Prevalenca patogenih mikroorganizama kod peri-implantitisa, peri-implantnog mukozitisa i pacijenata sa zdravim implantatima

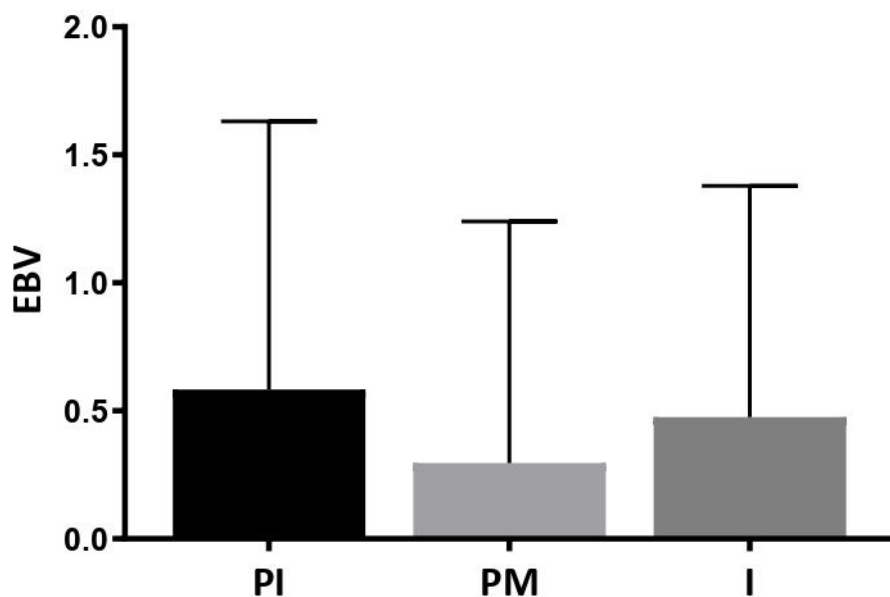
Statistički značajna razlika među grupama detektovana je za *P. gingivalis* ( $p=0,022$ ) i *Fusobacterium spp.* ( $p=0,023$ ). Poređenjem svake dve grupe zasebno, signifikantne vrednosti u prevalenci *P. gingivalis* bakterije dobijene su između PI i I grupe ( $p=0,012$ ), kao i između PI i PM grupe ( $p=0,026$ ) (Slika br. 27), dok je  $p$  vrednost bila veća od 0,05 između PM i I grupe. Takođe *Fusobacterium spp.* je značajno zastupljeniji bio kod obolelih implantata (PI i PM), u odnosu na zdrave kontrole (I), sa vrednostima  $p=0,041$  i  $p=0,008$  respektivno (Slika br. 28). *EBV* i *C. albicans* nisu bili značajno detektovani u uzorcima pacijenata (Slike br. 29 i 30). Srednje vrednosti  $\pm$  standardna devijacija i medijana, kao i statistički rezultati prikazani su u tabeli 10.



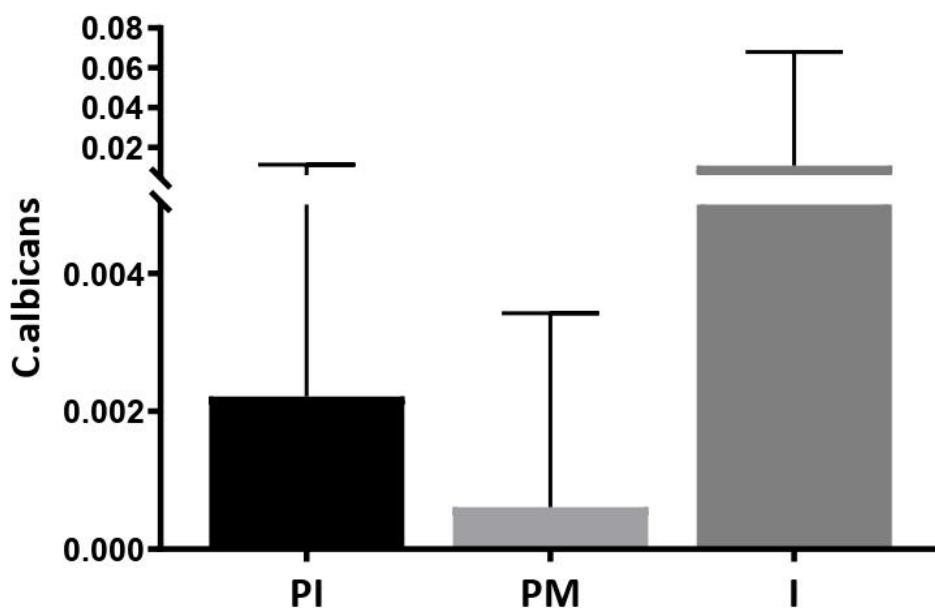
Slika br. 27 - Srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija relativnih nivoa bakterije *Porphyromonas gingivalis* kod pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



Slika br. 28 - Srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija relativnih nivoa bakterije *Fusobacterium spp* kod pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



Slika br. 29 - Srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija relativnih nivoa *Epstein-Barr* virusa (*EBV*) kod pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



Slika br. 30 - Srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija relativnih nivoa gljivice *Candida albicans* (*C.albicans*) kod pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



Tabela 10 – Prikaz zastupljenosti patogenih mikroorganizama kod pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I) - srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija i medijana.

	Grupa	SV $\pm$ SD	Medijana	p *	p **
<i>P.gingivalis</i>	PI	25.625 $\pm$ 59.311	0.103	0,022	PI vs I p=0,012
	PM	8.312 $\pm$ 29.073	0.005		PM vs I p>0,05
	I	2.618 $\pm$ 13.833	0.004		PI vs PM p=0,026
<i>Fusobacterium spp.</i>	PI	121.455 $\pm$ 183.265	43.878	0,023	PI vs I p=0,041
	PM	103.640 $\pm$ 143.515	49.181		PM vs I p=0,008
	I	86.122 $\pm$ 195.607	13.498		PI vs PM p>0,05
<i>EBV</i>	PI	0.583 $\pm$ 1.047	0.085	0,230	PI vs I p>0,05
	PM	0.296 $\pm$ 0.944	0.053		PM vs I p>0,05
	I	0.454 $\pm$ 0.876	0.081		PI vs PM p>0,05
<i>C. albicans</i>	PI	0.002 $\pm$ 0.009	0.000	0,790	PI vs I p>0,05
	PM	0.001 $\pm$ 0.003	0.000		PM vs I p>0,05
	I	0.011 $\pm$ 0.057	0.000		PI vs PM p>0,05

SV  $\pm$  SD – srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija; *P.gingivalis* – *Porphyromonas gingivalis*; *Fusobacterium spp.* – *Fusobacterium species*; *EBV* – *Epstein-Barr virus*; *C. albicans* – *Candida albicans*; \* p vrednost - *Kruskal-Wallis* test, značajno za  $p < 0,05$ ; \*\* p vrednost - *Mann-Whitney* test, značajno za  $p < 0,05$ .

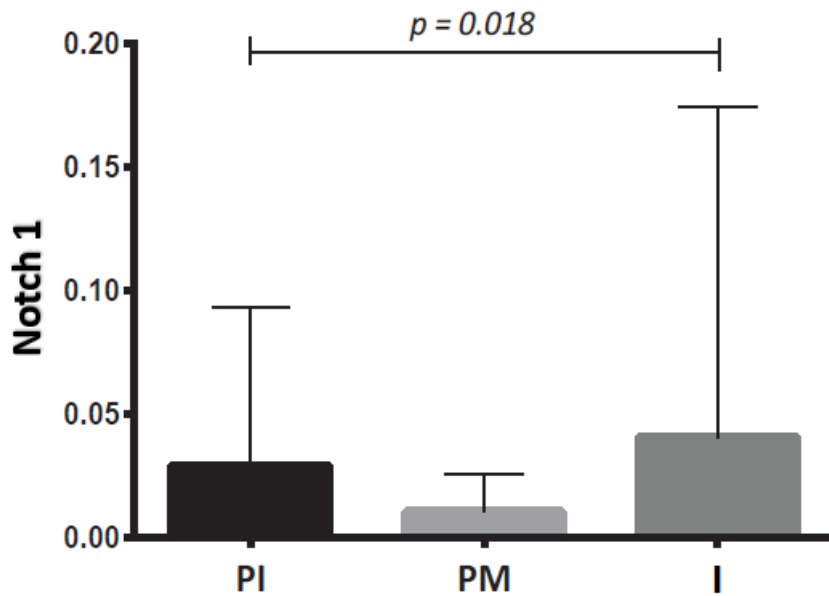
#### 4.4 Ekspresija molekula Notch signalnog puta kod pacijenata sa peri-implantitisom, peri-implantnim mukozitisom i zdravim implantatima

Analizirani su relativni nivoi genske ekspresije molekula Notch signalnog puta u sve tri grupe (Tabela 11). Kod pacijenata sa peri-implantitisom uočeno je značajno smanjenje nivoa relativne ekspresije *Notch 1* gena u odnosu na pacijente za zdravim implantatima ( $p=0,018$ ; Slika br. 31). Pored toga, povećanje relativne ekspresije *Hey 1* gena kod ovih pacijenata bilo je značajnije u odnosu i na PM i I grupu ( $p=0,003$  i  $p=0,001$ ; Slika br. 32).

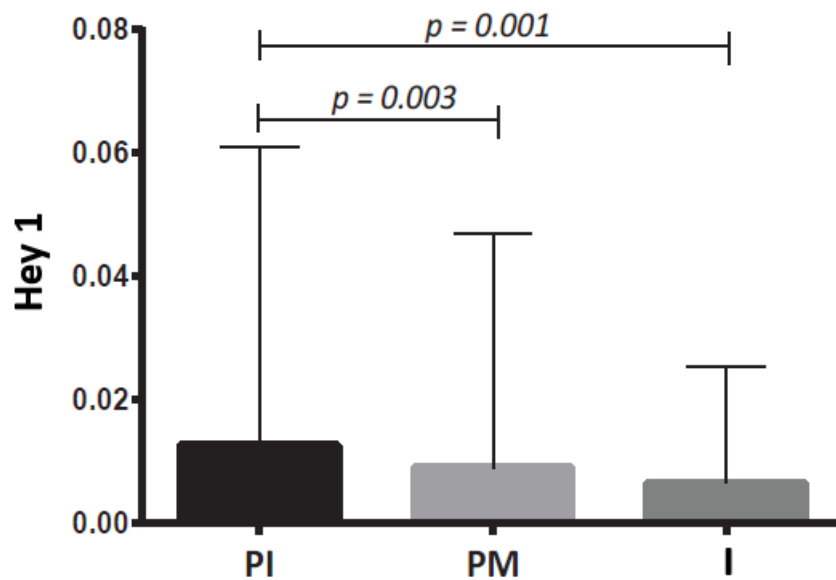
Tabela 11 – Prikaz srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije molekula *Notch* signalnog puta kod pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).

	Grupa	SV $\pm$ SD	p *
Notch 1	PI	0,029 $\pm$ 0,064	0,038
	PM	0,010 $\pm$ 0,015	
	I	0,040 $\pm$ 0,134	
Notch 2	PI	0,029 $\pm$ 0,064	0,319
	PM	0,059 $\pm$ 0,275	
	I	0,038 $\pm$ 0,096	
Jagged 1	PI	0,036 $\pm$ 0,134	0,433
	PM	0,021 $\pm$ 0,067	
	I	0,051 $\pm$ 0,195	
Hes 1	PI	0,033 $\pm$ 0,097	0,974
	PM	0,038 $\pm$ 0,130	
	I	0,057 $\pm$ 0,149	
Hey 1	PI	0,013 $\pm$ 0,049	0,001
	PM	0,009 $\pm$ 0,038	
	I	0,006 $\pm$ 0,019	

SV  $\pm$  SD – srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija; \* p vrednost - *Kruskal-Wallis* test, značajno za  $p<0,05$ .



