

Univerzitet u Beogradu
Stomatološki fakultet

Mia M. Rakić

Određivanje biomarkera gubitka alveolarne
kosti kod pacijenata sa peri-implantitisom

Doktorska disertacija

Beograd, 2012

University of Belgrade
Faculty of Dental Medicine

Mia M. Rakić

Determination of alveolar bone loss
biomarkers related to peri-implantitis

Doctoral dissertation

Belgrade, 2012

Mentor: Profesor Dr Vojislav Leković

Članovi komisije:

Profesor Dr Zoran Aleksić

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Profesor Dr Saša Janković

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Profesor Dr Aleksa Marković

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Profesor Dr Tanja Jovanović

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Profesor Dr Mariano Sanz

Faculty of Odontology, University Complutense of Madrid (Spain)

Datum odbrane:

ZAHVALNOST

Profesoru Vojislavu Lekoviću koji me je pozvao i uveo u parodontologiju i u oralnu implantologiju, čoveku koji mi je otvorio mogućnosti i vidike na svim nivoima parodontologije i koji me je neprestano podržavao na moralnom, naučnom i kliničkom nivou dugujem neizmernu zahvalnost.

Profesoru Mariano Sanz koji je bio moj uzorni naučnik iz još iz doba početaka mog naučnog rada, osobi koja je posvetila neizmerni trud i pažnju da me nauči i usmeri ka najsavremenijim trendovima parodontologije i implantologije dugujem izrazitu zahvalnost.

Doktorci Nataši Nikolić-Jakoba, na početku mojoj asistentkinji, a danas mom vernom prijatelju, osobi koja me je učila osnovima parodontologije i koja je bila uz mene sve vreme mog naučnog i kliničkog razvoja, zahvaljujem na svemu i pre svega na stalnoj moralnoj podršci.

Profesoru Danilu Vojvodiću dugujem zahvalnost što me je uveo u imunologiju, i pre svega na svoj ljubavi i moralnoj podršci koju mi je stalno pružao.

Neizmernu zahvalnost iskazujem mojim dragim prijateljima sa Vojnomedicinske akademije koji su me uveli u istraživanje u implantologiji bez kojih ovaj doktorat ne bi bio moguć, zahvaljujem Aleksandri Petković-Ćurčin, Smiljki Matić i Zoranu Tatiću, a posebnu zahvalnost iskazujem profesoru Novaku Stamatoviću koji me je uveo u kliničku implantologiju i koji je bio moja velika moralna podrška.

Veliku zahvalnost iskazujem profesorima Zoranu Aleksiću i Saši Jankoviću, sa kojima sam napravila prve hirurške rezove i koji su strpljivo bili uz mene sve vreme mog rada, takođe veliku zahvalnost iskazujem kolektivu Klinike za parodontologiju i oralnu medicinu.

Zahvaljujem se svim članovima moje komisije na dragocenim sugestijama i trudu da unaprede ovaj istraživački rad.

Veliku zahvalnost iskazujem mojoj porodici, mom dedi koji me je brižljivo podržavao u celokupnom naučnom radu, i mojim roditeljima, mojoj majci i mom ocu na svoj ljubavi i podršci koju mi neprestano pružaju. Posebno se zahvaljujem Xavier osobi zahvaljujući čijoj ljubavi, strpljenju i podršci sam uspela da privedem kraju moj doktorat.

Određivanje biomarkera gubitka alveolarne kosti kod pacijenata sa peri-implantitisom

Rezime

Uvod. Peri-implantitis predstavlja inflamatorni proces koji se karakteriše gubitkom potporne kosti opterećenog oralnog implantata. Osnovna patološka karakteristika peri-implantitisa je gubitak potporne kosti implantata u funkciji. Ovaj proces je zasnovan na inflamatornoj osteoklastogenezi koja ujedno predstavlja centralni patološki proces peri-implantitisa. Inflamatorna osteoklastogeneza predstavlja proces sazrevanja pre-osteoklasta i pojačavanje aktivnosti zrelih osteoklasta pod uticajem kritičnih koncentracija pro-inflamatornih medijatora. Kliničke karakteristike peri-implantitisa nisu strogo definisane i variraju iz prostog razloga jer dubina peri-implantnog sulkusa značajno varira s'toga dubina džepa predstavlja individualnu determinantu. Istovremeno, proces gubitka marginalne kosti predstavlja fiziološku pojavu koja je najintezivnija u prvoj godini opterećenja, i istraživanja su pokazala da iznosi -0.78mm mezijalno i -0.85mm distalno, a zatim se kontinuirano odvija i na godišnjem nivou iznosi oko 0.2mm. Pomenuta vrednost iznosi prosečnu vrednost ali ona takođe individualno varira i uslovljena je tipom implantata, dizajnom abatmenta i mnogim drugim faktorima. Iz tog razloga se relativni nivo pripojnog epitela (rCAL) kao ni radiološki evidentan gubitak kosti ne mogu usvojiti kao apsolutni indikatori patološkog gubitka kosti. U dijagnostici stanja peri-implantnih tkiva koristi se nekoliko tipova metoda i najčešće u kombinaciji radi što potpunijeg postavljanja dijagnoze. Dijagnostičke metode uključuju: određivanje kliničkih parametara, radiološke analize, mikrobiološke analize i kvalitativne i kvantitativne analize peri-implantne krevikularne tečnosti (PICF). Analiza PICF predstavlja jednu od najatraktivnijih metoda u savremenoj implantologiji, pri čemu je njena najveća vrednost u tome što daje direktne informacije o stanju peri-implantnih tkiva i zasnovano na tome poseduje mogućnost da pokaže rane znake oboljenja peri-implantnih tkiva u fazi gde su tkivne promene reverzibilne. Ovo ograničenje kliničkih metoda rezultira u propuštanju vremena od momenta pojave bolesti koje proporcijonalno umanjuje uspeh terapije, a često i u izboru neadekvatnog terapijskog plana. Zasnovano na tome, metoda merenja specifičnih biomarkera u uzorku PICF nadomešćuje ograničenja konvencionalnih kliničkih dijagnostičkih metoda koje daju informacije u stadijumu razvijene bolesti. Brojne studije se sprovode u cilju identifikacije biomolekula koji pouzdano reflektuje stanje peri-implantnih tkiva, ali kako je patologija lokalnog meatbolizma kompleksna, a metoda evaluacije visoko-osetljiva,

standardizacija ove metode je još uvek u toku. *Cilj istraživanja* bio je da se ispita potencijal RANK-a, sRANKL-a, OPG-a, Katepsina-K, Sklerostina i VEGF-a kao biomarkera gubitka potporne kosti implantata. *Materijal i metode.* Studija je obuhvatila tri grupe sistemski zdravih nepušača sa ugrađenim endosealnim oralnim implantatima, opterećenih tokom najmanje godinu dana (35 sa peri-implantitisom, 30 sa peri-mukozitisom i 30 sa zdravim peri-implantnim tkivima). Kriterijum isključenja su bili: upotreba antibiotika u predhodna tri meseca i upotreba antiinflamatorika u predhodna dva meseca od trenutka uzorkovanja, menstrualni ciklus, trudnoća i laktacija, pušenje i tretiranost parodontalnih/peri-implantnih tkiva u poslednjih godinu dana. Klinička merenja su obavljena u 6 tačaka (buko-mezijalna, buko-medijalna, buko-distalna, oro-distalna, oro-medijalna i oro-mezijalna) i uključice određivanje: krvarenja na probu (BOP) odsustvo-0, prisustvo-1, 15 sekundi nakon sondiranja, indeks akumulacije plaka (PI) odsustvo-0, prisustvo-1 duž marginalne ivice, PD i rNPE graduisanom sondom (North Carolina–Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). U slučaju prisustva više peri-implantitisa ili peri-mukozitisa kod jednog pacijenta, zapaljenje sa većim defektom je bilo uključeno u studiju, a u slučaju sličnih karakteristika defekta u 6 tačaka, najdostupnije, odnosno anterijorno mesto je birano kao reprezentativno. Uzorak peri-implantne tečnosti sakupljan je sa mezijalne površine reprezentativnog implantata participanta studije. Uzorci su uzimani 24 časa nakon kliničkih merenja kako bi se izbegla kontaminacija uzorka krvlju, u grupama sa zapaljenjem sa mesta sa najvećom dubinom sondiranja, a u grupi zdravih peri-implantnih tkiva sa najdostupnijeg mesta. Uzorci PCF su uzimani sa reprezentativnog mesta metodom filter papira, a dobijeni volumen tečnosti iz tračica je određivan pomoću kalibrisanog aparata Periotron 6000 (Interstate Drug Exchange, Amityville, NY, USA). Komercijalni "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) kitovi su korišćeni za evaluaciju koštanih biomarkera u uzorku PICF: Human RANK/TNFRSF11A (DuoSet, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), ampli-sRANKL, OPG, cathepsin-K i sclerostin (Biomedica Gruppe, Vienna, Austria) i VEGF (Human VEGF ELISA Development Kit, Promokine, PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany). *Rezultati.* U svim analiziranim uzorcima PICF-a su dokazane koncentracije RANK-a, sRANKL-a, OPG-a, katepsina-K i VEGF-a iznad detekcionog limita, pri čemu je za sklerostin samo 6% uzoraka bilo pozitivno. Koncentracija RANK-a je bila značajno veća kod peri-implantitisa u odnosu na zdrava peri-implantna tkiva ($p=0.002$), takođe je bila veća i kod peri-mukozitisa u odnosu na zdrave implantate ($p=0.021$). Vrednosti sRANKL-a bile su značajno veće u grupi peri-implantitisa u odnosu na zdrava peri-implantna tkiva ($p=0.010$), ali ne i u odnosu na peri-mukozitise, kao ni između peri-mukozitisa i zdravih peri-implantnih tkiva, gde nije postignuta statistička