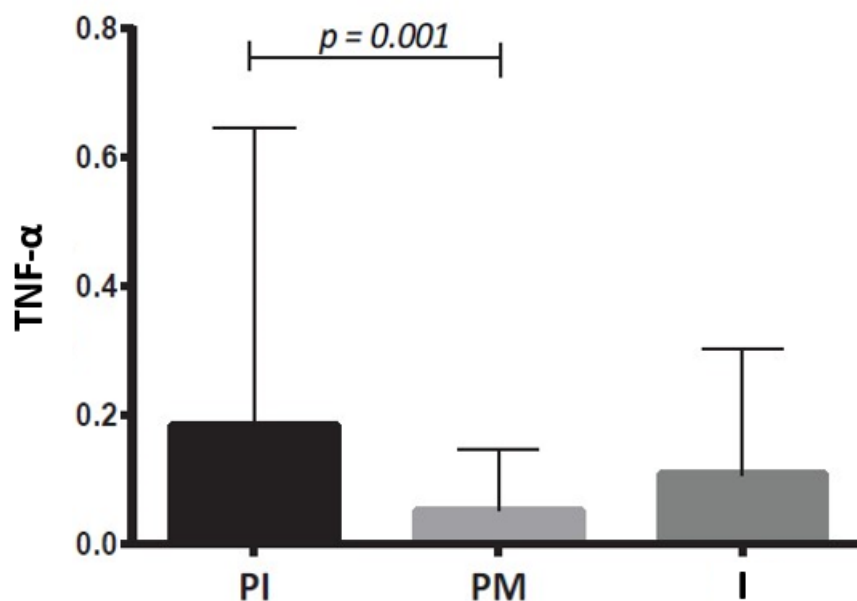
Slika br. 31 – Grafički prikaz nivoa relativne genske ekspresije *Notch 1* gena kod pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



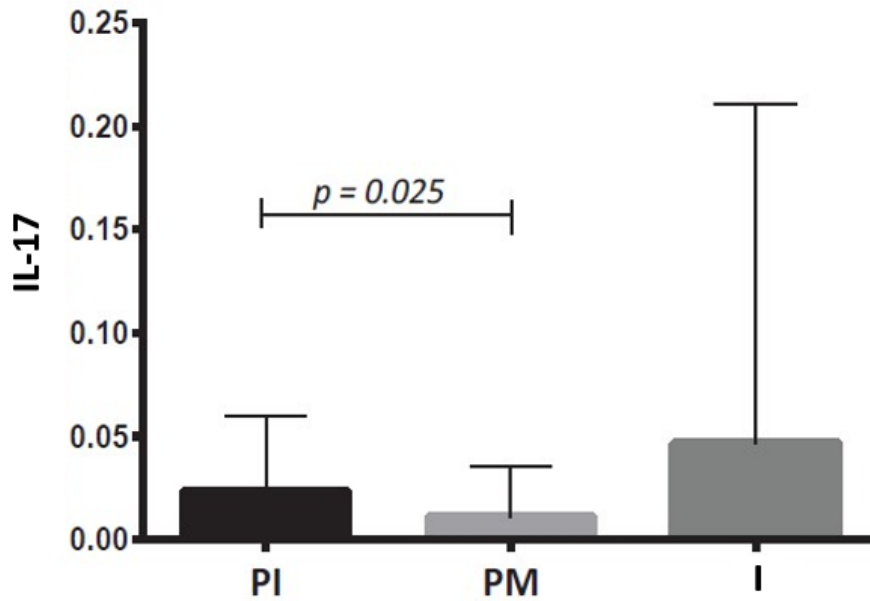
Slika br. 32 – Grafički prikaz nivoa relativne genske ekspresije *Hey 1* gena kod pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).

#### 4.5 Ekspresija proinflammatoryh citokina i medijatora koštane remodelacije u PI, PM i I grupama

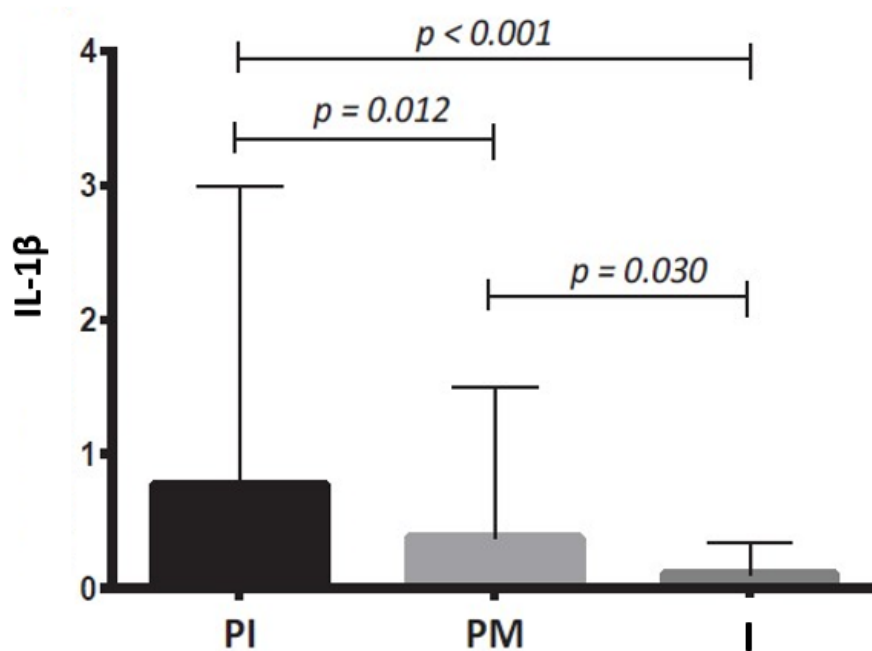
Evalvacijom ekspresije proinflammatoryh citokina među grupama, PI grupa pokazala je visoke vrednosti nivoa *TNF- $\alpha$*  ( $p=0,001$ ) i *IL-17* ( $p=0,025$ ) u odnosu na PM grupu (Slike br. 33 i 34). Takođe povišena vrednost *TNF- $\alpha$*  uočena je i poređenjem PI i I grupe, ali bez statistički značajne razlike ( $p=0,079$ ). Analizom relativnog nivoa genske ekspresije *IL-1 $\beta$*  u okviru svih grupa uočena je statistički značajna razlika ( $p<0,05$ ). Ovaj inflamatorni medijator u najvećoj meri bio je zasupljen kod peri-implantitisa, dok je njegov najmanji nivo registrovan u uzorcima zdravih implantata (Slika br. 35). Takođe, značajno viši nivo genske ekspresije u PI grupi imao je *IL-6* u odnosu na PM i I grupu ( $p=0,011$  i  $p=0,003$ ; Slika br. 36). Povišeni nivoi ekspresije *RANKL* molekula javili su se u PI grupu i statistički značajno su se razlikovali od nivoa zabeleženih u PM ( $p=0,006$ ) i I ( $p=0,024$ ) grupama (Slika br. 37). Nivo ekspresije *OPG* gena nije pokazao značajnost među grupama. Rezultati srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije analiziranih gena prikazani su u tabeli 12.



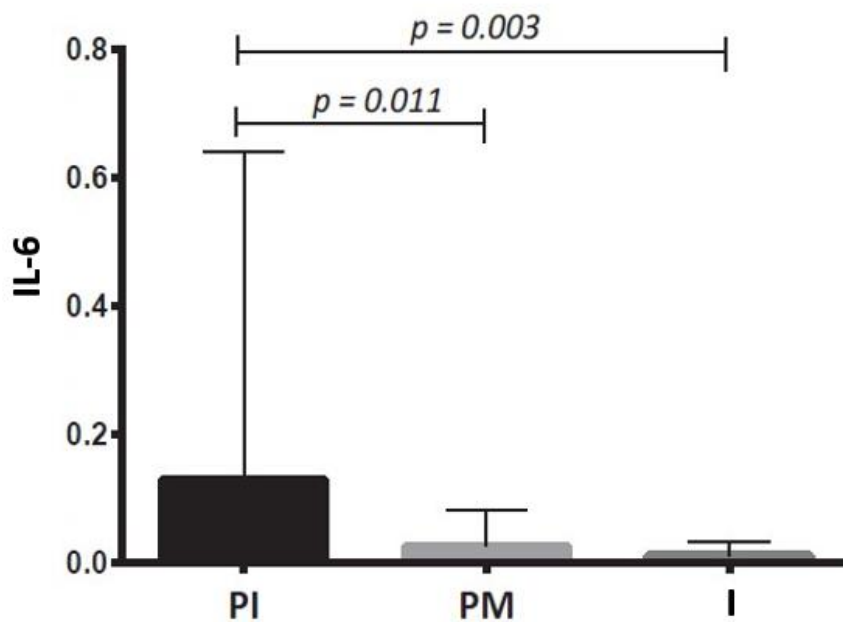
Slika br. 33 – Grafički prikaz nivoa relativne genske ekspresije *TNF- $\alpha$*  (tumor nekrosis faktor alfa) gena kod pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



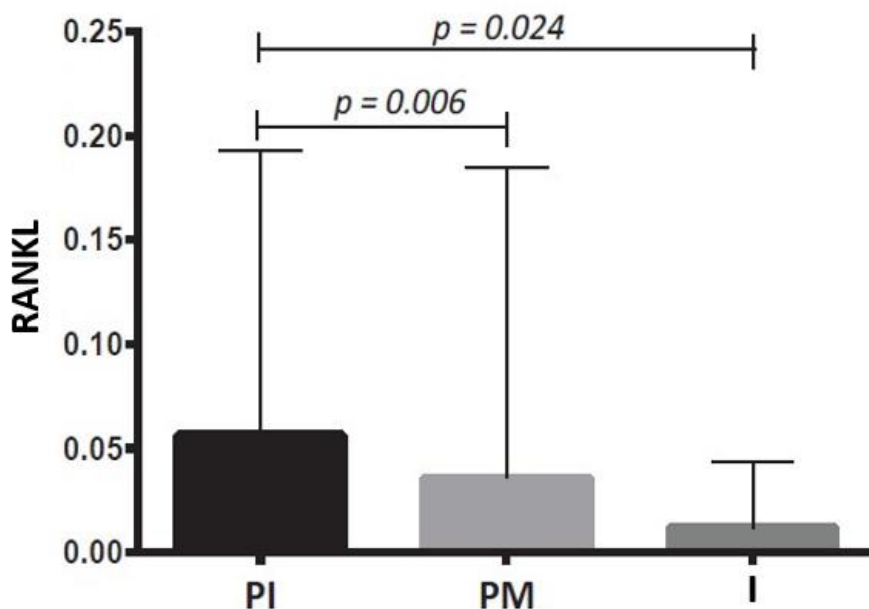
Slika br. 34 – Grafički prikaz nivoa relativne genske ekspresije *IL-17* (interleukin 17) gena kod pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



Slika br. 35 – Grafički prikaz nivoa relativne genske ekspresije *IL-1β* (interleukin 1 beta) gena kod pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



Slika br. 36 – Grafički prikaz nivoa relativne genske ekspresije *IL-6* (interleukin 6) gena kod pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).



Slika br. 37 – Grafički prikaz nivoa relativne genske ekspresije *RANKL* (receptor aktivator za nuklearni faktor kapa B liganda) gena kod pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).

Tabela 12 – Prikaz srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije proinflatornih citokina i medijatora koštane remodelacije kod pacijenata sa peri-implantitisom (PI), peri-implantnim mukozitisom (PM) i sa zdravim implantatima (I).

	Grupa	SV $\pm$ SD	p *
TNF- $\alpha$	PI	0,184 $\pm$ 0,463	0,005
	PM	0,052 $\pm$ 0,095	
	I	0,107 $\pm$ 0,196	
IL-17	PI	0,023 $\pm$ 0,037	0,076
	PM	0,010 $\pm$ 0,025	
	I	0,047 $\pm$ 0,164	
IL-1 $\beta$	PI	0,767 $\pm$ 2,224	<0,001
	PM	0,373 $\pm$ 1,116	
	I	0,103 $\pm$ 1,116	
IL-6	PI	0,126 $\pm$ 0,514	0,005
	PM	0,024 $\pm$ 0,058	
	I	0,010 $\pm$ 0,021	
RANKL	PI	0,056 $\pm$ 0,137	0,009
	PM	0,036 $\pm$ 0,149	
	I	0,012 $\pm$ 0,032	
OPG	PI	0,020 $\pm$ 0,055	0,498
	PM	0,249 $\pm$ 1,282	
	I	0,074 $\pm$ 0,345	

SV  $\pm$  SD – srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija; TNF- $\alpha$  - Tumor nekroza faktor alfa; IL-17 - Interleukin 17; IL-1 $\beta$  - Interleukin 1 beta; IL-6 - Interleukin 6; RANKL - Receptor aktivator za nuklearni faktor kapa B liganda; OPG – Osteoprotežerin (*enlg. osteoprotegerin*); \* p vrednost - Kruskal-Wallis test, značajno za  $p < 0,05$ ;

#### 4.6 Korelacija između ispitivanih mikroorganizama i genske ekspresije molekula Notch signalnog puta, proinflatornih citokina i medijatora koštane remodelacije RANKL i OPG

Na nivou čitavog uzorka uočena je negativna korelacija između *C. albicans* i relativnog nivoa genske ekspresije *Hey 1* molekula ( $\rho = -0,292$ ;  $p = 0,003$ ), dok je pozitivnu korelaciju ovaj mikroorganizam pokazao sa *OPG* medijatorom koštane remodelacije ( $\rho = 0,202$ ;  $p = 0,042$ ) (Tabela 13).

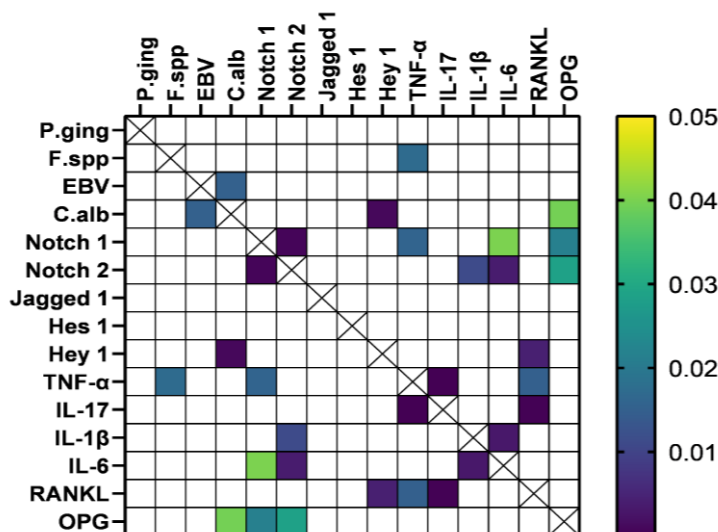
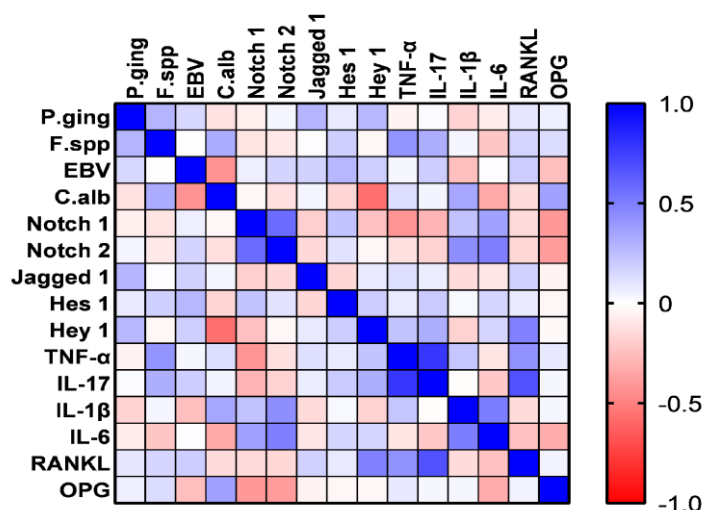
Tabela 13 – Korelacija mikroorganizama i nivoa relativne genske ekspresije ispitivanih molekula

		P.ging	F.spp	EBV	C.alb
Notch 1	$\rho$	-0,059	-0,031	0,075	-0,179
	$p$	0,555	0,755	0,452	0,071
Notch 2	$\rho$	0,084	-0,016	0,002	-0,179
	$p$	0,400	0,877	0,987	0,072
Jagged 1	$\rho$	-0,006	0,032	0,119	0,026
	$p$	0,954	0,751	0,232	0,792
Hes 1	$\rho$	-0,071	0,006	0,049	-0,106
	$p$	0,475	0,948	0,626	0,290
Hey 1	$\rho$	0,126	0,045	-0,017	<b>-0,292**</b>
	$p$	0,208	0,654	0,865	<b>0,003</b>
TNF $\alpha$	$\rho$	-0,125	0,117	-0,048	-0,099
	$p$	0,210	0,243	0,628	0,321
IL-17	$\rho$	-0,06	0,113	0,014	-0,091
	$p$	0,548	0,259	0,892	0,362
IL-1 $\beta$	$\rho$	0,067	0,104	-0,092	-0,017
	$p$	0,503	0,299	0,359	0,866
IL-6	$\rho$	0,048	-0,105	-0,058	-0,124
	$p$	0,634	0,292	0,566	0,213
RANKL	$\rho$	0,007	0,074	0,152	-0,059
	$p$	0,947	0,463	0,127	0,557
OPG	$\rho$	0,139	-0,038	-0,04	<b>0,202*</b>
	$p$	0,163	0,705	0,691	<b>0,042</b>

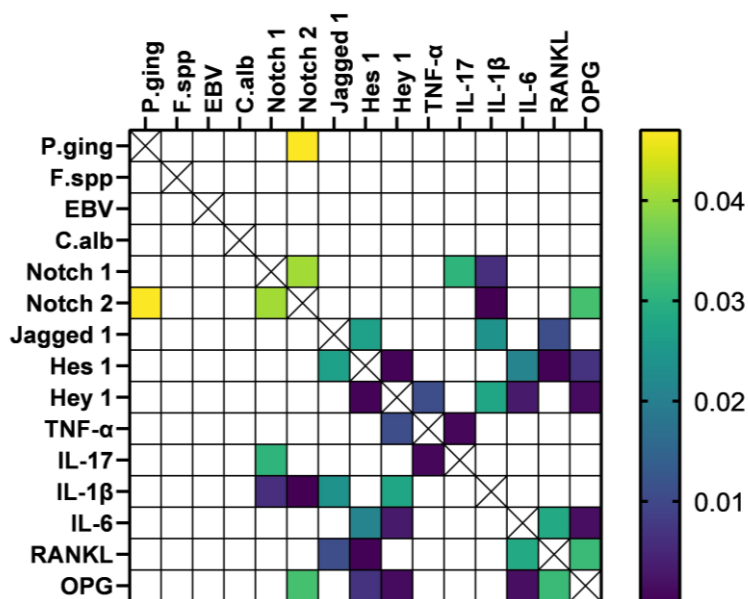
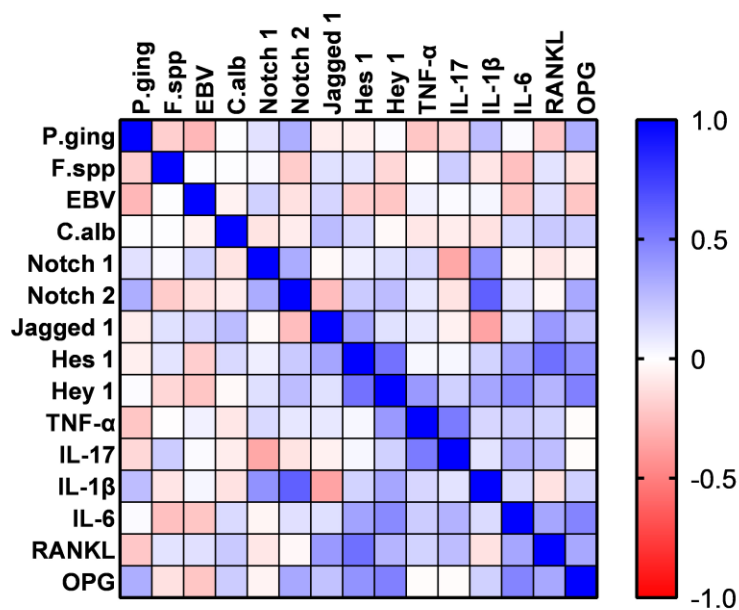
P.ging - *Porphyromonas gingivalis* ; F.spp - *Fusobacterium species* ; EBV - *Epstein-Barr virus*; C.alb - *Candida albicans*; IL- interleukin; RANKL – engl. *receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*; OPG – engl. *osteoprotegerin*; TNF $\alpha$  – engl. *tumor necrosis factor alpha*.



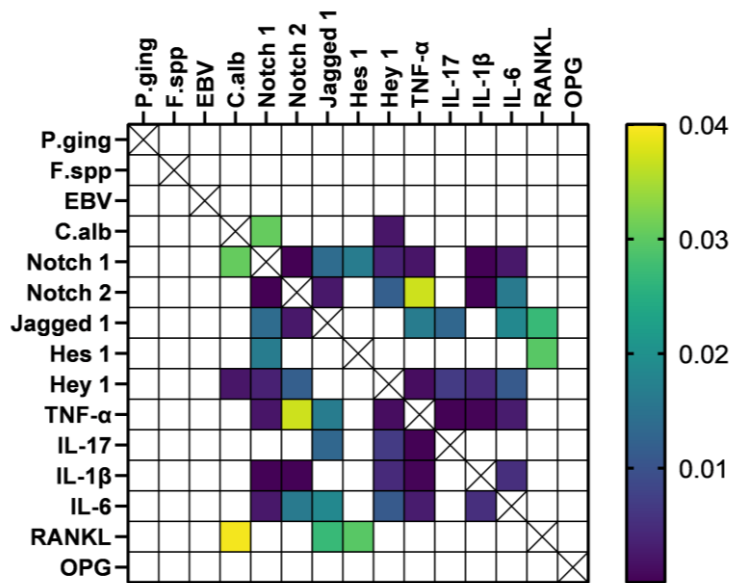
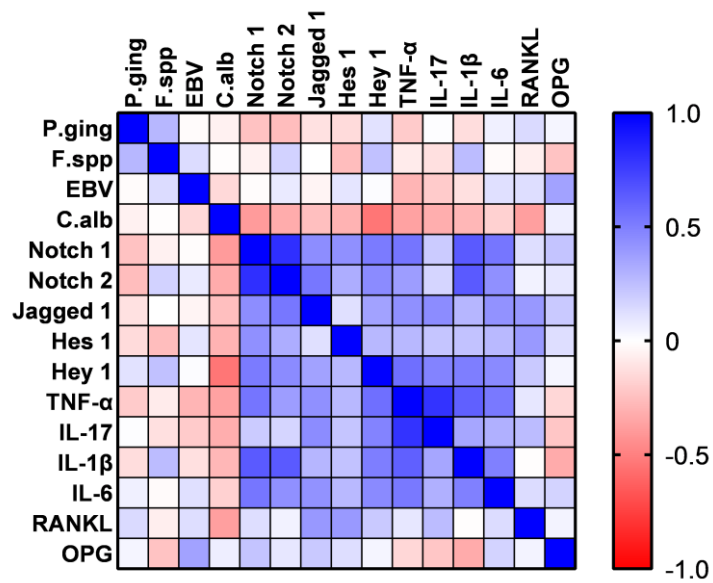
Značajna pozitivna korelacija između nivoa *Fusobacterium spp.* i nivoa genske ekspresije *TNF- $\alpha$*  pronađena je u PI grupi ( $\rho=0,419$ ;  $p=0,017$ ), dok je negativna korelacija otkrivena između gljivice *C. albicans* i *Hey 1* relativne ekspresije gena ( $\rho=-0,565$ ;  $p=0,001$ ) (Slika br. 38). Pored toga, primećena je pozitivna korelacija u PM grupi između prisustva bakterije *P. gingivalis* i ekspresije *Notch 2* gena ( $\rho=0,316$ ;  $p=0,047$ ) (Slika br. 39). Dodatno, značajna negativna korelacija uočena je u I grupi između nivoa *C. albicans* i relativne genske ekspresije *Notch 1* ( $\rho=-0,397$ ;  $p=0,030$ ) i *Hey 1* gena ( $\rho=-0,536$ ;  $p=0,002$ ) (Slika br. 40).



Slika br. 38 - Toplotna mapa korelacionog matriksa između analiziranih mikroorganizama i gena u PI grupi; gore – Spearman-ovi koeficijenti korelacije ( $\rho$ ), dole -  $p$  vrednosti.



Slika br. 39 - Toplotna mapa korelacionog matriksa između analiziranih mikroorganizama i gena u PM grupi; gore – Spearman-ovi koeficijenti korelacije ( $\rho$ ), dole -  $p$  vrednosti.



Slika br. 40 - Toplotna mapa korelacionog matriksa između analiziranih mikroorganizama i gena u I grupi; gore – Spearman-ovi koeficijenti korelacije ( $\rho$ ), dole -  $p$  vrednosti.

#### 4.7 Mikroorganizmi i klinički parametri

Vršena je procena korelacije između ispitivanih mikroorganizama i kliničkih parametara izmerenih na nivou cele usne duplje i na nivou implantata (Tabela 13). Utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija bakterije *P. gingivalis* sa vrednostima DS ( $\rho=0,207$ ;  $p=0,037$ ) i KNP ( $\rho=0,297$ ;  $p=0,002$ ). Takođe, nivo *Fusobacterium spp.* bio je u pozitivnoj korelaciji sa vrednostima NPE ( $\rho=0,224$ ;  $p=0,024$ ), KNP ( $\rho=0,262$ ;  $p=0,008$ ) i PI ( $\rho=0,228$ ;  $p=0,021$ ).

Kada su u pitanju zabeleženi klinički parametri na nivou implantata, značajna pozitivna korelacija primećena je između zastupljenosti *P. gingivalis* i izmerenom DSi ( $\rho=0,221$ ;  $p=0,033$ ), NPEi ( $\rho=0,238$ ;  $p=0,016$ ) i KNPI ( $\rho=0,327$ ;  $p=0,001$ ). Takođe relativni nivoi *Fusobacterium spp.* bili su u pozitivnoj korelaciji sa vrednostima DSi ( $\rho=0,220$ ;  $p=0,026$ ) i KNPI ( $\rho = 0,233$ ;  $p = 0,018$ ). S druge strane, nije pronađena značajna korelacija između prevalencije EBV i *C. albicans* i evaluiranih kliničkih parametara.

Model univarijantne linearne regresije je pokazao da je *P. gingivalis* prediktor DSi ( $\rho=0,011$ ; prilagođen  $R^2=0,063$ ), kao i NPEi ( $\rho=0,049$ ; prilagođeno  $R^2=0,038$ ). Suprotno tome, *Fusobacterium spp.* nije impliciran kao prediktor dubine sondiranja i nivoa pripojnog epitela oko implantata ( $p > 0,05$ ).