značajnost. Koncentracija OPG-a je bila značajno veća kod peri-implantitisa u odnosu na zdrava peri-implantna tkiva ($p=0.031$), i to je ujedno bila jedina značajnost za ovaj marker. Vrednosti katepsina-K su bile više na mestima zapaljenja, ali je jedina značajnost uočena između peri-mukozitisa i zdravih peri-implantnih tkiva ($p=0.039$). Sklerostin je dokazan u izuzetno malom broju uzoraka, ali su razlike bile upadljive pa su vrednosti bile značajno veće u grupi peri-implantitisa u odnosu na druge dve grupe. Koncentracija VEGF-a je bila značajno veća kod peri-implantitisa u odnosu na druge dve grupe, i grupu peri-mukozitisa ($p=0.014$) i zdravih peri-implantnih tkiva ($p=0.000$). RANK i sRANKL su pokazali značajno pozitivnu korelaciju sa svim merenim kliničkim parametrima, a OPG je pokazao takođe značajnu pozitivnu korelaciju sa gotovo svim merenim kliničkim parametrima, izuzev sa PI ($p=0.121$), a identičan slučaj je bio sa sklerostinom. VEGF nije pokazao nijednu značajnu korelaciju sa merenim kliničkim parametrima. *Zaključak.* RANK, sRANKL, OPG, sklerostin i VEGF su biomarkeri koji su udruženi sa peri-implantitisom. Katepsin-K predstavlja biomarker svosjtven peri-mukozitisu. Evaluirani biomarkeri su drugačije distribuirani u različitim regionima vilica i u PICF implantata različitih dijametara. RANK i OPG su značajno povišeni u frontalnom regionu maksile, što ujedno ukazuje na intezivnije osteolitičke procese u ovom regionu. RANK i katepsin-K su značajno povišeni u grupi implantata sa najvećim dijametrom, što na molekularnom nivou potvrđuje predhodne rezultate kliničkih studija da su dijametar implantata i gubitak implantata u pozitivnoj korelaciji.

Key words: peri-implantitis, peri-mukozitis, RANK, RANKL, OPG, katepsin-K, sklerostin, VEGF, biomarker, kost

Naučna oblast: Stomatologija

Uža naučna oblast: Parodontologija i implantologija

UDK broj: 616.314-089.843(043.3)

Determination of alveolar bone loss biomarkers related to peri-implantitis

Abstract.

Introduction. Peri-implantitis is inflammatory process characterized by supporting bone loss of loaded oral implants. The pathognomonic characteristic of peri-implantitis is supporting bone loss of the loaded implant. This process is based on inflammatory osteoclastogenesis which simultaneously represent the central pathologic process of the disorder. Inflammatory osteoclastogenesis implies maturation of pre-osteoclasts and enhancement of the activity of matured osteoclasts which are induced by achieving of the critical concentrations of pro-inflammatory mediators. Clinical characteristics of the peri-implantitis are still not strictly defined and they vary because in the physiological conditions the values of clinical parameters varies among individuals, for example peri-implant sulcus depth represents the individual determinant which could be from 0.5mm to 4mm as well. Simultaneously, the marginal bone loss is the physiological characteristic around implants in function, which is the most intensive in the first year of loading represented by the -0.78mm in the mesial sites and -0.85mm at the distal sites, and after that the process is constant and bone loss at the year level is approximately 0.2mm. The mentioned value is the average values that individually vary and it depends of the implant type, abutments and numerous other factors. From that reason the relative clinical attachment level (rCAL), nether radiological proof of bone loss could be accepted as the absolute indicators of the pathological bone loss. In the peri-implant diagnostics the most frequently are used the few different diagnostic procedures in the combination to give the complete diagnostic view. These diagnostic methods include: evaluation of clinical parameters, radiological analyses, microbiological analyses and quantitative and qualitative analyses of PICF. The PICF analysis is one of the most attractive methods in current implantology, where the one of the most precious values is providing of the direct information on peri-implant tissues d based on that providing information on early disease onset in the phase of reversible damage. This limitation of clinical methods results in time loss proportionally decreasing treatment success, and frequently resulting in inappropriate treatment planning. Based on that, evaluation of biomarkers in PICF sample compensates limitations of conventional diagnostic procedures without capability to provide accurate information on early disease. Numerous studies have been conducted to identify the biomolecules accurately reflecting peri-implant tissue condition, but since the pathology of local metabolism is complex, the method for evaluation is still under standardization.

Objective. The objective of the study was to investigate potential of RANK, sRANKL, OPG, Cathepsin-K, Sclerostin and VEGF as biomarkers of implant supporting bone loss. *Material and methods.* Study included three groups of systemically healthy non smokers with osseointegrated endosseal implants loaded for at least one year (35 with peri-implantitis, 30 with peri-mucositis and 30 with healthy peri-implant tissues). Exclusion criteria were the following: antibiotics usage in the preceding three months and anti-inflammatories in preceding two months from the moment of sampling, menstruation, pregnancy and lactation, smoking and periodontal/peri-implant treatment during last year. The following clinical measurements have been performed in 6 points (bucco-mesial, bucco -medial, bucco -distal, oro-distal, oro-medial and oro-mesial): Bleeding on Probing (BOP) measured 15 seconds after probing and recorded as presence (1) or absence (0), Visible plaque accumulation (PI) measured along the mucosal margin and recorded as presence (1) or absence (0), Probing Pocket Depths (PPD) in mm and Relative Clinical Attachment Level (rCAL) (expressed in mm) using a periodontal probe graded in mm (North Carolina–Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). In the case of few similar pathological processes in the same patient, the site representing the greatest defect was sampled, and in the case of defects showing similar clinical characteristics, the most accessible was included. PICF samples were collected from the mesial aspects of one representative implant site in each individual participating in the study. The specimens were retrieved 24 h after the clinical examination to avoid any contamination with blood, from both peri-implant and periodontal sites, selected from those demonstrating the deepest probing depth. The samples were retrieved using the filter paper technique, and obtained volume was evaluated using calibrated Periotron 6000 (Interstate Drug Exchange, Amityville, NY, USA). Commercial enzyme linked immunosorbent kits (ELISA) were used for evaluation of biomarkers in PICF samples: Human RANK/TNFRSF11A (DuoSet, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), ampli-sRANKL, OPG, cathepsin-K i sclerostin (Biomedica Gruppe, Vienna, Austria) i VEGF (Human VEGF ELISA Development Kit, Promokine, PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany). *Results.* In all tested PICF samples were detected RANK, sRANKL, OPG, cathepsin-K and VEGF, indicating the concentrations above detection limit, but only 6% of the samples were positive on sclerostin. RANK concentration was significantly higher in peri-implantitis when compared to healthy peri-implant tissues ($p=0.002$), and it was higher when compared to peri-mucositis as well ($p=0.021$). sRANKL values were significantly higher in peri-implantitis when compared to healthy peri-implant tissues ($p=0.010$), but not when compared to peri-mucositis, nether peri-mucositis an healthy peri-implant tissues. OPG concentration was significantly higher in peri-

implantitis when compared to healthy peri-implant tissues ($p=0.031$), and that was single significance obtained for this marker. sRANKL/OPG relative ratio did not show significant difference in distribution between investigated groups. Cathepsin-K were in general higher in inflamed sites, but the single significance was reached among peri-mucositis and healthy peri-implant tissues ($p=0.039$). Sclerostin was detected in small sample size, but the differences were clearly higher in peri-implantitis group when compared to both two groups. VEGF concentration was significantly higher in peri-implantitis when compared to healthy peri-implant tissues ($p=0.000$) and peri-mucositis as well ($p=0.014$). RANK and sRANKL showed significantly positive correlation with all measured clinical parameters, and OPG showed significantly positive correlation with all measured clinical parameters as well, with exception of PI ($p=0.121$), and an identical case was with sclerostin. VEGF showed no significant correlations with clinical parameters. *Conclusion.* RANK, sRANKL, OPG, sclerostin and VEGF are biomarkers related to peri-implantitis. Cathepsin-K was the marker related to peri-mucositis. Evaluated in this study are differently distributed in different jaws regions and in PICF samples of implants with different diameter. RANK and OPG were significantly elevated in frontal maxillary region, indicating more intensive osteolytic processes in this region. RANK and cathepsin-K were significantly increased in the group of implants with highest diameter, which supports on molecular level the previous results of clinical studies that showed positive correlation between implant diameter and implant loss.