Tabela 14 – Prikaz korelacije između ispitivanih mikroorganizama i kliničkih parametara na nivou cele usne duplje i na nivou implantata

		DS	NPE	KNP	PI	DSi	NPEi	KNPi	PIi
P.g.	$\rho$	<b>0,207*</b>	0,177	<b>0,297**</b>	0,148	<b>0,211*</b>	<b>0,238*</b>	<b>0,327**</b>	0,191
	$p$	<b>0,037</b>	0,075	<b>0,002</b>	0,138	<b>0,033</b>	<b>0,016</b>	<b>0,001</b>	0,055
F.spp	$\rho$	0,192	<b>0,224*</b>	<b>0,262**</b>	<b>0,228*</b>	<b>0,220*</b>	0,15	<b>0,233*</b>	0,189
	$p$	0,054	<b>0,024</b>	<b>0,008</b>	<b>0,021</b>	<b>0,026</b>	0,132	<b>0,018</b>	0,057
EBV	$\rho$	-0,059	-0,026	0,043	0,051	0,071	0,005	-0,023	0,093
	$p$	0,553	0,796	0,667	0,609	0,479	0,960	0,817	0,355
C.alb.	$\rho$	0,005	0,08	-0,075	0,007	-0,049	-0,017	-0,032	0,019
	$p$	0,96	0,423	0,454	0,943	0,625	0,864	0,749	0,851

P.g. - *Porphyromonas gingivalis* ; F.spp - *Fusobacterium species* ; EBV - *Epstan-Barr virus*; C.alb. - *Candida albicans*; DSi – peri-implantna dubina sondiranja; NPEi – peri-implantni nivo pripojnog epitela; KNPI – peri-implantno krvarenje na provokaciju; PIi – peri-implantni plak indeks;  $\rho$  – koeficijent korelacije; \* Korelacija je značajna na nivou 0,05 (dvorepi test); \*\* Korelacija je značajna na nivou 0,01 (dvorepi test).

## 5. DISKUSIJA

Oboljenja peri-implantnih tkiva uzrokovana biološkim komplikacijama predstavljaju infekcije heterogenog porekla uzrokovane najčešće parodontopatogenim bakterijama crvenog i narandžastog kompleksa, nekultivisanim asaharolitičkim gram-pozitivnim i gram-negativnim bacilima i nešto ređe oportunističkim mikroorganizmima (222).

Ova studija bavila se istraživanjem prisustva dva dobro poznata parodontopatogena u peri-implantnom sulkusu zdravih implantata, odnosno džepu obolelih od peri-implantitisa i peri-implantnog mukozitisa. Ovi oralni patogeni igraju važnu ulogu u razvoju parodontalnih i peri-implantnih oboljenja (222-224). Pokazano je da infekcija izazvana udruženim odnosom bakterija *P. gingivalis* i *Fusobacterium spp.* pojačava inflamatorni odgovor domaćina i na taj način dovodi do većeg gubitka koštanog tkiva (225). Prisustvo *P. gingivalis* u parodontocijumu čak i u maloj količini inhibiše normalan mehanizam odbrane domaćina menjajući odnos mikroorganizama i sastav normalno prisutnog mikrobiološkog profila. Usled ovakve disbioze dolazi do preopterećenja imunog odgovora domaćina, što za posledicu ima nastanak oboljenja (96). Pored toga, *Fusobacterium spp.* ponaša se kao „most“ između primarnih i sekundarnih kolonizatora, stoga povećanje ovog mikroorganizma ima uticaj na stepen ozbiljnosti parodontalnog i peri-implantnog oboljenja (140, 226, 227). Rezultati ove studije pokazali su veću zastupljenost *P. gingivalis* bakterije kod peri-implantitisa u odnosu na uzorke zdravih implantata i onih zahvaćenih peri-implantnim mukozitisom, dok je prevalenca *Fusobacterium spp.* bila veća kod obe grupe obolelih u poređenju sa zdravom. Slično ovim zapažanjima, u prethodnim studijama *P. gingivalis* registrovan je češće na mestima peri-implantitisa u poređenju sa zdravim implantatima (228-230). Rezultati ovog istraživanja u skladu su sa ranijim studijama u kojima se navodi značajno prisustvo *Fusobacterium spp.* u početnim fazama inflamacije peri-implantnog tkiva. Pored toga i *P. gingivalis* i *Fusobacterium spp.* javljaju se kao dominantne vrste u regiji implantata sa lošom prognozom (229).

Takođe, osim bakterija ispitivana je i prevalenca gljivice *C. albicans* oportunističkog patogena, kao i EBV-a iz porodice herpes virusa kod pacijenata sa obolelim i zdravim implantatima. *C. albicans* je najzastupljenija gljivica iz roda *Kandida* prisutna u oralnoj sredini. Najčešće se dovodi u vezu sa proteznom stomatitisom ili gljivičnim oboljenjem usne duplje kod imunokompromitovanih pacijenata. U sistematskom preglednom radu u kojem je proučavan uticaj *C. albicans* na peri-implantitis, *de Mendoza* i saradnici zaključili su da je ova gljivica čest stanovnik peri-implantnog sulkusa i zdravih i obolelih implantata, ali da je ipak u najvećem broju slučajeva bila prisutna kod obolelih od peri-implantitisa. Uzgred, prevalenca *C. albicans* u peri-implantnoj crevikularnoj tečnosti pokazala je i povezanost sa prisustvom poznatih parodontopatogena, među kojima je i *P. gingivalis* (231). Ovi podaci samo sugerišu na njeno učešće u etiologiji oboljenja implantata, međutim bez verodostojnih dokaza. Slično navedenom, prevalenca *C. albicans* nije značajno varirala među grupama u ovom ispitivanju.

Kada je EBV u pitanju, dobro je poznato da je njegov put prenosa pljuvačkom, i tokom života više od 90% populacije biva zaraženo njime (232). Prisustvo ovog virusa utvrđeno je u subgingivalnoj regiji obolelih od parodontitisa i s obzirom na sličnu etiopatogenezu ovih oboljenja javila se potreba za njegovim proučavanjem u peri-implantnim lezijama (233). Ovo istraživanje nije pokazalo značajnu prevalencu EBV-a među pacijentima obolelim od peri-implantitisa, peri-implantnog mukozitisa i onih sa zdravim implantatima. Samo jedno istraživanje bavilo se zastupljenošću različitih genotipova ovog virusa, gde je utvrđeno značajno prisustvo EBV-1 genotipa kod pacijenata sa peri-implantitisom (155). Skorija meta analiza koja se bavila korelacijom ovog virusa sa peri-implantnim oboljenjima nije pokazala statističku značajnost u prevalenci EBV-a kod zdravih u odnosu na obolele implantate (234).

Imajući u vidu kliničke aspekte peri-implantnih stanja i oboljenja, utvrđena je značajna pozitivna korelacija između prisustva *P. gingivalis* i *Fusobacterium spp.* i krvarenja prilikom sondiranja oko implantata. Krvarenje na provokaciju jedan je od glavnih pokazatelja inflamacije. Takođe, nivo pripojnog epitela i plak indeks na nivou čitave usne duplje, kao i dubina sondiranja beležena oko implantata pokazali su značajnu pozitivnu korelaciju sa relativnim nivoima *Fusobacterium spp.* Veoma važan nalaz predstavlja povezanost prisustva *P. gingivalis*-a sa povećanjem vrednosti dubine sondiranja i nivoa pripojnog epitela oko implantata. Klinički parametri analizirani u ovoj studiji koriste se za procenu stanja parodonticijuma/peri-implantnih tkiva, kao i stepen inflamacije, a njihova pouzdanost utvrđena je u mnogim istraživanjima (190, 223, 228, 235). Pored navedenog, ne treba zaboraviti da je i istorija parodontalnog oboljenja povezana sa pojavom peri-implantitisa, usled transmisije bakterija iz parodontalnih džepova preostalih zuba u predeo implantata (224). Imajući u vidu podatke navedene u postojećoj literaturi, ovom studijom potvrđena je pozitivna korelacija kliničkih parametara i zastupljenosti *P. gingivalis* i *Fusobacterium spp.* kod obolelih od peri-implantitisa. Naime, kliničke manifestacije stanja oko implantata mogu se u izvesnoj meri pripisati prisustvu *P. gingivalis*. Prilagođena *R* vrednost u univarijantnom regresionom modelu pokazala je da se 6,3% promena dubine sondiranja oko implantata i 3,8% promena u nivou pripojnog epitela u regiji implantata javljaju kao posledica prisustva *P. gingivalis* bakterije. Kao odgovor na invaziju patogenim mikrobima, organizam domaćina pokreće brojne odbrambene procese. Ovi procesi podrazumevaju aktivaciju različitih signalnih puteva i inflamatornih medijatora. Kada su u pitanju oboljenja potpornih tkiva zuba i implantata, tok imunog odgovora domaćina definiše progresiju oboljenja a samim tim i obim destrukcije tkiva. Notch signalni put zadužen je za formiranje i remodelaciju koštanog tkiva, regulišući procese pomoću odgovarajućih receptora i liganda (208). Smanjena ekspresija *Notch 1* gena i povećana ekspresija *Hey 1* gena utvrđene su kod pacijenata obolelih od peri-implantitisa koji su učestvovali u ovoj studiji. *Notch 1* receptor zadužen je za promociju koštanog tkiva, dok *Hey 1* gen zajedno sa *Notch 2* receptorom učestvuje u osteoklastogenezi i dovodi do resorpcije koštanog tkiva (207, 236). Do sada, analiziran je uticaj Notch signalnog puta na resorpciju koštanog tkiva kod obolelih od parodontitisa (187), kao i kod pacijenata sa periapikalnim lezijama (237, 238), međutim ovo je prva studija koja povezuje ovaj signalni put sa peri-implantnim oboljenjima. Mijailović i saradnici zaključili su da povećana ekspresija *Notch 2* gena indukuje osteolizu kod pacijenata obolelih od parodontitisa, kao i da smanjenje ekspresije *Notch 1* i *Jagged 1* gena doprinosi većem gubitku koštanog tkiva (187). Takođe, Nikolić i saradnici zaključili su da je veći koštani gubitak kod periapikalnih lezija posledica povećane ekspresije *Notch 2*, *Jagged 1* i *Hey 1* gena (237).

Pored toga, u imunom odgovoru domaćina učestvuju i različiti proinflamatorni citokini. Za sada još uvek nije ustanovljen specifičan patogenetski obrazac po kom deluju inflamatorni medijatori kod obolelih od peri-implantitisa (63). Ova studija pokazala je značajno povećanu ekspresiju *TNF- $\alpha$* , *IL-17*, *IL-1 $\beta$*  i *IL-6* gena kod obolelih od peri-implantitisa. Ekspresija *TNF- $\alpha$*  i *IL-17* bila je značajno viša kod peri-implantitisa u odnosu na peri-implantne mukozitise. *IL-1 $\beta$*  takođe je pokazao značajnu razliku u nivou ekspresije između ispitivanih grupa; najviši nivoi genske ekspresije *IL-1 $\beta$*  pokazani su kod ispitanika sa peri-implantitisom, dok su najmanji bili kod zdravih kontrola. Kao što je već poznato *TNF- $\alpha$*  i *IL-1 $\beta$*  imaju važnu ulogu u destrukciji kako parodontalnih, tako i peri-implantnih tkiva i pokazano je njihovo udruženo dejstvo (239). Ovi citokini stimulišu resorpciju koštanog tkiva i oslobađanje različitih enzima koji dovode do destrukcije tkiva (240). Slično rezultatima ove studije i drugi istraživači zabeležili su povećanje ekspresije *TNF- $\alpha$*  i *IL-1 $\beta$*  kod peri-implantitisa (190, 241-243).

Zabeleženo je da se ova dva inflamatorna medijatora produkuju čak i na mestima sa minimalnom akumulacijom bakterijskih mikroorganizama (196). *Gündoğar* i saradnici (244) istraživali su takođe nivo inflamatornih medijatora u peri-implantnoj cervikalnoj tečnosti, međutim ekspresija *TNF-α* i *IL-1β* bila je slična i kod peri-implantitisa i kod peri-implantnog mukozitisa, što se ne podudara sa rezultatima ove studije.

Pored toga, značajno povišeni nivoi *IL-6* i *IL-17* primećeni su u uzorcima pacijenata obolelih od peri-implantitisa u odnosu na uzorke iz regije peri-implantnog sulkusa zdravih implantata. *IL-17* igra važnu ulogu u resorpciji kosti koja nastaje usled parodontalne upale, regulišući *RANK* u preosteoklastima ovaj medijator indukuje ekspresiju *RANKL*-a i dovodi do osteolize (245, 246). Utvrđeni povišeni nivoi *IL-17* u ovom istraživanju govore u prilog njegovom učešću u patološkim događajima koji se odvijaju kod periimplantitisa na nivou koštanog tkiva, što su pokazala i druga istraživanja (186, 188).

Značajna razlika uočena je i između PI i PM grupe kada su u pitanju nivoi *IL-6*. Ovaj medijator učestvuje u oba mehanizma odbrane organizma (stečeni i urođeni) i zajedno sa prethodno pomenutim proinflamatornim citokinima učestvuje u aktivaciji osteoklasta kod obolelih od peri-implantitisa što je pokazano i u drugim istraživanjima (247, 248). Sistematski pregledni rad iz 2019. godine ukazao je da se od svih ispitivanih inflamatornih medijatora samo *IL-1β* i *IL-6* mogu koristiti kao pomoćna dijagnostička sredstva kada su u pitanju oboljenja i stanja implantata (249). Osim inflamatornih citokina, važni medijatori koštane remodelacije jesu *RANKL* i *OPG*. Dok je *RANKL* zadužen za osteoklasogenezu, *OPG* sprečava sazrevanje osteoklasta. Prekomerna ekspresija *RANKL* gena u ovoj studiji primećena je kod PI grupe u odnosu na PM i I grupu. Povećanje ovog gena i smanjenje ekspresije *OPG* gena predstavljaju najčešće viđen obrazac kod peri-implantitisa (250, 251). *RANKL/OPG* odnos povezan je sa povećanom ekspresijom proinflatornih citokina. Podaci iz literature takođe ukazuju na sinergističko dejstvo *TNF-α* i *RANKL*-a u stimulaciji osteolize usled prekomerne ekspresije *RANK* receptora na prekursorima osteoklasta i ekspresije *RANKL*-a na osteoblastima (191, 252). Povećani nivoi genske ekspresije medijatora ispitivanih u ovoj studiji podudaraju se sa rezultatima ranije objavljenih studija (173, 188, 249).