Key words: peri-implantitis, peri-mucositis, RANK, RANKL, OPG, cathepsin-K, sclerostin, VEGF, biomarker, bone

Scientific field: Dentistry

Scientific field specialized: Periodontology and Implantology

UDC number: 616.314-089.843(043.3)

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Definicija i prevalencija peri-implantnih bolesti.....	1
1.2. Histologija peri-implantnih tkiva i mehanizam oseintegracije.....	1
1.3. Patogeneza peri-implantitisa.....	6
1.4. Kliničke karakteristike peri-implantitisa i dijagnostičke metode za praćenje stanja peri-implantnih tkiva.....	9
1.5. Biomarkeri u evaluaciji stanja peri-implantnih tkiva:karakteristike, zahtevi i prednosti u odnosu na druge dijagnostičke metode.....	11
1.5.1. Karakteristike koštanog tkiva i njegovog metabolizma.....	12
1.5.2. Biomarkeri gubitka kosti.....	14
1.5.3. Koncept određivanja biomarkera gubitka kosti u peri-implantitisu.....	19
2. CILJ RADA.....	21
3. MATERIJAL I METODE.....	22
3.1. Eksperimentalne grupe i kriterijumi uključenja i isključenja.....	22
3.2. Klinička merenja.....	22
3.3. Uzorkovanje peri-implantne krevikularne tečnosti (PICF).....	24
3.4. Evaluacija biomarkera u uzorku PICF.....	25
3.5. Statistička analiza podataka.....	27
4. REZULTATI.....	28
4.1. Demografske i deskriptivne karakteristike podataka ispitivanih grupa	28
4.2. Distribucija koncentracija biomarkera između grupa.....	30
4.3. Korelacija merenih biomarkera sa kliničkim parametrima.....	32
4.4. Međusobna korelacija merenih biomarkera.....	32
4.5. Distribucija vrednosti biomarkera u različitim regionima vilica	33
4.6. Distribucija vrednosti biomarkera oko implantata različitih dijametara	36

5. DISKUSIJA.....	38
5.1. Glavne opservacije.....	38
5.2. Profil evaluiranih biomarkera u različitim stanjima peri-implantnih tkiva.....	38
5.3. Profil evaluiranih biomarkera u različitim regionima vilica i oko različitih dijametara implantata.....	47
5.4. Smernice za dalje istraživanje.....	48
6. ZAKLJUČAK.....	52
7. LITERATURA.....	53

1. UVOD

1.1. Definicija i prevalencija peri-implantnih bolesti

Peri-implantne bolesti podrazumevaju inflamatorne procese koji zahvataju potporna tkiva oseointegriranog oralnog implantata (Albrektsson & Isidor 1994). U zavisnosti od zahvaćenosti tkiva inflamatornim procesom, peri-implantne bolesti se dele na peri-mukozitise i peri-implantitise (Lindhe & Meyle 2008). Peri-mukozitis se karakteriše inflamatornim procesom ograničenim na meka tkiva što ga razlikuje od sledećeg razvojnog stadijuma zapaljenja-peri-implantitisa, gde je proces proširen na potporna kost opterećenog implantata (Mombelli & Lang 2008, Zitzmann & Berglundh 2008). Peri-mukozitis i peri-implantitis predstavljaju patogenetske duplikate gingivitisa i parodontopatije (Heitz-Mayfield & Lang 2010), shodno tome se glavnim etiološkim faktorom smatra infekcija parodontopatogenim bakterijama koja dovodi do stimulacije ekcesivnog imunološkog odgovora rezultujujući peri-implantnim lezijama (Berglundh i sar. 1992, Ericsson i sar. 1992, Lang i sar. 1992, Lindhe i sar. 1992, Pontoriero i sar. 1994, Heitz-Mayfield 2008, Shibli i sar. 2008). Ova patogenetska sličnost upravo čini parodontopatiju faktorom rizika za razvoj peri-implantnih bolesti (Sumida i sar. 2002, Aoki i sar. 2009, Renvert & Persson 2009).

Brojne studije su sprovedene sa ciljem utvrđivanja prevalencije peri-implantnih bolesti, ali iz razloga nehomogenosti primenjenih eksperimentalnih protokola vrlo je teško izvesti potpunu analizu dostupnih rezultata. Najpotpuniju analizu prevalence objavili su Zitzmann i Berglundh (Zitzmann & Berglundh 2008) gde je prevalencija peri-mukozitisa iznosila oko 80% na nivou broja pacijenata i 50% na nivou broja zahvaćenih implantata. Prevalencija peri-implantitisa je iznosila 28% i 56% na nivou broja pacijenata i 12% i 43% na nivou broja zahvaćenih implantata.

1.2. Histologija peri-implantnih tkiva i mehanizam oseointegracije

Peri-implantna tkiva se strukturno razlikuju od parodontalnih tkiva, u prvom redu, peri-implantna tkiva ne sadrže cement i periodoncijum koji se gube tokom ekstrakcije

zuba, osim toga, kvalitativni i kvantitativni sastav peri-implantnih tkiva je drugačiji u odnosu na odgovarajuća parodontalna tkiva. Odsustvo periodoncijuma i cementa diktira drugačije biološke karakteristike peri-implantnog tkiva, među kojima su najznačajnije smanjena barijerna sposobnost mekih tkiva, zasnovana na značajno redukovanom broju i odsustvu pojedinih vlakana (pre svega kosih) koja se kopne u cementu zuba (Berglundh i sar. 1991). Ova vlakna su važna jer imaju najveći zaštitni potencijala u čuvanju dubljih parodontalnih tkiva od prodora infekcije, a sa druge strane ovakva histološka varijacija daje peri-implantnim tkivima smanjenu moć amortizacije okluzalnih sila i time veću podložnost traumi.

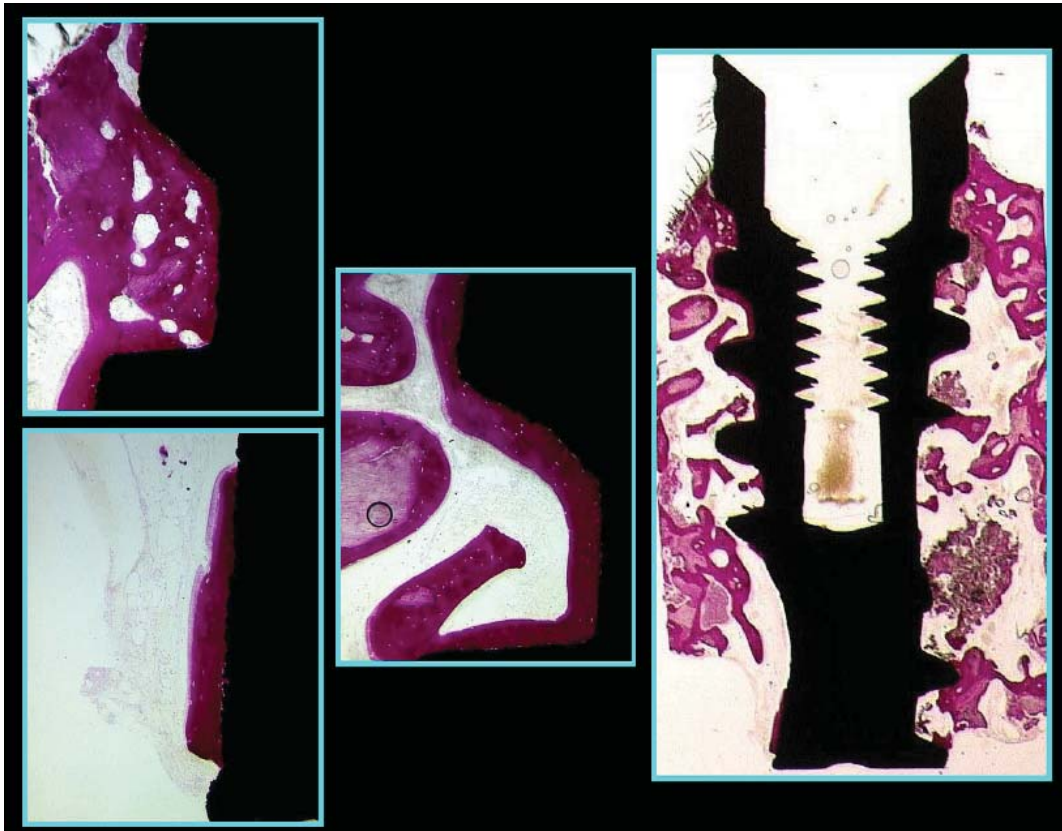
Peri-implantna mukoza odgovara mekim tkivima koja okružuju ugrađeni oralni implantat. Peri-implantna mukoza se formira tokom procesa zarastanja nakon reponiranja mukoperiostalnog režnja kada se primenjuje jednofazna metoda, ili nakon plasiranja abatmenta kada se primenjuje dvofazna metoda ugradnje implantata. Proces zarastanja rezultira u formiranjem meko tkivnog pripoja označenog kao transmukozni pripoj. Transmukozni pripoj predstavlja „lepak“ između mekih tkiva i supra-krestalne površine oralnog implantata i abatmenta, i na taj način učestvuje u zaštiti integriteta dubljih peri-implantnih tkiva.

Pripojni i barijerni epitel peri-implantne mukoze se formiraju nekoliko nedelja nakon hirurške intervencije (1-2 nedelje) i prosečne su dužine oko 2mm. Oba epitela su pripojena za površinu implantata sistemom hemi-dezmozoma (Gould i sar. 1984).

Zona supra-alveolarnog vezivnog tkiva iznosi 1-1.5mm u visinu, pri čemu se kvalitativni sastav peri-implantnog veziva razlikuje u odnosu na parodontalno vezivno tkivo. Peri-implantno vezivo u supra-krestalnoj zoni se karakteriše većim brojem kolagenih vlakana koja potiču iz periosta i paralelno su orijentisana sa površinom implantata, i manjim brojem fibroblasta i krvnih sudova, a u zoni uz implantat prisutno je manje vlakana i krvnih sudova, ali veći broj fibroblasta (Moon i sar. 1999).

Potporna kost implantata predstavlja bezubi greben vilice u koji se ugrađeni oralni implantat sidri mehanizmom oseointegracije. Bezubi greben čine kortikalne lamele koje obuhvataju lamelarnu kost i spongiozu, a koštana srž ovog regiona se karakteriše velikim brojem krvnih sudova, i sadrži adipocite i mezenhimalne pluripotentne ćelije. *Oseointegracija* se definiše kao „funkcionalna ankiloza“ (Branemark i sar. 1969, Shroeder i sar. 1976) čime se ističe odsustvo periodoncijuma kao amortizera okluzalnih

sila, ali se takođe ističe dinamičnost ovog sistema u smislu konstantnih metaboličkih i morfoloških promena koje se dešavaju na nivou grebena u koji je integrisan implantat, preciznije, kontaktne kosti na površini implantata, čime se obezbeđuje funkcionalnost implantata.



Slika 1. Histološki prikaz oseointegriranog titanijumskog implantata

U odnosu na tip procesa, proces oseintegracije prolazi kroz dve faze, gde prva faza podrazumeva primarno oseintegrisanje implantata, a druga faza podrazumeva adaptiranje tkiva na optrećenje okluzalnim silama. Proces implantacije podrazumeva niz tkivnih povreda počevši od incizije, odizanja mukoperiostalnog režnja, preparacije kanala i pozicioniranja samog implantata. Sledstveno tome, proces oseintegracije prolazi kroz faze procesa zarastanja rana, uključujući zapaljensku reakciju u cilju eliminisanja oštećenog tkiva i kombinovani proces regeneracije i reparacije. Nakon same implantacije kontaktna kost i površina implantata su u bliskom kontaktu i dolazi do formiranja koagulumu, koji se tokom prve nedelje organizuje i već nakon četvrtog

dana je delimično zamenjen, a zatim dolazi do angiogeneze i formiranja granulacionog tkiva u koje urastaju krvni sudovi (Berglundh i sar. 2003). Dalje, četvrtog dana dolazi do migracije fibroblastima-sličnih ćelija, da bi na kraju prve nedelje bila formirana mlada vlaknasta kost prožeta brojnim kolagenim vlaknima i bogata krvnim sudovima. Kontaktna kost koja je zadužena za stabilnost implantata po samoj implantaciji je prisutna tokom prve četiri nedelje, nakon čega podleže resorpciji pri čemu novostvorena spongiozna kost preuzima ulogu u stabilizaciji (Schenk 1994).

Sam proces je po prirodi složen i osetljiv na niz faktora, odnosno bilo koja varijacija tokom samog procesa može afektirati njegov ishod i kvalitet.

Najosetljiviji proces u nizu je proces diferencijacije osteoblasta iz mezenhimalnih progenitornih ćelija, jer fibroblasti, kao i epitel imaju mnogo viši i zahvalniji potencijal diferencijacije u odnosu na koštano tkivo. Tokom procesa implantacije ukoliko temperatura prevaziđe 47°C, dolazi do denaturacije alkalne fosfataze, glavnog enzima koštanih ćelija čime se ustupa prostor fibroznom tkivu.

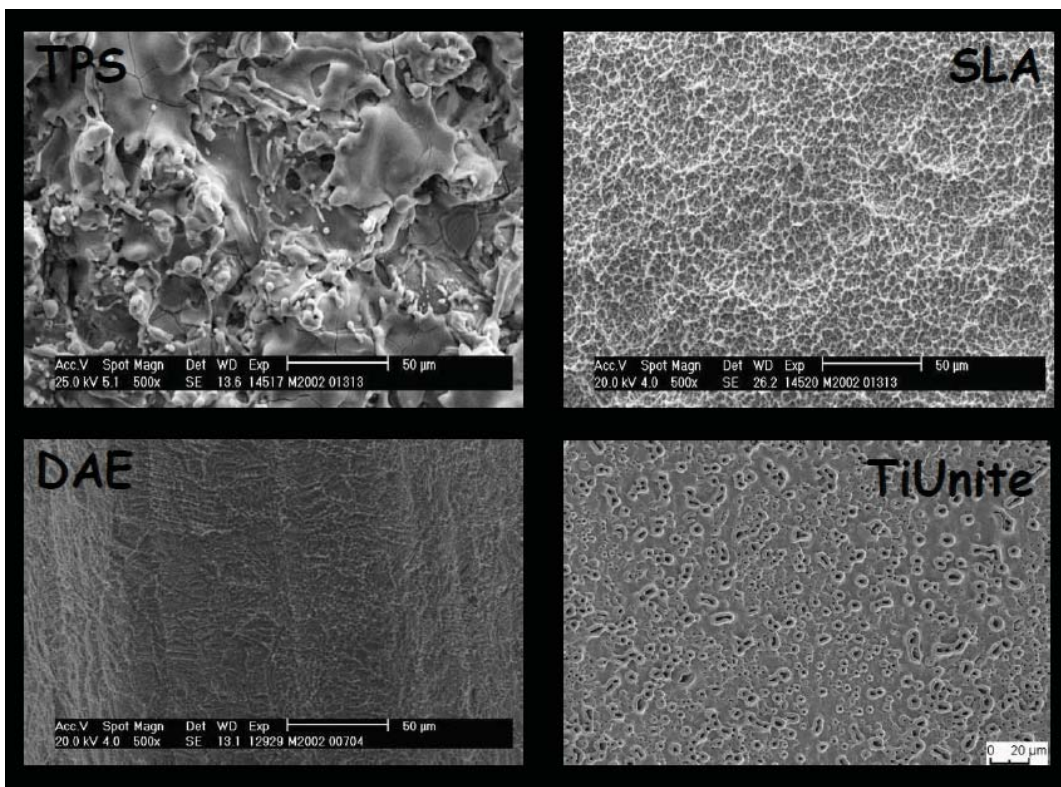
Dalje tokom zarastanja, ukoliko sile opterećenja implantata prevaziđu 150µm, to stimuliše takođe diferencijaciju fibroblasta umesto osteoblasta sa posledičnim fibroznom zarastanjem. Jedan od najvažnijih faktora diferencijacije preosteoklasta je lokalni redoks potencijal, i ukoliko lokalno tkivo nije dovoljno oksigenisano, dolazi do diferencijacije fibroblasta umesto osteoblasta i do srazmerno povećane aktivnosti osteoklasta koji uklanjaju nekrotično tkivo i imaju sposobnost ukljanjanja čak 5-100µm kosti dnevno.

Do toga najčešće dolazi usled velikog polja nekroze uzrokovanog velikom traumom ili kompresijom tkiva tokom i nakon implantacije. U kontekstu ovog mehanizma, jedan od najznačajnijih kliničkih faktora predstavlja dijametar implantata, koji srazmerno utiče na lokalnu kompresiju sa posledičnim kompromitovanjem ishrane kosti.

Još jedan, možda i najznačajniji faktor koji takođe po principu menjanja lokalnog regenerativnog potencijala i metabolizma tkiva afektira oseointegraciju je infekcija. Iz tog razloga kontrola parodontalne infekcije predstavlja jedan od najznačajnijih preduslova za ulazak u intervenciju postavljanja oralnog implantata.