Sa ciljem da se bolje razjasni patogenetski mehanizam oboljenja implantata, vršena je korelacija prisustva ispitivanih mikroorganizama sa ekspresijom različitih medijatora koji učestvuju u razvoju inflamatornih procesa. Pozitivne korelacije pokazane su između nivoa *Fusobacterium* spp. i nivoa ekspresije *TNF-α* gena u grupi sa peri-implantitisom, kao i između nivoa *P. gingivalis* i *Notch 2* genske ekspresije u grupi sa peri-implantnim mukozitisom. Ovi nalazi u skladu su sa dostupnim podacima. Naime, *TNFα* označen je kao jedan od proinflamatornih citokina okidača procesa resorpcije koštanog tkiva, pa je kao takav i prisutan u većoj količini kod peri-implantitisa (218, 253, 254). S druge strane, prisustvo *Fusobacterium* spp. ima uticaj na povećanje produkcije *TNFα* (255), pa tako veću zastupljenost *Fusobacterium* spp. kod peri-implantitisa prati povećano prisustvo *TNFα*. Ovo ukazuje na njihovu zajedničku ulogu u patogenetskim procesima koji dovode do resorpcije koštanog tkiva.

Pored toga, usled mogućnosti da modifikuje mehanizam odbrane i indukuje produkciju medijatora inflamacije koji oštećuju tkivo domaćina, *P. gingivalis* ima važnu ulogu u etiologiji parodontitisa (96, 253). Studije sprovedene na životinjskim modelima pokazale su da infekcije usne duplje izazvane ovim mikroorganizmima, menjaju ekspresiju medijatora inflamacije, čime dovode do gubitka kosti oko implantata (256). *Notch 2* gen promoviše aktivnost osteoklasta i na taj način reguliše osteoklastogenezu dovodeći do koštane resorpcije kod uznapredovalih formi parodontitisa (187, 257). Pokazana korelacija može ukazati na to da je porast prisustva *P. gingivalis* patogena u lezijama peri-implantnog mukozitisa praćena i povećanom regulacijom *Notch 2* gena za signalizaciju. Odlika *Notch 2* gena da favorizuje resorpciju kosti za posledicu može imati transformaciju lezije na nivou peri-implantne mukoze u peri-implantitis.

Suprotno ovome, negativne korelacije pokazala je gljivica *C. albicans* u PI grupi sa nivoom ekspresije *Hey 1* gena i u I grupi sa nivoom ekspresijom *Notch 1* gena. Dostupna literatura ukazuje da *Notch* signalni put direktno reguliše transkripcioni faktor *Hey 1* (258), dok *Notch 1* važi za promotera koštane sinteze (207), za koga se smatra da usled smanjene regulacije doprinosi gubitku koštano tkiva kod uznapredovalih formi parodontitisa i peri-implantitisa (187, 218). Iz pomenutih razloga može se pretpostaviti da je manja zastupljenost *C. albicans* kod zdravih implantata povezana sa povećanom regulacijom i *Notch 1* i *Hey 1* gena, gde *Notch 1* ima osteoprotektivnu ulogu. S druge strane, povećani nivoi *C. albicans* i smanjeni nivoi *Hey 1* faktora mogu imati ulogu u resorpciji kosti kod peri-implantitisa usled gubitka stimulacije *Notch 1* gena za sintezu kosti. *C. albicans* češće je prisutna u peri-implantnim lezijama, međutim uloga ove gljive u patogenezi neuspelih implantata nije još uvek adekvatno razjašnjena (231). Ovo istraživanje nije pokazalo značajnu korelaciju *EBV*-a sa ispitivanim medijatorima. Ograničenja ove studije ogledaju se u dizajnu poprečnog preseka, bez longitudinalne procene podataka, kao i korišćenim metodama koje možda nisu najnaprednije. Zapravo, sredstvo za metagenomske analize – sekvenciranje sledeće generacije (engl. *next-generation sequencing - NGS*) poslednjih godina dalo je novi uvid u sastav mikrobioma različitih niša usne duplje spram različitih uslova. Nekoliko studija koje su koristile pomenutu metodologiju u proučavanju mikrobioloških karakteristika peri-implantatnih bolesti dale su podatke o patogenezi peri-implantitisa sa donekle umanjnim ulogama vrsta uključenih u ovu studiju. Ipak, nedavna meta-analiza koja se fokusirala na upotrebu *NGS*-a u istraživanjima parodontitisa i peri-implantitisa pokazala je da *P. gingivalis* ostaje najčešće otkriven mikroorganizam u peri-implantitisu (109). Svakako, sadašnje nalaze treba tumačiti s oprezom, usled čega su neophodne dalje studije koje procenjuju ishode lečenja kako bi se potvrdili molekularni dokazi predstavljeni u ovoj studiji.



## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata sprovedene studije i analizirane literature izvedeni su sledeći zaključci:

1. Parodontopatogeni *P.gingivalis* i *Fusobacterium spp.* stanovnici su peri-implantne niše obolelih implantata. *P.gingivalis* je najzastupljeniji u peri-implantnim džepovima obolelih od peri-implantitisa, dok se nivo prisutnog *Fusobacterium spp.* ne razlikuje značajno kod obolelih implantata, ali odstupa u odnosu na zdrave.

2. Smanjena genska ekspresija *Notch 1* gena i povećana ekspresija *Hey 1* gena prate peri-implantitis. Ovi geni promoviraju gubitak koštanog tkiva oko implantata.

3. Peri-implantitis praćen je povećanjem nivoa genske ekspresije ispitivanih proinflammatoryh citokina: *TNF- $\alpha$* , *IL-17*, *IL-1 $\beta$*  i *IL-6*. Proinflammatory medijatori luče se kao odgovor domaćina na štetne nokse, pojačavaju imuni odgovor i sa ciljem da ograniče infekciju oni dovode do destrukcije tkiva.

4. Poremećen međudnos *RANKL*-a i *OPG*-a vodi do koštane remodelacije u pogledu resorpcije kosti kod peri-implantitisa, gde su zabeleženi znatno viši nivoi *RANKL* gena u odnosu na peri-implantni mukozitis i zdrave implantate.

5. Povećanje *P.gingivalis* bakterije dovodi do prekomerne ekspresija *Notch 2* gena kod pacijenata sa peri-implantnim mukozitisom. Takođe, prisustvo *Fusobacterium spp.* u većoj meri kod pacijenata sa peri-implantitisom, ekspresira pojačanu ekspresiju *TNF- $\alpha$* . Pored toga, *Notch 1* i *Hey 1* geni dominiraju kod zdravih implantata sa niskim vrednostima *C. albicans* u peri-implantnom sulkusu, dok će kod peri-implantitisa povećana ekspresija *Hey 1* gena rezultovati malom prevalencom ovog mikroorganizma.

6. Povećanje *P.gingivalis* u subgingivalnoj regiji implantata ima uticaj na povećanje vrednosti dubine sondiranja i krvarenja na provokaciju na nivou usne duplje. Prediktor je vrednosti dubine sondiranja i nivoa pripojnog epitela u regiji implantata. Takođe prisustvo ovog parodontopatogena utiče i na promenu vrednosti krvarenja na provokaciju regije implantata. S druge strane, *Fusobacterium spp.* nije prediktor, ali prevalenca ovog mikroba utiče na vrednosti nivoa pripojnog epitela, krvarenja na provokaciju i plak indeks čitavog zubika, kao na dubinu sondiranja i krvarenje oko implantata.

## 7. LITERATURA

1. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1969;3(2):81-100.
2. Panchal M, Khare S, Khamkar P, Suresh Bhole K. Dental implants: A review of types, design analysis, materials, additive manufacturing methods, and future scope. *Materials Today: Proceedings.* 2022;68:1860-7.
3. Jokstad A, Braegger U, Brunski JB, Carr AB, Naert I, Wennerberg A. Quality of dental implants. *Int Dent J.* 2003;53(6 Suppl 2):409-43.
4. Jung RE, Zembic A, Pjetursson BE, Zwahlen M, Thoma DS. Systematic review of the survival rate and the incidence of biological, technical, and aesthetic complications of single crowns on implants reported in longitudinal studies with a mean follow-up of 5 years. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23 Suppl 6:2-21.
5. Pjetursson BE, Asgeirsson AG, Zwahlen M, Sailer I. Improvements in Implant Dentistry over the Last Decade: Comparison of Survival and Complication Rates in Older and Newer Publications. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants.* 2014;29:308-24.
6. Pjetursson BE, Thoma D, Jung R, Zwahlen M, Zembic A. A systematic review of the survival and complication rates of implant-supported fixed dental prostheses (FDPs) after a mean observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23 Suppl 6:22-38.
7. Ting M, Craig J, Balkin BE, Suzuki JB. Peri-implantitis: A Comprehensive Overview of Systematic Reviews. *Journal of Oral Implantology.* 2018;44(3):225-47.
8. Misch CE, Perel ML, Wang HL, Sammartino G, Galindo-Moreno P, Trisi P, et al. Implant success, survival, and failure: the International Congress of Oral Implantologists (ICOI) Pisa Consensus Conference. *Implant Dent.* 2008;17(1):5-15.
9. Riemann M, Wachtel H, Beuer F, Bolz W, Schuh P, Niedermaier R, et al. Biologic and Technical Complications of Implant-Supported Immediately Loaded Fixed Full-Arch Prostheses: An Evaluation of Up to 6 Years. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2019;34(6):1482-92.
10. Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol.* 2002;29 Suppl 3:197-212; discussion 32-3.
11. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(1):527-51.
12. Alsaadi G, Quirynen M, Komárek A, van Steenberghe D. Impact of local and systemic factors on the incidence of oral implant failures, up to abutment connection. *J Clin Periodontol.* 2007;34(7):610-7.
13. Manzano G, Montero J, Martín-Vallejo J, Del Fabbro M, Bravo M, Testori T. Risk Factors in Early Implant Failure: A Meta-Analysis. *Implant Dent.* 2016;25(2):272-80.
14. Baqain ZH, Moqbel WY, Sawair FA. Early dental implant failure: risk factors. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2012;50(3):239-43.
15. Klokkevold PR, Han TJ. How do smoking, diabetes, and periodontitis affect outcomes of implant treatment? *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007;22 Suppl:173-202.
16. Renvert S, Persson GR, Pirih FQ, Camargo PM. Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: Case definitions and diagnostic considerations. *Journal of Clinical Periodontology.* 2018;45:S278-S85.
17. Heitz-Mayfield LJA, Salvi GE. Peri-implant mucositis. *Journal of Clinical Periodontology.* 2018;45:S237-S45.

18. Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *Journal of Periodontology*. 2018;89:S267-S90.
19. Kühl S, Zürcher S, Zitzmann NU, Filippi A, Payer M, Dagassan-Berndt D. Detection of peri-implant bone defects with different radiographic techniques - a human cadaver study. *Clin Oral Implants Res*. 2016;27(5):529-34.
20. Harris D, Horner K, Gröndahl K, Jacobs R, Helmrot E, Benic GI, et al. E.A.O. guidelines for the use of diagnostic imaging in implant dentistry 2011. A consensus workshop organized by the European Association for Osseointegration at the Medical University of Warsaw. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(11):1243-53.
21. Cortelli SC, Cortelli JR, Romeiro RL, et al. Frequency of periodontal pathogens in equivalent peri-implant and periodontal clinical statuses. *Arch Oral Biol*. 2013;58(1):67-74. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.09.004
22. Slots J. Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontol 2000*. 2017;75(1):7-23.
23. Susin C, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Tooth loss and associated risk indicators in an adult urban population from south Brazil. *Acta Odontol Scand*. 2005;63(2):85-93.
24. Lorentz TC, Cota LO, Cortelli JR, Vargas AM, Costa FO. Tooth loss in individuals under periodontal maintenance therapy: prospective study. *Braz Oral Res*. 2010;24(2):231-7.
25. Quirynen M, Vogels R, Pauwels M, Haffajee AD, Socransky SS, Uzel NG, et al. Initial subgingival colonization of 'pristine' pockets. *J Dent Res*. 2005;84(4):340-4.
26. Schou S, Holmstrup P, Worthington HV, Esposito M. Outcome of implant therapy in patients with previous tooth loss due to periodontitis. *Clinical Oral Implants Research*. 2006;17:104-23.
27. Safii SH, Palmer RM, Wilson RF. Risk of Implant Failure and Marginal Bone Loss in Subjects with a History of Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2010;12(3):165-74.
28. Fernandes CB, Aquino DR, Franco GC, Cortelli SC, Costa FO, Cortelli JR. Do elderly edentulous patients with a history of periodontitis harbor periodontal pathogens? *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(6):618-23.
29. Máximo MB, de Mendonça AC, Alves JF, Cortelli SC, Peruzzo DC, Duarte PM. Peri-implant diseases may be associated with increased time loading and generalized periodontal bone loss: preliminary results. *J Oral Implantol*. 2008;34(5):268-73.
30. 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. *Journal of Periodontology*. 2018;89:S173-S82.
31. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):1-6.
32. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification.
33. Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P, Cortellini P, et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*. 2018;89(S1):S237-S48.
34. Albandar JM, Susin C, Hughes FJ. Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol*. 2018;45 Suppl 20:S171-s89.