Jedan od najvećih trendova u savremenoj implantologiji predstavlja mikrodizajn površine implantata i njegova modifikacija. Implantne površine su definisane i kao ključni element u reakciji čvrstog i mekog peri-implantnog tkiva sa implantatom (Newman i sar. 2007). Osnovni cilj modifikacije površine implantata je menjanje

njegove prijemčivosti koštanom tkivu, odnosno njegove oseokonduktivnosti. To se postiže putem dva tipa procesa: aditivnim procesima (oblaganje hidroksi-apatitom, TiO₂ i fluorizacija) i subtraktivne procese (mašinska obrada, nagrivanje kiselinom i peskiranje), i u odnosu na zastupljeni ti postoje različiti tipovi implantnih površina (slika 2).



Slika 2. Različite površine implantata.

Kako implantna površina deluje na povećanje osteoinduktivnosti, ona neminovno afektira proces oseointegracije, samim tim različite implantne površine indukuju drugačiji obrazac koštanog metabolizma (Vlacic-Zischke i sar. 2011), i time predstavljaju značajan faktor oseointegracije.

Uzimajući u obzir sve ove činjenice, sam proces formiranja peri-implantnih tkiva je osetljiv i zavisi od niza faktora.

1.3. Patogeneza peri-implantitisa

Osnovna patološka karakteristika peri-implantitisa je gubitak potporne kosti implantata u funkciji. Ovaj proces je zasnovan na inflamatornoj osteoklastogenezi koja ujedno predstavlja centralni patološki proces peri-implantitisa. Inflamatorna osteoklastogeneza predstavlja proces sazrevanja pre-osteoklasta i pojačavanje aktivnosti zrelih osteoklasta pod uticajem kritičnih koncentracija pro-inflamatornih medijatora. Glavna regulatorna trijada ovog procesa je sistem receptora aktivatora nuklearnog faktora kapa b (RANK), njegovog liganda (RANKL) i osteoprotežerina (OPG), antagoniste RANKL-a (Suda i sar. 1999, Liu i sar. 2010).

Tokom predhodnih godina utvrđeno je izrazito preplitanje imunoloških procesa i procesa koštanog metabolizma, čak i same ćelije koštanog tkiva-osteoklasti nastaju fuzionisanjem monocita (Liu i sar. 2010), pa je iz tog razloga nastala sub-disciplina koja se bavi oseoimunologijom. U kontekstu hronične inflamacije uzrokovane parodontalnom i peri-implantnom infekcijom, ovaj koncept zauzima poseban značaj. Mikroflora peri-implantnih lezija uključuje i najagresivnije parodontopatogene, među kojima se ističu *Porphyromonas gingivalis* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Van Winkelhoff i sar. 2000, Persson i sar. 2006, Renvert i sar. 2007, Shibli i sar. 2008). Kako ovi mikroorganizmi potiču od susjednih ili ekstrahovanih zuba, brojne studije su sprovedene u cilju utvrđivanja stepena rizika za razvoj peri-implantitisa kod pacijenata sa parodontopatijom. Studije su pokazale da pacijenti sa hroničnom parodontopatijom imaju isti terapijski ishod kao parodontološki zdravi pacijenti, ali da pacijenti sa agresivnom parodontopatijom imaju više peri-implantne patologije, veći gubitak marginalne kosti i manji stopu uspeha implantata (De Boever i sar. 2009). Imunohistohemijska analiza peri-implantnih lezija je takođe pokazala da po svojoj konstituciji one odgovaraju lezijama agresivne parodontopatije (Gualini i Berglundh 2003). Agresivnost pomenutih mikroorganizama se ogleda u njihovoj sposobnosti da zaobilaženjem fagocitoze kao najmanje štetnog oblika imunološkog odgovora zasnovano na morfološkim karakteristikama svojih prokariotskih receptora (Hajishengallis i sar. 2004, Koide i sar. 2010) i na agresivnim enzimima (Imamura 2003, Kadowaki i sar. 2007) kojima direktno oštećuju delovanje imuniteta stimulišući intezivan odgovor specifične imunosti (Graves i Cochran 2003, Graves 2008). Ovi mikrororganizmi se

odlikuju morfološkom i genetskom rezistencijom, kao i specifičnim mehanizmima „skrivanja“ u tkivu, gde sve zajedno doprinosi kontinuiranoj infekciji koja rezultuje u dostizanju i održavanju visokih koncentracija pro-inflamatornih medijatora (Garlet i sar. 2006, Graves 2008) što za posledicu daje ekcesivan imunološki odgovor. Imunološki odgovor postaje ekcesivan jer se kontinuirano intezivira iz razloga nemogućnosti eliminacije infekcije i to rezultira oštećenjem tkiva direktnim mehanizmima, dejstvom slobodnih radikala i indirektnim mehanizmima, stimulacijom litičkih na račun procesa formacije. U pogledu inflamatorne osteoklastogeneze, dostizanje kritičnih koncentracija pro-inflamatornih medijatora predstavlja signal za diferencijaciju osteoklasta i za pojačavanje njihove aktivnosti i time centralni momenat za aktivaciju osteoklastogeneze. Mehanizam kojim se ovo postiže jeste povećanje ekspresije RANKL-a na membranama ćelija kao odgovor na stimulaciju faktorima virulencije parodontopatogena, u prvom redu citoletalnog toksina distenzije poreklom iz *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-a i gingipeinima poreklom iz *Porphyromonas gingivalis*-a (Hasegawa i sar. 2002, Belibasakis i sar. 2005, Yamamoto i sar. 2006, Belibasakis i sar. 2007,). Povećana ekspresija RANKL-a dovodi do povećanja RANK-RANKL interakcija. Paralelno, stimulacija lipopolisaharidom (LPS) dovodi do direktne aktivacije RANK-a principom auto-ligacije (Kanazawa et al. 2005, Otero et al. 2010), gde kao krajnji ishod aktivacije RANK-a ligandom ili ligand-nezavisnim putem dolazi do proporcionalno intezivnog aktiviranja nuklearnog faktora kappa B (NF-kB).

NF-kB predstavlja centralni transkripcioni faktor u regulaciji biosinteze pro-inflamatornih citokina, osim toga on je regulator sinteze i brojnih drugih bioproteina involviranih u imunološki odgovor kao što su glavni kompleks tkivne kompatibilnosti, molekuli ćelijske adhezije (vaskularnih i inflamatornih ćelija, kao i endotelni selektin-E-selektin), faktore rasta i među njima faktor stimulacije kolonija granulocita i monocita (GM-CSF) i faktor rasta poreklom iz trombocita, i drugi. (Nicols i sar. 2001). Shodno tome, kao posledica velikog broja RANK-RANKL interakcija dolazi do produkcije velike količine pro-inflamatornih medijatora što predstavlja signal za diferencijaciju osteoklasta (Cochran 2008), ali to istovremeno predstavlja drugi tip signala za auto-ligaciju RANK-a (Kanazawa et al. 2005, Otero et al. 2010) čime se proces dalje intezivira. Kako je stimulacija LPS konstantna iz razloga nemogućnosti

eliminacije parodontopatogena, dalja stimulacija se paralelno nastavlja i proces dobija konfiguraciju „začaranog kruga“.

Na nivou peri-implantnih tkiva postoje dodatni faktori koji afektiraju RANK/RANKL/OPG sistem u poređenju sa prirodnom denticijom. Istraživanja su pokazala da ekcesivne sile, odnosno trauma afektiraju ovaj sistem (Kusumi i sar. 2005, Nakao i sar. 2007, Nozaki i sar. 2010). Uzimajući u obzir ankilotičnu vezu implantata za kosti i time veću osetljivost na dejstvu sila, i ekcesivne biomehaničke sile kao etiološki faktor peri-implantitisa, ovaj patogenetski mehanizam se može smatrati od značaja.

Sa druge strane površine oralnog implantata, njihov fizički i hemijski sastav značajno utiču na lokalni metabolizam peri-implantnih tkiva i smatraju se ključnim elementom reakcije između implantata i tkiva (Newman i sar. 2007). Titanijum je opšte usvojen kao visoko bio-kompatibilni materijal čime se često potpuno zanemaruje njegoa karakteristika visoko reaktivnog metala koji se u toku nanosekunde oksiduje na vazduhu, formirajući pasivni površinski sloj definisan kao keramici-sličan, što ga, zapravo čini biokompatibilnim. Međutim, ovaj sloj se tokom vremena menja pod uticajem faktora sredine što je posebno izraženo u uslovima kontinuirane ekspaniranosti biolikvidima u oralnoj regiji. Takođe, površine implantata se namenski menjaju u procesu proizvodnje različitim aditivnim i subtraktivnim procesima u cilju povećanja prijemčivosti koštanom tkivu odnosno oseokonduktivnosti. Istraživanja su pokazala da različite površine izazivaju drugačiji odgovor tkiva mereno na nivou RANKL/OPG sistema (Guida i sar. 2010, Mamalis i sar. 2011). Dodatno, imunohostohemijski je pokazano da karakteristike površine implantata afektiraju progresiju peri-implantitisa (Albouy i sar. 2012). Faktor koji se nadovezuje na uticaj površina jeste faktor nivoa regenerativnog potencijala tkiva implantacije, naime najčešći uzrok gubitka zuba kod odraslih je parodontopatija koja obara lokalni regenerativni potencijal tkiva otvarajući mogućnost da se proces zarastanja koji se intezivira modifikacijom površine implantata u jednom trenutku preokrene u reparaciju ili destruktivnu inflamaciju.