35. Herrera D, Retamal-Valdes B, Alonso B, Feres M. Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. *J Clin Periodontol.* 2018;45 Suppl 20:S78-s94.
36. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8 Suppl):286-91.
37. Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8 Suppl):282-5.
38. Ebenezer S, Kumar VV, Thor A. Basics of Dental Implantology for the Oral Surgeon. In: Bonanthaya K, Panneerselvam E, Manuel S, Kumar VV, Rai A, editors. *Oral and Maxillofacial Surgery for the Clinician.* Singapore: Springer Nature Singapore; 2021. p. 385-405.
39. Berglundh T, Abrahamsson I, Welander M, Lang NP, Lindhe J. Morphogenesis of the peri-implant mucosa: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18(1):1-8.
40. Albrektsson T, Sennerby L. State of the art in oral implants. *J Clin Periodontol.* 1991;18(6):474-81.
41. Derks J, Håkansson J, Wennström JL, Tomasi C, Larsson M, Berglundh T. Effectiveness of implant therapy analyzed in a Swedish population: early and late implant loss. *J Dent Res.* 2015;94(3 Suppl):44s-51s.
42. Araujo MG, Lindhe J. Peri-implant health. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S249-s56.
43. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res.* 1991;2(2):81-90.
44. Egelberg J. The blood vessels of the dento-gingival junction. *J Periodontal Res.* 1966;1(3):163-79.
45. Berglundh T, Lindhe J, Jonsson K, Ericsson I. The topography of the vascular systems in the periodontal and peri-implant tissues in the dog. *J Clin Periodontol.* 1994;21(3):189-93.
46. Tarnow DP, Magner AW, Fletcher P. The effect of the distance from the contact point to the crest of bone on the presence or absence of the interproximal dental papilla. *J Periodontol.* 1992;63(12):995-6.
47. Choquet V, Hermans M, Adriaenssens P, Daelemans P, Tarnow DP, Malevez C. Clinical and radiographic evaluation of the papilla level adjacent to single-tooth dental implants. A retrospective study in the maxillary anterior region. *J Periodontol.* 2001;72(10):1364-71.
48. Kan JY, Rungcharassaeng K, Umezu K, Kois JC. Dimensions of peri-implant mucosa: an evaluation of maxillary anterior single implants in humans. *J Periodontol.* 2003;74(4):557-62.
49. Gastaldo JF, Cury PR, Sendyk WR. Effect of the vertical and horizontal distances between adjacent implants and between a tooth and an implant on the incidence of interproximal papilla. *J Periodontol.* 2004;75(9):1242-6.
50. Ryser MR, Block MS, Mercante DE. Correlation of papilla to crestal bone levels around single tooth implants in immediate or delayed crown protocols. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(8):1184-95.
51. Wennström JL, Derks J. Is there a need for keratinized mucosa around implants to maintain health and tissue stability? *Clin Oral Implants Res.* 2012;23 Suppl 6:136-46.
52. Gobbato L, Avila-Ortiz G, Sohrabi K, Wang CW, Karimbux N. The effect of keratinized mucosa width on peri-implant health: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28(6):1536-45.
53. Thoma DS, Mühlemann S, Jung RE. Critical soft-tissue dimensions with dental implants and treatment concepts. *Periodontol 2000.* 2014;66(1):106-18.
54. Adibrad M, Shahabuei M, Sahabi M. Significance of the width of keratinized mucosa on the health status of the supporting tissue around implants supporting overdentures. *J Oral Implantol.* 2009;35(5):232-7.

55. Rocuzzo M, Grasso G, Dalmaso P. Keratinized mucosa around implants in partially edentulous posterior mandible: 10-year results of a prospective comparative study. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(4):491-6.
56. Abraham CM. A brief historical perspective on dental implants, their surface coatings and treatments. *Open Dent J.* 2014;8:50-5.
57. Lang NP, Berglundh T. Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2011;38 Suppl 11:178-81.
58. Jung RE, Herzog M, Wolleb K, Ramel CF, Thoma DS, Hämmerle CH. A randomized controlled clinical trial comparing small buccal dehiscence defects around dental implants treated with guided bone regeneration or left for spontaneous healing. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(3):348-54.
59. Schwarz F, Sahm N, Becker J. Impact of the outcome of guided bone regeneration in dehiscence-type defects on the long-term stability of peri-implant health: clinical observations at 4 years. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(2):191-6.
60. Benic GI, Hämmerle CH. Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. *Periodontol 2000.* 2014;66(1):13-40.
61. Thoma DS, Buranawat B, Hämmerle CH, Held U, Jung RE. Efficacy of soft tissue augmentation around dental implants and in partially edentulous areas: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2014;41 Suppl 15:S77-91.
62. Hämmerle CHF, Tarnow D. The etiology of hard- and soft-tissue deficiencies at dental implants: A narrative review. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S291-s303.
63. Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, et al. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol.* 2018;45 Suppl 20:S286-s91.
64. Bürgers R, Witocy C, Hahnel S, Gosau M. The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, and *Streptococcus sanguinis*. *Arch Oral Biol.* 2012;57(7):940-947. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.01.015
65. Belibasakis GN, Charalampakis G, Bostanci N, Stadlinger B. Peri-Implant Infections of Oral Biofilm Etiology. In: Donelli G, editor. *Biofilm-Based Healthcare-Associated Infections, Vol I. Advances in Experimental Medicine and Biology.* 8302015. p. 69-84.
66. Marrone A, Lasserre J, Bercy P, Brex MC. Prevalence and risk factors for peri-implant disease in Belgian adults. *Clinical Oral Implants Research.* 2013;24(8):934-40.
67. Božidar D. Klinička parodontologija. In: Vojislav Leković OZ, Ljiljana Janković, Ileana Ursu-Magdu, Saša Čakić, Dragoslav Đukanović, Saša Janković, Zoran Aleksić, editor. Prvo izdanje ed. Beograd: Zavod za udžbenike; 2011.
68. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol.* 2005;32 Suppl 6:7-15.
69. Schaudinn C, Gorur A, Keller D, Sedghizadeh PP, Costerton JW. Periodontitis: an archetypical biofilm disease. *J Am Dent Assoc.* 2009;140(8):978-86.
70. Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci.* 2006;19:29-64.
71. Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res.* 2012;91(12):1110-8.
72. Chawhuaveang DD, Yu OY, Yin IX, Lam WY, Mei ML, Chu CH. Acquired salivary pellicle and oral diseases: A literature review. *J Dent Sci.* 2021;16(1):523-9.
73. Okahashi N, Nakata M, Terao Y, Isoda R, Sakurai A, Sumitomo T, et al. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. *Microb Pathog.* 2011;50(3-4):148-54.

74. Seneviratne CJ, Zhang CF, Samaranayake LP. Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res.* 2011;14(2):87-94.
75. Zijngge V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One.* 2010;5(2):e9321.
76. Listgarten MA. Structure of surface coatings on teeth. A review. *J Periodontol.* 1976;47(3):139-47.
77. Ivanovski S, Lee R. Comparison of peri-implant and periodontal marginal soft tissues in health and disease. *Periodontol 2000.* 2018;76(1):116-30.
78. Listgarten MA, Lang NP, Schroeder HE, Schroeder A. Periodontal tissues and their counterparts around endosseous implants [corrected and republished with original paging, article originally printed in *Clin Oral Implants Res* 1991 Jan-Mar;2(1):1-19]. *Clin Oral Implants Res.* 1991;2(3):1-19.
79. Moon IS, Berglundh T, Abrahamsson I, Linder E, Lindhe J. The barrier between the keratinized mucosa and the dental implant. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 1999;26(10):658-63.
80. Weber HP, Cochran DL. The soft tissue response to osseointegrated dental implants. *J Prosthet Dent.* 1998;79(1):79-89.
81. Gargiulo AW, Wentz FM, Orban BJ. Dimensions and Relations of the Dentogingival Junction in Humans. *Journal of Periodontology.* 1961;32:261-7.
82. Capri D. Soft Tissue Management Around Dental Implants. *Practical Periodontal Plastic Surgery* 2006. p. 71-98.
83. Belibasakis GN. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Archives of Oral Biology.* 2014;59(1):66-72.
84. Belibasakis GN, Manoil D. Microbial Community-Driven Etiopathogenesis of Peri-Implantitis. *Journal of Dental Research.* 2021;100(1):21-8.
85. Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* 2001;292(5519):1115-8.
86. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature.* 2012;489(7415):231-41.
87. Lasserre JF, Brex MC, Toma S. Oral Microbes, Biofilms and Their Role in Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Materials.* 2018;11(10).
88. Wilson M. *Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease.* Cambridge: Cambridge University Press; 2004.
89. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology.* 1998;25(2):134-44.
90. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA, Strausbaugh LD, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *Isme j.* 2013;7(5):1016-25.
91. Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol.* 2003;30(7):644-54.
92. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721-32.
93. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000.* 2006;42:80-7.
94. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013;69(1):137-143. doi:10.1016/j.phrs.2012.11.006
95. Dewhirst F, Chen T, Izard J, Paster B, Tanner A, Yu W-H, et al. The Human Oral Microbiome. *Journal of bacteriology.* 2010;192:5002-17.
96. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(7):481-490. doi:10.1038/nrmicro2337

97. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002;28:12-55.
98. Robitaille N, Reed DN, Walters JD, Kumar PS. Periodontal and peri-implant diseases: identical or fraternal infections?. *Mol Oral Microbiol*. 2016;31(4):285-301. doi:10.1111/omi.12124
99. Marsh PD, Devine DA. How is the development of dental biofilms influenced by the host? *J Clin Periodontol*. 2011;38 Suppl 11:28-35.
100. Adriaens LM, Alessandri R, Spörri S, Lang NP, Persson GR. Does pregnancy have an impact on the subgingival microbiota? *J Periodontol*. 2009;80(1):72-81.
101. Lai JY. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 6th Edition. *Implant Dentistry*. 2017;26(6).
102. Landau S, Ster IC, editors. *Cluster Analysis: Overview* 2010.
103. Sang T, Ye Z, Fischer NG, Skoe EP, Echeverría C, Wu J, et al. Physical-chemical interactions between dental materials surface, salivary pellicle and *Streptococcus gordonii*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020;190:110938.
104. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(7):471-80.
105. Edgerton M, Lo SE, Scannapieco FA. Experimental salivary pellicles formed on titanium surfaces mediate adhesion of streptococci. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11(4):443-9.
106. Payne JB, Johnson PG, Kok CR, Gomes-Neto JC, Ramer-Tait AE, Schmid MJ, et al. Subgingival Microbiome Colonization and Cytokine Production during Early Dental Implant Healing. *mSphere*. 2017;2(6).
107. Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 2010;53:167-181. doi:10.1111/j.1600-0757.2010.00348.x
108. Charalampakis G, Belibasakis GN. Microbiome of peri-implant infections: Lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virulence*. 2015;6(3):183-7.
109. Gazil V, Bandiaky ON, Renard E, Idiri K, Struillou X, Soueidan A. Current Data on Oral Peri-Implant and Periodontal Microbiota and Its Pathological Changes: A Systematic Review. *Microorganisms* [Internet]. 2022; 10(12).
110. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Favari M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(10):975-982. doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01566.x111. Belibasakis GN, Mir-Mari J, Sahrman P, Sanz-Martin I, Schmidlin PR, Jung RE. Clinical association of *Spirochaetes* and *Synergistetes* with peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*. 2016;27(6):656-61.
112. Zheng H, Xu LX, Wang ZC, Li LS, Zhang JN, Zhang Q, et al. Subgingival microbiome in patients with healthy and ailing dental implants. *Scientific Reports*. 2015;5.
113. Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2014:783-93.
114. Sahrman P, Gilli F, Wiedemeier DB, Attin T, Schmidlin PR, Karygianni L. The Microbiome of Peri-Implantitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microorganisms*. 2020;8(5).
115. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2015;69(1):7-17. doi:10.1111/prd.12104
116. Slots J. Periodontal herpesviruses: prevalence, pathogenicity, systemic risk. *Periodontol* 2000. 2015;69(1):28-45. doi:10.1111/prd.12085

117. Al-Zawawi AS. Contribution of fungi and viruses towards the etiopathogenesis peri-implantitis: A literature review of currently available evidence. *Surgery in Practice and Science*. 2020;2:100017.
118. Akram Z, Al-Aali KA, Alrabiah M, et al. Current weight of evidence of viruses associated with peri-implantitis and peri-implant health: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2019;29(3):e2042. doi:10.1002/rmv.2042
119. Marques Filho JS, Gobara J Jr, da Silva Salomao GV, et al. Cytokine Levels and Human Herpesviruses in Saliva from Clinical Periodontal Healthy Subjects with Peri-Implantitis: A Case-Control Study. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:6020625. Published 2018 Aug 6. doi:10.1155/2018/6020625
120. Jankovic S, Aleksic Z, Dimitrijevic B, Lekovic V, Camargo P, Kenney B. Prevalence of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in subgingival plaque at peri-implantitis, mucositis and healthy sites. A pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011;40(3):271-276. doi:10.1016/j.ijom.2010.11.004
121. Binshabaib M, ALHarthi SS, Salehpoor D, Michelogiannakis D, Javed F. Contribution of herpesviruses in the progression of periodontal and peri-implant diseases in systemically healthy individuals. *Rev Med Virol*. 2018;28(5):e1996. doi:10.1002/rmv.1996
122. Listgarten MA. Microorganisms and dental implants. *J Periodontol*. 1999;70(2):220-222. doi:10.1902/jop.1999.70.2.220
123. Canabarro A, Valle C, Farias MR, Santos FB, Lazera M, Wanke B. Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis. *J Periodontol Res*. 2013;48(4):428-432. doi:10.1111/jre.12022
124. Montelongo-Jauregui D, Srinivasan A, Ramasubramanian AK, Lopez-Ribot JL. An In Vitro Model for *Candida albicans*-*Streptococcus gordonii* Biofilms on Titanium Surfaces. *J Fungi (Basel)*. 2018;4(2).
125. How KY, Song KP, Chan KG. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front Microbiol*. 2016;7:53.
126. SHAH HN, COLLINS MD. Proposal for Reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a New Genus, *Porphyromonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1988;38(1):128-31.
127. Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett*. 2012;333(1):1-9.
128. Bodet C, Chandad F, Grenier D. [Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis]. *Pathol Biol (Paris)*. 2007;55(3-4):154-62.
129. Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Progulsk-Fox A. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;187(2):139-44.
130. Baek KJ, Ji S, Kim YC, Choi Y. Association of the invasion ability of *Porphyromonas gingivalis* with the severity of periodontitis. *Virulence*. 2015;6(3):274-81.
131. Hajishengallis G, Lamont RJ. Breaking bad: manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Immunol*. 2014;44(2):328-38.
132. Broadley M, Schweon SJ. Get the facts about *Fusobacterium*. *Nursing2023*. 2017;47(5).
133. Dukka H, Saleh MHA, Ravidà A, Greenwell H, Wang HL. Is bleeding on probing a reliable clinical indicator of peri-implant diseases? *J Periodontol*. 2021;92(12):1669-74.
134. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(12):745-59.
135. Stokowa-Softys K, Wojtkowiak K, Jagiełło K. *Fusobacterium nucleatum* - Friend or foe? *J Inorg Biochem*. 2021;224:111586.