Svi ovi faktori doprinose intezivnom i drugačijem odgovoru peri-implantnih tkiva u odnosu na parodontalna tkiva. Nowzari sa saradnicima je pokazao da je koncentracija pro-inflamatornih značajno veća u peri-implantnom fluidu (PICF) zdravih peri-implantnih tkiva u odnosu na gingivalnu krevikularnu tečnost (GCF) parodontološki

zdravih zuba (Nowzari i sar. 2010). Prilikom imunohistohemijske analize peri-implantnih lezija, one su usvojene kao agresivne lezije (Gualini i Berglundh 2003), a Berglundh sa saradnicima je pokazao da uprkos kliničkim i etiopatogenetskim sličnostima peri-implantitisa i parodontopatije, njihove histopatološke karakteristike se kritično razlikuju (Berglundh i sar. 2011).

1.4. Kliničke karakteristike peri-implantitisa i dijagnostičke metode za praćenje stanja peri-implantnih tkiva

Kliničke karakteristike peri-implantitisa nisu strogo definisane i variraju iz prostog razloga jer dubina peri-implantnog sulkusa značajno varira stoga dubina džepa predstavlja individualnu determinantu. Istovremeno, proces gubitka marginalne kosti predstavlja fiziološku pojavu koja je najintezivnija u prvoj godini opterećenja, i istraživanja su pokazala da iznosi -0.78mm mezijalno i -0.85mm distalno (Bragger 1994), a zatim se kontinuirano odvija i na godišnjem nivou iznosi oko 0.2mm. Pomenuta vrednost iznosi prosečnu vrednost ali ona takođe individualno varira i uslovljena je tipom implantata, dizajnom abatmenta (Hammerle i sar. 1996, Jung i sar. 1996, Malavez i sar. 1996) i mnogim drugim faktorima. Iz tog razloga se relativni nivo pripojnog epitela (rCAL) kao ni radiološki evidentan gubitak kosti ne mogu usvojiti kao apsolutni indikatori patološkog gubitka kosti.

U dijagnostici stanja peri-implantnih tkiva koristi se nekoliko tipova metoda i najčešće u kombinaciji radi što potpunijeg postavljanja dijagnoze. Dijagnostičke metode uključuju: određivanje kliničkih parametara, radiološke analize, mikrobiološke analize i kvalitativne i kvantitativne analize PICO (Bragger 1998, Mombelli A & Lang NP 1998, Hammerle & Glauser 2004, Heitz-Mayfield 2008).

Klinički parametri stanja peri-implantnih tkiva uključuju indikatore inflamacije mekih tkiva i koštanog tkiva, kao i parametre okluzije implantata. Krvarenje na probu (BOP) je obično prvi klinički parametar koji se određuje i predstavlja indikator inflamacije koji je pozitivan i u slučaju peri-mukozitisa i u slučaju peri-implantitisa (Mombelli i Lang 1998). U cilju povećanja preciznosti, uobičajeno je da se BOP kao i drugi klinički

parametri mere u 6 tačaka (buko-mezijalna, buko-medijalna, buko-distalna, oro-mezijalna, oro-medijalna i oro-distalna) i da se indeks predstavlja kao zbir vrednosti iz svih tačaka. Od parametara mekih tkiva najčešće se koriste nivo marginalne gingive kao indikator recesije mekog tkiva i širina pripojne gingive kao indikator u prognozi stanja mekih tkiva (Mombelli i Lang 1998, Hämmerle i Glauser 2004). Dubina peri-implantnog džepa (PD) i relativni nivo pripojnog epitela (rCAL) su obično indikatori gubitka kosti, jer je utvrđeno da povećanje dubine peri-implantnog džepa tokom vremena odgovara, ne samo gubitku meko tkivnog pripoja, već i gubitku potporne kosti (Lang i sar. 1993). Supuracija i mobilnost implantata predstavljaju siguran klinički znak peri-implantitisa i spadaju u indikatore progresivnog gubitka kosti (Roos-Jansaker i sar. 2006, Fransson i sar. 2008, Heitz-Mayfield 2008). U kliničkoj analizi okluzije na implantatu koriste se standardi okluzalni markeri, a često se koriste i sofisticirane kompjuterske tehnologije poput t-scan analize koje nadomešćuju manju osetljivost standardnih okluzalnih markera.

Radiološka analiza peri-implantnih tkiva se koristi za praćenje stanja potporne kosti implantata i često predstavlja metod izbora u diferencijalnoj dijagnozi, prognozi i u planiranju terapije (Brägger 1998). U implantologiji se koriste panoramski ortopan tomografski snimci kao pregledni snimci, ciljane tomografije radi kvalitativno-kvantitativne analize mesta ugradnje implantata, ali se za individualno praćenje implantata koriste ciljani periapikalni radiogrami, pri čemu se kao metod izbora predlaže tehnika paralele uz upotrebu dugog konusa (van Aken 1969). Međutim, radiološke metode imaju svoje nedostatke i često ne mogu dati precizne informacije o pojedinim strukturama poput karakteristika kontakta koštanog tkiva i implantne površine (Brägger 1998). Osim toga, radiološke analize se ne sprovode konvencionalno radi kontrole stanja implantata već radi potvrde, često, već prisutnih pozitivnih kliničkih znakova zapaljenja.

Mikrobiološke analize se uobičajeno sprovode u uslovima pozitivnih kliničkih znakova zapaljenja u cilju identifikacije parodontopatogena, u prvom redu agresivnih, radi ordiniranja adekvatne terapije (Mombelli i Lang 1998, Hämmerle i Glauser 2004).

Analiza PICF predstavlja jednu od najatraktivnijih metoda u savremenoj implantologiji, pri čemu je njena najveća vrednost u tome što daje direktne informacije o stanju peri-

implantnih tkiva i zasnovano na tome poseduje mogućnost da pokaže rane znake oboljenja peri-implantnih tkiva u fazi gde su tkivne promene reverzibilne (Heitz-Mayfield 2008). Zasnovano na toj karakteristici, ova metoda nadomešćuje ograničenja konvencionalnih kliničkih dijagnostičkih metoda koje daju informacije u stadijumu razvijene bolesti. Brojne studije se sprovode u cilju identifikacije biomolekula koji pouzdano reflektuje stanje peri-implantnih tkiva (Boutros i sar. 1996, Panagakos i sar. 1996, Murata i sar. 2002), ali kako je patologija lokalnog metabolizma kompleksna, a metoda evaluacije visoko-osetljiva, standardizacija ove metode je još uvek u toku.

1.5. Biomarkeri u evaluaciji stanja peri-implantnih tkiva: karakteristike, zahtevi i prednosti u odnosu na druge dijagnostičke metode

U savremenoj medicini jedna od centralnih tema istraživanja u svim oblastima jeste određivanje i standardizacija idealne dijagnostičke metode. Osnovni zahtevi idealnoj dijagnostičkoj metodi uključuju mogućnost te metode da pouzdano daje informaciju o stanju zdravlja ciljne funkcionalne jedinice, o pojavi bolesti i njenoj aktivnosti i da se može koristiti za evaluaciju terapijskog ishoda (Lee i sar. 2009). Takva metoda treba da bude ne invazivna, lako izvodljiva, reproducibilna i finansijski dostupna. Osnovni naučni motiv za traganje za metodom ovakvih karakteristika je čest nedostatak kliničkih metoda koje nisu dovoljno sofisticirane da bi ponudile informaciju o pojavi bolesti, odnosno o momentu prelaska iz fiziološkog u patološko stanje, kao ni za praćenje aktivnosti i progresije bolesti kao što je slučaj sa dijagnostičkim ograničenjem dubine parodontalnog džepa, nivoa pripojnog epitela i radiološkog nalaza u parodontologiji i implantologiji (Buduneli i Kinane 2011). Ovo ograničenje kliničkih metoda rezultira u propuštanju vremena od momenta pojave bolesti koje proporcijonalno umanjuje uspeh terapije, a često i u izboru neadekvatnog terapijskog plana. Kako ovaj problem postoji u parodontologiji i implantologiji, i u ovim oblastima obavljaju se brojna istraživanja u cilju determinisanja pouzdane i kompletne dijagnostičke metode. Prilikom razmatranja potencijalnih dijagnostičkih metoda, metoda određivanja biomarkera usvojena je kao najvalidnija metoda za monitoring stanja ispitivanog tkiva, koje se određuju direktno u uzorku tkiva ili u uzorku telesnih tečnosti. U cilju povećanja verodostojnosti dobijenih