136. Thurnheer T, Karygianni L, Flury M, Belibasakis GN. Fusobacterium Species and Subspecies Differentially Affect the Composition and Architecture of Supra- and Subgingival Biofilms Models. *Front Microbiol.* 2019;10:1716.
137. Zhang Y, Shi W, Song Y, Wang J. Metatranscriptomic analysis of an in vitro biofilm model reveals strain-specific interactions among multiple bacterial species. *J Oral Microbiol.* 2019;11(1):1599670.
138. Dabija-Wolter G, Cimpan MR, Costea DE, Johannessen AC, Sørnes S, Neppelberg E, et al. Fusobacterium nucleatum enters normal human oral fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 2009;80(7):1174-83.
139. Fardini Y, Wang X, Témoin S, Nithianantham S, Lee D, Shoham M, et al. Fusobacterium nucleatum adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity. *Mol Microbiol.* 2011;82(6):1468-80.
140. Han YW. Fusobacterium nucleatum: a commensal-turned pathogen. *Current Opinion in Microbiology.* 2015;23:141-7.
141. Edwards AM, Grossman TJ, Rudney JD. Fusobacterium nucleatum transports noninvasive Streptococcus cristatus into human epithelial cells. *Infect Immun.* 2006;74(1):654-62.
142. De Andrade KQ, Almeida-da-Silva CLC, Ojcius DM, Coutinho-Silva R. Differential involvement of the canonical and noncanonical inflammasomes in the immune response against infection by the periodontal bacteria Porphyromonas gingivalis and Fusobacterium nucleatum. *Curr Res Microb Sci.* 2021;2:100023.
143. Jang JY, Baek KJ, Choi Y, Ji S. Relatively low invasive capacity of Porphyromonas gingivalis strains into human gingival fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol.* 2017;83:265-71.
144. Zhang Z, Liu S, Zhang S, Li Y, Shi X, Liu D, et al. Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles inhibit the invasion of Fusobacterium nucleatum into oral epithelial cells by downregulating FadA and FomA. *J Periodontol.* 2022;93(4):515-25.
145. Chen Y, Shi T, Li Y, Huang L, Yin D. Fusobacterium nucleatum: The Opportunistic Pathogen of Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Front Microbiol.* 2022;13:860149.
146. Knipe DM, Raja P, Lee JS. Clues to mechanisms of herpesviral latent infection and potential cures. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2015;112(39):11993-4.
147. Konstantinidis A, Sakellari D, Papa A, Antoniadis A. Real-time polymerase chain reaction quantification of Epstein-Barr virus in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 2005;40(4):294-8.
148. Slots J. Herpesviruses in periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2005;38:33-62.
149. Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Slots J. Periodontitis lesions are a source of salivary cytomegalovirus and Epstein-Barr virus. *J Periodontal Res.* 2005;40(2):187-91.
150. Contreras A, Umeda M, Chen C, Bakker I, Morrison JL, Slots J. Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *J Periodontol.* 1999;70(5):478-84.
151. Slots J, Kamma JJ, Sugar C. The herpesvirus-Porphyromonas gingivalis-periodontitis axis. *J Periodontal Res.* 2003;38(3):318-23.
152. Buck M, Cross S, Krauer K, Kienzle N, Sculley TB. A-type and B-type Epstein-Barr virus differ in their ability to spontaneously enter the lytic cycle. *J Gen Virol.* 1999;80 ( Pt 2):441-5.
153. Meyer-König U, Vogelberg C, Bongarts A, Kampa D, Delbrück R, Wolff-Vorbeck G, et al. Glycoprotein B genotype correlates with cell tropism in vivo of human cytomegalovirus infection. *J Med Virol.* 1998;55(1):75-81.
154. Wu YM, Yan J, Ojcius DM, Chen LL, Gu ZY, Pan JP. Correlation between infections with different genotypes of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in subgingival samples and periodontal status of patients. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3665-70.

155. Jankovic S, Aleksic Z, Dimitrijevic B, Lekovic V, Milinkovic I, Kenney B. Correlation between different genotypes of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus and peri-implant tissue status. *Aust Dent J.* 2011;56(4):382-8.
156. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.* 2010;6(1):e1000713.
157. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* 2005;13(12):589-95.
158. Bertolini M, Ranjan A, Thompson A, Diaz PI, Sobue T, Maas K, et al. *Candida albicans* induces mucosal bacterial dysbiosis that promotes invasive infection. *PLoS Pathog.* 2019;15(4):e1007717.
159. Santhana Krishnan G, Naik D, Uppoor A, Nayak S, Baliga S, Maddi A. Candidal carriage in saliva and subgingival plaque among smokers and non-smokers with chronic periodontitis-a cross-sectional study. *PeerJ.* 2020;8:e8441.
160. Sardi JC, Duque C, Höfling JF, Gonçalves RB. Genetic and phenotypic evaluation of *Candida albicans* strains isolated from subgingival biofilm of diabetic patients with chronic periodontitis. *Med Mycol.* 2012;50(5):467-75.
161. Alrabiah M, Alshagroud RS, Alsahhaf A, Almojaly SA, Abduljabbar T, Javed F. Presence of *Candida* species in the subgingival oral biofilm of patients with peri-implantitis. *Clinical Implant Dentistry and Related Research.* 2019;21(4):781-5.
162. Schwarz F, Becker K, Rahn S, Hegewald A, Pfeffer K, Henrich B. Real-time PCR analysis of fungal organisms and bacterial species at peri-implantitis sites. *International Journal of Implant Dentistry.* 2015;1(1):9.
163. Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H, Dwivedi P, Diaz P, Vasilakos J. Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. *PLoS One.* 2009;4(11):e7967.
164. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* 2011;10(2):112-22.
165. Buu LM, Chen YC. Impact of glucose levels on expression of hypha-associated secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *J Biomed Sci.* 2014;21(1):22.
166. Lu Y, Su C, Solis NV, Filler SG, Liu H. Synergistic regulation of hyphal elongation by hypoxia, CO<sub>2</sub>, and nutrient conditions controls the virulence of *Candida albicans*. *Cell Host Microbe.* 2013;14(5):499-509.
167. Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, Mogavero S, Tang SX, Wernecke J, et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection.
168. Naglik JR, Gaffen SL, Hube B. Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections. *Curr Opin Microbiol.* 2019;52:100-9.
169. Conti HR, Bruno VM, Childs EE, Daugherty S, Hunter JP, Mengesha BG, et al. IL-17 Receptor Signaling in Oral Epithelial Cells Is Critical for Protection against Oropharyngeal Candidiasis. *Cell Host & Microbe.* 2016;20(5):606-17.
170. Rodier M-H, El Moudni B, Kauffmann-Lacroix C, Daniault G, Jacquemin J-L. A *Candida albicans* metalloproteinase degrades constitutive proteins of extracellular matrix. *FEMS Microbiology Letters.* 1999;177(2):205-10.
171. Dupuy AK, David MS, Li L, Heider TN, Peterson JD, Montano EA, et al. Redefining the human oral mycobiome with improved practices in amplicon-based taxonomy: discovery of *Malassezia* as a prominent commensal. *PLoS One.* 2014;9(3):e90899.
172. Gökmenoglu C, Kara NB, Beldüz M, Kamburoğlu A, Tosun I, Sadik E, et al. Evaluation of *Candida Albicans* biofilm formation on various parts of implant material surfaces. *Niger J Clin Pract.* 2018;21(1):33-7.

173. Ata-Ali J, Flichy-Fernandez AJ, Alegre-Domingo T, Ata-Ali F, Palacio J, Penarrocha-Diago M. Clinical, microbiological, and immunological aspects of healthy versus peri-implantitis tissue in full arch reconstruction patients: a prospective cross-sectional study. *Bmc Oral Health*. 2015;15.
174. Chaplin DD. 1. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(2 Suppl Mini-Primer):S430-5.
175. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449(7164):819-26.
176. Weitzmann MN, Pacifici R. The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunol Rev*. 2005;208:154-68.
177. Boyce BF, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, et al. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med*. 2005;54(3):127-31.
178. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:495-521.
179. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand*. 2001;59(3):167-73.
180. Oliveira JA, de Oliveira Alves R, Nascimento IM, Hidalgo MAR, Scarel-Caminaga RM, Cristina Pigossi S. Pro- and anti-inflammatory cytokines and osteoclastogenesis-related factors in peri-implant diseases: systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health*. 2023;23(1):420.
181. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1990;25(3):156-63.
182. Offenbacher S, Odle BM, Van Dyke TE. The use of crevicular fluid prostaglandin E2 levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodontal Res*. 1986;21(2):101-12.
183. Kandaswamy E, Sakulpapong W, Guo X, Ni A, Powell HM, Tatakis DN, et al. Titanium as a Possible Modifier of Inflammation Around Dental Implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2022;37(2):381-90.
184. Wennström JL, Ekestubbe A, Gröndahl K, Karlsson S, Lindhe J. Oral rehabilitation with implant-supported fixed partial dentures in periodontitis-susceptible subjects. A 5-year prospective study. *J Clin Periodontol*. 2004;31(9):713-24.
185. Javed F, Al-Hezaimi K, Salameh Z, Almas K, Romanos GE. Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Cytokine*. 2011;53(1):8-12.
186. Severino VO, Napimoga MH, de Lima Pereira SA. Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-8 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Arch Oral Biol*. 2011;56(8):823-828. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.01.006
187. Mijailovic I, Nikolic N, Djinic A, Carkic J, Milinkovic I, Peric M, et al. The down-regulation of Notch 1 signaling contributes to the severity of bone loss in aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2020;91(4):554-61.
188. Severino VO, Beghini M, de Araújo MF, et al. Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-33 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Arch Oral Biol*. 2016;72:194-199. doi:10.1016/j.archoralbio.2016.08.021
189. Wajant H, Pfeffer K, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factors in 1998. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998;9(3-4):297-302.
190. Duarte PM, de Mendonça AC, Máximo MB, Santos VR, Bastos MF, Nociti Júnior FH. Differential cytokine expressions affect the severity of peri-implant disease. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(5):514-20.
191. Zhao B. TNF and Bone Remodeling. *Curr Osteoporos Rep*. 2017;15(3):126-134. doi:10.1007/s11914-017-0358-z

192. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;275(3):768-775. doi:10.1006/bbrc.2000.3379
193. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. Pillars Article: IL-10 Inhibits Cytokine Production by Activated Macrophages. *J. Immunol.* 1991. 147: 3815-3822. *J Immunol.* 2016;197(5):1539-46.
194. Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonemann G, Angel JB, et al. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J Immunol.* 1995;154(10):5492-9.
195. Casado PL, Canullo L, de Almeida Filardy A, Granjeiro JM, Barboza EP, Leite Duarte ME. Interleukins 1 $\beta$  and 10 expressions in the periimplant crevicular fluid from patients with untreated periimplant disease. *Implant Dent.* 2013;22(2):143-50.
196. Nowzari H, Botero JE, DeGiacomo M, Villacres MC, Rich SK. Microbiology and Cytokine Levels Around Healthy Dental Implants and Teeth. *Clinical Implant Dentistry and Related Research.* 2008;10(3):166-73.
197. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-42.
198. Dutzan N, Gamonal J, Silva A, Sanz M, Vernal R. Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) - 17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009;36(5):396-403.
199. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1569-76.
200. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(4):549-553. doi:10.1161/01.atv.0000012303.37971.da
201. Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2010;53:55-69.
202. Kadkhodazadeh M, Ebadian AR, Gholami GA, Khosravi A, Tabari ZA. Analysis of RANKL gene polymorphism (rs9533156 and rs2277438) in Iranian patients with chronic periodontitis and periimplantitis. *Arch Oral Biol.* 2013;58(5):530-6.
203. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.* 2006;12(1):17-25. doi:10.1016/j.molmed.2005.11.007
204. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011;17(10):1231-1234. Published 2011 Sep 11. doi:10.1038/nm.2452
205. Costa LC, Fonseca MAD, Pinheiro ADR, Aguiar T, Machado AN, Quinelato V, et al. Chronic Periodontitis and RANKL/OPG Ratio in Peri-Implant Mucosae Inflammation. *Braz Dent J.* 2018;29(1):14-22.
206. Rakic M, Struillou X, Petkovic-Curcin A, Matic S, Canullo L, Sanz M, et al. Estimation of bone loss biomarkers as a diagnostic tool for peri-implantitis. *J Periodontol.* 2014;85(11):1566-74.
207. Zanotti S, Canalis E. Notch Signaling and the Skeleton. *Endocr Rev.* 2016;37(3):223-53.
208. Canalis E. Notch in skeletal physiology and disease [published correction appears in *Osteoporos Int.* 2018 Oct 19;:]. *Osteoporos Int.* 2018;29(12):2611-2621. doi:10.1007/s00198-018-4694-3

209. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999;284(5415):770-6.
210. Lindsell CE, Boulter J, diSibio G, Gossler A, Weinmaster G. Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development. *Mol Cell Neurosci*. 1996;8(1):14-27.
211. Hori K, Sen A, Artavanis-Tsakonas S. Notch signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 10):2135-2140. doi:10.1242/jcs.127308
212. Osathanon T, Ritprajak P, Nowwarote N, Manokawinchoke J, Giachelli C, Pavasant P. Surface-bound orientated Jagged-1 enhances osteogenic differentiation of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(2):358-367. doi:10.1002/jbm.a.34332
213. Engin F, Yao Z, Yang T, et al. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat Med*. 2008;14(3):299-305. doi:10.1038/nm1712
214. Schoenbaum, Todd & Chang, Ting-Ling & Chung, Evelyn & Klokkevold, Perry. (2018). Newman and Carranza's Clinical Periodontology, 13th ed: Chapter 77: Prosthetic considerations for implant treatment.
216. Petković-Curcin A, Matić S, Vojvodić D, Stamatović N, Todorović T. Cytokines in pathogenesis of peri-implantitis. *Vojnosanit Pregl*. 2011;68(5):435-440. doi:10.2298/vsp1105435p
217. Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N, et al. Levels of Interferon-Gamma and Transcription Factor T-Bet in Progressive Periodontal Lesions in Patients With Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2009;80(2):290-6.
218. Milinkovic I, Krasavcevic AD, Nikolic N, Aleksic Z, Carkic J, Jezdic M, et al. Notch down-regulation and inflammatory cytokines and RANKL overexpression involvement in peri-implant mucositis and peri-implantitis: A cross-sectional study. *Clinical Oral Implants Research*. 2021;32(12):1496-505.
219. Quirynen M, Bollen CM, Vandekerckhove BN, Dekeyser C, Papaioannou W, Eysen H. Full- vs. partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: short-term clinical and microbiological observations. *J Dent Res*. 1995;74(8):1459-67.
220. Flanagan L, Schmid J, Ebert M, et al. *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(8):1381-1390. doi:10.1007/s10096-014-2081-3
221. Decat E, Cosyn J, De Bruyn H, Miremadi R, Saerens B, Van Mechelen E, et al. Optimization of quantitative polymerase chain reactions for detection and quantification of eight periodontal bacterial pathogens. *BMC Research Notes*. 2012;5(1):664.
222. Lafaurie GI, Sabogal MA, Castillo DM, Rincon MV, Gomez LA, Lesmes YA, et al. Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review. *Journal of Periodontology*. 2017;88(10):1066-89.
223. Albertini M, López-Cerero L, O'Sullivan MG, Chereguini CF, Ballesta S, Ríos V, et al. Assessment of periodontal and opportunistic flora in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(8):937-41.
224. Mombelli A, Müller N, Cionca N. The epidemiology of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23 Suppl 6:67-76.
225. Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI, et al. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response. *J Clin Periodontol*. 2009;36(5):406-10.
226. Ghensi P, Manghi P, Zolfo M, Armanini F, Pasolli E, Bolzan M, et al. Strong oral plaque microbiome signatures for dental implant diseases identified by strain-resolution metagenomics. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2020;6(1):47.

227. Ding Q, Tan KS. The Danger Signal Extracellular ATP Is an Inducer of *Fusobacterium nucleatum* Biofilm Dispersal. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2016;6.
228. Ebadian AR, Kadkhodazadeh M, Zarnegarnia P, Dahlén G. Bacterial analysis of peri-implantitis and chronic periodontitis in Iranian subjects. *Acta Med Iran*. 2012;50(7):486-92.
229. Korsch M, Marten SM, Stoll D, Prechtel C, Dötsch A. Microbiological findings in early and late implant loss: an observational clinical case-controlled study. *BMC Oral Health*. 2021;21(1):112.
230. Sanz-Martin I, Doolittle-Hall J, Teles RP, Patel M, Belibasakis GN, Hämmerle CHF, et al. Exploring the microbiome of healthy and diseased peri-implant sites using Illumina sequencing. *J Clin Periodontol*. 2017;44(12):1274-84.
231. Lafuente-Ibáñez de Mendoza I, Cayero-Garay A, Quindós-Andrés G, Aguirre-Urizar JM. A systematic review on the implication of *Candida* in peri-implantitis. *Int J Implant Dent*. 2021;7(1):73.
232. Kato A, Imai K, Sato H, Ogata Y. Prevalence of Epstein-Barr virus DNA and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese peri-implantitis patients. *Bmc Oral Health*. 2017;17.
233. Rotola A, Cassai E, Farina R, Caselli E, Gentili V, Lazzarotto T, et al. Human herpesvirus 7, Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in periodontal tissues of periodontally diseased and healthy subjects. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008;35(10):831-7.
234. Roca-Millan E, Domínguez-Mínger J, Schemel-Suárez M, Estrugo-Devesa A, Marí-Roig A, López-López J. Epstein-Barr Virus and Peri-Implantitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Viruses* [Internet]. 2021; 13(2).
235. Savage A, Eaton KA, Moles DR, Needleman I. A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 2009;36(6):458-67.
236. Kopan R, Ilagan MXG. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell*. 2009;137(2):216-33.
237. Nikolic N, Jakovljevic A, Carkic J, Beljic-Ivanovic K, Miletic M, Soldatovic I, et al. Notch Signaling Pathway in Apical Periodontitis: Correlation with Bone Resorption Regulators and Proinflammatory Cytokines. *Journal of Endodontics*. 2019;45(2):123-8.
238. Jakovljevic A, Miletic M, Nikolic N, Beljic-Ivanovic K, Andric M, Milasin J. Notch signaling pathway mediates alveolar bone resorption in apical periodontitis. *Medical Hypotheses*. 2019;124:87-90.
239. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000;118(2):503-8.
240. Faot F, Nascimento GG, Bielemann AM, Campão TD, Leite FR, Quirynen M. Can peri-implant crevicular fluid assist in the diagnosis of peri-implantitis? A systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2015;86(5):631-45.
241. Drafta S, Guita DM, Cristache CM, Beuran IA, Burlibasa M, Petre AE, et al. Could Pro-Inflammatory Cytokines Levels IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , Total Antioxidant Status and Lactate Dehydrogenase Be Associated with Peri-Implant Bone Loss? A Pilot Study. *Applied Sciences* [Internet]. 2021; 11(22).
242. Duarte PM, de Mendonça AC, Máximo MB, Santos VR, Bastos MF, Nociti FH. Effect of anti-infective mechanical therapy on clinical parameters and cytokine levels in human peri-implant diseases. *J Periodontol*. 2009;80(2):234-43.
243. Petković AB, Matic SM, Stamatović NV, Vojvodić DV, Todorović TM, Lazić ZR, et al. Proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) and chemokines (IL-8 and MIP-1 $\alpha$ ) as markers of peri-implant tissue condition. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39(5):478-85.

244. Gündoğar H, Uzunkaya M. The Effect of Periodontal and Peri-Implanter Health on IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  Levels in Gingival Crevicular and Peri-Implanter Sulcus Fluid: a Cross-Sectional Study. *Odovtos - International Journal of Dental Sciences*. 2020;23(1):168-77.
245. Abusleme L, Moutsopoulos NM. IL-17: overview and role in oral immunity and microbiome. *Oral Dis*. 2017;23(7):854-65.
246. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*. 2006;203(12):2673-82.
247. Konttinen YT, Lappalainen R, Laine P, Kitti U, Santavirta S, Teronen O. Immunohistochemical evaluation of inflammatory mediators in failing implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2006;26(2):135-41.
248. Tanaka K, Hashizume M, Mihara M, Yoshida H, Suzuki M, Matsumoto Y. Anti-interleukin-6 receptor antibody prevents systemic bone mass loss via reducing the number of osteoclast precursors in bone marrow in a collagen-induced arthritis model. *Clin Exp Immunol*. 2014;175(2):172-80.
249. Ghassib I, Chen Z, Zhu J, Wang HL. Use of IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and MMP-8 biomarkers to distinguish peri-implant diseases: A systematic review and meta-analysis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21(1):190-207.
250. Fernandes MH, Gomes PS. Bone Cells Dynamics during Peri-Implantitis: a Theoretical Analysis. *J Oral Maxillofac Res*. 2016;7(3):e6.
251. Corrêa MG, Pimentel SP, Ribeiro FV, Cirano FR, Casati MZ. Host response and peri-implantitis. *Braz Oral Res*. 2019;33(suppl 1):e066.
252. Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Kohara H, Yoshimatsu M, Takano-Yamamoto T. Immunological reaction in TNF- $\alpha$ -mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:181849.
253. Garlet GP. Destructive and Protective Roles of Cytokines in Periodontitis: A Re-appraisal from Host Defense and Tissue Destruction Viewpoints. *Journal of Dental Research*. 2010;89(12):1349-63.
254. Darabi E, Kadkhoda Z, Amirzargar A. Comparison of the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-17 in gingival crevicular fluid of patients with peri-implantitis and a control group with healthy implants. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2013;12(1):75-80.
255. Kurgan Ş, Kansal S, Nguyen D, Stephens D, Koroneos Y, Hasturk H, et al. Strain-Specific Impact of *Fusobacterium nucleatum* on Neutrophil Function. *J Periodontol*. 2017;88(4):380-9.
256. Tzach-Nahman R, Mizraji G, Shapira L, Nussbaum G, Wilensky A. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* induces peri-implantitis in a murine model: Evaluation of bone loss and the local inflammatory response. *J Clin Periodontol*. 2017;44(7):739-748. doi:10.1111/jcpe.12735
258. Maier MM, Gessler M. Comparative Analysis of the Human and Mouse Hey1 Promoter: Hey Genes Are New Notch Target Genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;275(2):652-60.

## **Biografski podaci o kandidatu**

Dr Marija Vučković, rođena Jezdić 28.09.1993. godine u Beogradu. Osnovnu školu i srednju Zubotehničku školu završila je u Beogradu. Diplomirala je 2018. godine na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, s prosečnom ocenom 8,76 (8,76/10,00). Tokom studija učestvovala je na tri kongresa studenata biomedicinskih nauka Srbije, dva puta kao autor radova i jednom kao koautor. Pripravnički staž završila je na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Stručni ispit za doktora stomatologije položila je 2019. godine, nakon čega je upisala specijalističke studije iz oblasti Kliničke stomatološke nauke, uža oblast: Parodontologija i oralna medicina. Specijalistički ispit iz oblasti Parodontologija i oralna medicina položila je 2022. godine na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu s odličnom ocenom. Doktorske studije upisala je 2019. godine na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu i položila sve ispite do sada predviđene planom i programom doktorskih studija s prosečnom ocenom 10,00 (10,00/10,00). Od oktobra 2022. godine, dr Marija Vučković je zaposlena na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta u Beogradu kao saradnik u visokom obrazovanju na predmetima: Osnovi parodontologije, Klinička parodontologija i Oralna medicina, a u julu 2023. postala je asistent na istim predmetima. Član je Udruženja parodontologa Srbije, kao i Evropske Asocijacije za oseointegraciju (EAO). Autor je jednog, a koautor u tri naučno-istraživačka rada objavljena u referentnim časopisima sa SCI liste. Dr Marija Vučković je do sada prezentovala jedan rad kao autor i 5 kao koautor u vidu postera na međunarodnim stručnim kongresima. Završila je sertifikovani bazični kurs iz implantologije u Implantološko-istraživačkom centru Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Марија Вучковић

Број индекса: 4011/2019

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Компаративна анализа остеоимунолошких и микробиолошких профила  
пери-имплантних стања и обољења

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

### Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Марија Вучковић

Број индекса: 4011/2019

Студијски програм: Докторске студије; Базична и клиничка истраживања у стоматологији

Наслов рада: Компаративна анализа остеоимунолошких и микробиолошких профила  
пери-имплантних стања и обољења

Ментор: Доц. др Ива Милинковић

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

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

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

Компаративна анализа остеоимунолошких и микробиолошких профила  
пери-имплантних стања и обољења

---

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_