rezultata, težnja je da se biomarkeri određuju iz uzorka koji je u što direktnijem kontaktu sa ispitivanim tkivom kao bi se eliminisao uticaj sistemskih faktora i dobila što realnija informacija o stanju ispitivanog tkiva. Tako se u parodontologiji i implantologiji obično koristi ili uzorak tkiva ili, mnogo češće, uzorak GCF odnosno PICF ili salive jer su u te fluide potpopljena tkiva koja se ispituju, te posledično ove tečnosti absorbuju sve tkivne metabolite i na taj način se dobija mnogo preciznija informacija o ovim tkivima nego u uzorku krvi. Kada se razmatraju plivačka i GCF/PICF kao dijagnostički medijum u praćenju stanja parodontalnih/peri-implantnih tkiva, iako uzorkovanje salive predstavlja dostupniji i primenljiviji metod, dijagnostički prioritet se ipak daje GCF/PICF jer su ovi fluidi u direktnom kontaktu sa ciljnim tkivima. Prioritet se dodatno daje ovim medijumima iz razloga jer je lokalna koncentracija ispitivanih molekula u ovom slučaju daleko manja od istih parametara na nivou krvi i drugih telesnih fluida prema kojima su često kreirani dijagnostički kitovi, i iz tog razloga je često teško dostignuti detekcioni prag dijagnostičkog testa.

GCF/PICF predstavljaju biološki fluid poreklom iz seruma koji odgovara inflamatornom eksudatu. GCF/PICF pouzdano reflektuju tekuće procese u parodontalnim/peri-implantnim tkivima koji ga inače proizvode, i time ove tečnosti sadrže delove i produkte lokalnog metabolizma (Armitage 1996). Preko 65 biomolekula je istraženo u GCF u cilju određivanja njihovog potencijala kao biomarkera. Biomolekuli koji se usvajaju kao markeri stanja parodontalnih/peri-implantnih tkiva su podeljeni u tri grupe (Armitage 2004):

1. Enzimi poreklom od domaćina i njihovi inhibitori
2. Zapaljenski medijatori i modifikatori imunološkog odgovora
3. Produkti tkivne destrukcije

1.5.1. Karakteristike koštanog tkiva i njegovog metabolizma

Koštano tkivo predstavlja specijalizovano vezivno tkivo čija je osnovna karakteristika mineralizovanost. Kao i svako vezivno tkivo, koštano tkivo sačinjeno je od intercelularnog matriksa i koštanih ćelija. Intercelularni matriks je sačinjen od manje

zastuplene organske komponente i dominante neorganske komponente. Organizacija tkiva se zasniva na mreži vlakana kolagena tip-1 između kojih se interponiraju joni kalcijuma i fosfata organizovani u formu kristala hidroksiapatita raspoređenih na tačno određen način, gde ova arhitektura i sastav obezbeđuju osnovne funkcije ovog tkiva. Osnovnih funkcija ovog tkiva među kojima su najznačajnije: pružanje potpore i zaštita dubljih struktura zasnovano na sposobnosti odoljevanju silama, mesto pripoja mišića, formiranje ćelija i depo minerala, odnosno održavanje homeostaze jona kalcijuma i fosfata. Osteoblasti su osnovne ćelije koštanog tkiva, to su visoko diferencijirane ćelije čija je osnovna funkcija produkcija koštanog matriksa. One imaju niski migracioni i proliferativni kapacitet, a nastaju stimulacijom inducibilnih osteogenih progenitornih ćelija najčešće koštanim morfogenetskim proteinima (BMP), vaskularnim endotelnim faktorom rasta (VEGF), insulinskim faktorom rasta (IGF), faktorom rasta poreklom iz trombocita (PDGF), i drugima. Koštano tkivo je metabolički veoma aktivno tkivo iz razloga jer se njegova struktura i funkcionalnost održavaju zasnovano na dva konstanto prisutna procesa, a to su koštana modelacija i remodelacija. Koštana modelacija podrazumeva promene u arhitekturi tkiva u cilju adaptacije na opterećenje odnosno sile u cilju povećava nja otpornosti na mestu izloženosti silama. Koštana remodelacija podrazumeva promene mineralizovanosti kosti bez propratne promene arhitekture, i čine je resorpcija i apozicija. Homeostaza kosti zasniva se na ravnoteži između procesa resorpcije i apozicije, a sam proces je afektiran brojnim lokalnim i sistemskim faktorima. Najznačajniji faktori su mehaničke sile, hormoni (parathormon, tiroidni hormoni, vitamin D, estrogen, kortizol, androgeni hormoni, kalcitonin i hormoni rasta), faktori rasta (IGF, transformišući faktor rasta-TGF), citokini (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-17, TNF α , IFN γ , i drugi) i lipololisaharidi odnosno faktori virulencije bakterija (Watts 1999, Theoleyre i sar. 2004, Taubman i sar. 2005). Sam metabolički proces zasnovan je na interćelijskoj i intracelularnoj signalizaciji vođenoj biomolekulima koji se proizvode ili ekspimiraju na površini ćelija na određeni stimulus i ulaze u direktnu interakciju sa kompatibilnim receptorom, ili se indirektno umeće afektirajući interakciju receptora i liganda. Povećana stimulacija dovodi do porasta ovih induktivnih biomolekula čime se povećava broj ligand-receptor interakcija, odnosno uticaj na interakcije, a broj ligand-receptor interakcija proporcionalno utiče na intezitet efektorne reakcije. Ovaj obrazac predstavlja osnovni obrazac funkcionisanja koštanog

metabolizma. Uravnoteženost između pro-formativnih i pro-resorptivnih stimulišućih faktora diktira stanje koštanog tkiva i u slučaju kada jedan od dva predominira, nastupa posledični poremećaj.

1.5.2. Biomarkeri gubitka kosti

Biomarkeri gubitka kosti predstavljaju veliki naučni i klinički trend u savremenoj medicini, jer ova dijagnostička metoda predstavlja ne invazivnu reproducibilnu metodu koja pouzdano reflektuje stanje kosti, nadomešćujući nedostatke konvencionalnih kliničkih i radioloških bolesti posebno u fazi pojave bolesti i praćenja njene aktivnosti i reaktivacije. Ovo svojstvo biomarkera zasnovano je na tome jer biomarkeri ne predstavljaju ništa drugo nego biomolekule involvirane u regulaciju koštanog metabolizma ili molekule produkte destrukcije tkiva, pri čemu su i jedan i drugi proces najintezivniji na početku bolesti i u njenoj aktivnoj i akutnoj fazi, gde su upravo ove faze kritične za prepoznavanje pomoću drugih konvencionalnih metoda. Takođe, ova metoda pruža precizniji metod za određivanje opsega odnosno inteziteta procesa, što se svakako ne može postići kliničkim metodama, a pokazano je da bez obzira na napredne i standardizovane imidžing metode, biomarkeri daju mnogo preciznije informacije (Watts 1999).

U procesu gubitka kosti, odnosno u procesu koštane resorpcije proces osteoklastogeneze predstavlja ključni proces. Osteoklastogeneza podrazumeva proces sazrevanja osteoklasta iz pre-osteoklasta i pojačavanje aktivnosti zrelih osteoklasta. Osteoklasti histološki predstavljaju multijedarne gigantske ćelije nastale fuzionisanjem monocita, koje sadrže veliku količinu lizozimskih granula punih litičkih enzima koje im daju visok degradativni potencijal. Osteoklastogeneza zastupljena u peri-implantitisu i u parodontopatiji predstavlja inflamatornu osteoklastogenezu koja za osnovni stimulus koristi lokalnu inflamaciju, preciznije dostizanje kritičnih koncentracija pro-inflamatornih medijatora. Centralni regulatorni mehanizam inflamatorne osteoklastogeneze zasnovan je na interakciji članova trijade RANK/RANKL/OPG (Crotti i sar. 2003, Nagasawa i sar. 2007, Dutzan i sar. 2009).

RANK poznat i kao receptor faktora diferencijacije osteoklasta je 11A član TNF superfamilije. Humani RANK je transmembranski receptor sačinjen od 616 amino

kiselina, eksprimiran primarno na monocit/makrofag ćelijskim linijama uključujući pre-osteoklaste, osteoklaste, B i T limfocite, dendritske ćelije i fibroblaste (Khosla 2001, Kwan i sar. 2004). Kako je RANK lokalizovan na površini pre-osteoklasta i osteoklasta njegova ligacija dovodi do diferencijacije i maturacije nezrelih osteoklasta i paralelno do pojačavanja aktivnosti zrelih osteoklasta (Collin-Osdoby i sar 2001, Soedarsono i sar. 2006, Buduneli N, i sar. 2009). Aktivacija RANK-a za posledicu ima regrutaciju TNFR-faktor udruženih proteina koji regulišu transdukciju signala od RANK-a sa posledičnom aktivacijom Nf-kB puta mitogen-aktivirane protein kinaze. Ova dva mehanizma su ključni mehanizmi za ekspresiju i transkripciju gena koji kodiraju pro-inflamatorne citokine. Mehanizam je zasnovan na brznoj translokaciji gena sa posledičnom biosintezom ciljnih pro-inflamatornih citokina. Na taj način dolazi do povećanja lokalnih koncentracija pro-inflamatornih citokina i do produbljivanja inflamacije i inflamatorne osteoklastogeneze. Specifična karakteristika ovog receptora je da se može aktivirati na dva načina, konvencionalnim mehanizmom pomoću svog liganda (RANKL-a) i ligan-nezavisno putem autoligandovanja pod uticajem pro-inflamatornih citokina i LPS-a (Kanazawa i Kudo 2005, Otero i sar. 2010).

RANKL poznat i kao faktor diferencijacije osteoklasta i ligand osteoprotežerina je protein od 35KDa sačinjen od 316 amino kiselina (Lacey i sar. 1998, Wong i sar.1998,). Na samom ligandu se razlikuje njegov transmembranski deo i ligand vezujući region, a postoje tri izoforme, 2 membranske i solubilna forma (Ikeda 2001). Membranska forma je poznata kao mnogo potentnija (Nakashima i sar. 2000), a solubilna forma (sRANKL) nastaje sečenjem membranske forme pomoću dezintegrin-metaloproteinaznog TNF α konvertujućeg enzima (Lum i sar. 1999) i predstavlja indirektnu meru RANKL-a. RANKL eksprimiraju ćelije koštane srži, fibroblasti, endotelne ćelije, epitelne ćelije, osteoblasti, osteoklasti i T-limfociti. Njegova ekspresija je stimulirana hormonima (parathormonom, adrenalinom, 17 β -estradiolom i glikokortikoidima), citokinima (IL1, IL6, IL8, IL11, IL17, TNF α i IFN γ) i LPS-om (Theoleyre i sar. 2004, Taubman i sar. 2005, Bostanci i sar. 2007). Sakelari i saradnici su utvrdili pozitivnu korelaciju koncentracije sRANKL-a sa najznačajnijim, odnosno najagresivnijim parodontopatogenima, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* (Sakelari sar.

2008) što ukazuje na značaj sRANKL-a kao prognostičkog markera parodontopatije i infekcija udruženih sa ovom mikroflorom.

OPG poznat i kao faktor inhibicije osteoklastogeneze i folikularni faktor poreklom iz dendritskih ćelija je polipeptid sačinjen od 380 amino kiselina (Simonet i sar. 1997, Tsuda i sar. 1997, Kwon i sar. 1998, Yun i sar. 1998). OPG exprimira ćelije koštane srži, dendritske ćelije, folikularne dendritske ćelije, limfoidne ćelije, endotelne ćelije, fibroblasti, monociti, B i T limfociti i megakariociti. Njegova ekspresija je pozitivno regulisana estrogenom, TNF, gonadotropnim hormonom i TGF β , a negativno je regulisan parathormonom i glukokortikoidima.

Trijada ova tri molekula predstavlja ključni regulatorni šant osteoklastogeneze, gde balans između interakcija RANK-a i RANKL i interakcija OPG-a i RANKL a determiniše koštanu homeostazu, odnosno predstavlja ciljnu kariku za razvoj koštane resorpcije usleđen patološkim faktorima. OPG re cirkulišući receptor RANKL-a i na taj način antagonizuje prekomerne interakcije RANK-a i RANKL-a i ovaj obrazac podleže uticaju brojnih osteotropnih faktora. U patološkim uslovima usled snažne stimulacije dolazi do prekomernog ekspimiranja RANKL-a koji nadmašuje OPG kapacitete, što rezultuje koštanom resorpcijom.

Zasnovano na svojim biološkim karakteristikama, RANKL i OPG su ispitivani u parodontologiji i implantologiji. Utvrđeno je da su povećane koncentracije RANKL-a i snižene koncentracije OPG-a udružene sa parodontopatijom, pa su ovi biomolekuli usvojeni kao dijagnostički biomarkeri parodontopatije (Sakellari i sar. 2008). Takođe je utvrđeno da je relativni odnos RANKL/OPG biomarker parodontopatije i da ima možda čak i precizniji dijagnostički potencijal od pojedinačnih biomolekula, međutim utvrđeno je da odnos pouzdano ukazuje na prisutnost parodontopatije, ali da ne reflektuje pouzdano aktivnost bolesti pa se ne može koristiti kao pouzdani dijagnostički marker za praćenje terapijskog ishoda (Belibasakis i Bostanci 2011). U implantologiji je znatno manje istraživanja sprovedeno o RANKL-u i OPG-u, i iz tog razloga su stavovi dosta ne homogeni. Među prvim objavljenim rezultatima iz ove oblasti našli su se rezultati Monova i saradnika (Monov et al. 2006) koji nisu uspeli da dokažu OPG ni u jednom od 84 ispitivanih uzoraka, pri čemu je sRANKL dokazan u određenom broju uzoraka, ali autori nisu uspeli da postignu nijednu korelaciju vezano za njegove koncentracije. Sa

druge strane Arikani je sa saradnicima u svoje dve studije (Arikan i sar. 2008, Arikan i sar. 2011) uspeo da detektuje OPG u skoro svim ispitivanim uzorcima i utvrdili su pozitivnu korelaciju između visokih koncentracija OPG u PICF i peri-implantne inflamacije, odnosno peri-implantitisa, dok je sRANKL dokazan u izuzetno malom procentu uzoraka i ni jedna značajna korelacija nije utvđena za ovaj marker.

Prema našem saznanju, ne postoje publikovani rezultati o koncentraciji i profilu RANK-a u parodontopatiji i peri-implantitisu.

Katepsin K pripada grupi cistein proteaza i predstavlja jedinstveni enzim iz grupe lizozimskih enzima koji ima sposobnost degradacije koštanog matriksa (Rantakokko i sar. 1996, Drake i sar. 2006). Ovaj enzim je visoko eksprimiran od strane osteoklasta i u kiseloj sredini, aktivirani katepsin K degradira koštani matriks uključujući kolagen tip-1, osteopontin i osteonektin i na taj način predstavlja značajan faktor u koštanoj remodelaciji i koštanoj destrukciji (Okaji i sar. 2003, Mogi i sar. 2007). Osteoklastogeneza je visoko regulisan složeni proces zasnovan na migraciji, proliferaciji, diferencijaciji i fuziji progenitornih ćelija koordinisano od strane trijade RANK/RANKL/OPG, gde posledično dolazi do sazrevanja i formiranja zrelih osteoklasta i stimulacije njihove aktivnosti. Zreli osteoklasti se karakterišu zonom lepljenja ("sealing zone") kojom se adaptiraju za površinu kosti, u sledećoj fazi dolazi do formiranja ekstracelularnog lizozomskog kompleksa i oslobađanja njegovog sadržaja koji dovodi do zakišeljavanja sredine, i time do optimizacije uslova za aktivnost paralelno oslobođenog katepsina-K (Teitelbaum 2000). Katepsin-K se sintetiše u zimogenoj formi, ali ga osteoklasti oslobađaju isključivo a aktiviranom obliku (Dodds i sar. 2001), i on se smatra najspecifičnijim markerom aktivne koštane resorpcije i direktne osteoklastne aktivnosti (Okaji i sar. 2003, Mogi i sar. 2007).

Pokazano je da su visoke koncentracije katepsina-K udružene sa hroničnom inflamacijom (Skoumal i sar. 2005), paralelno, infekcija obara lokalni pH obezbeđujući lokalne uslove reakcije enzima, što navodi na činjenicu da je katepsin-K dobar marker osteoklastne aktivnosti u inflamatornim oboljenjima tipa peri-implantitisa i parodontopatije. Studije sprovedene u parodontologiji su pokazale da je povećanje katepsina-K udruženo sa parodontopatijom (Mogi i sar. 2004, Mogi i Otogoto 2007), i da se njegova koncentracija smanjuje nakon kauzalne terapije parodontopatije (Garg i

sar. 2009). Takođe, Mogi i Otogoto (Mogi i Otogoto 2007) su pokazali pozitivnu korelaciju katepsina-K i RANKL-a u hroničnoj parodontopatiji i ukazali na njihovu zajedničku ulogu u osteoklastogenezi. O katepsinu-K u okviru metabolizma peri-implantnih tkiva su objavljeni rezultati samo 3 studije, u kojima je pokazano da je povećanje koncentracije katepsina-K, odnosno njegove aktivnosti pozitivno udruženo sa peri-implantitisom (Strbac i sar. 2006, Yamalik i sar. 2011, Yamalik i sar. 2012).

Sklerostin poznat i kao ligand gustine kosti je glikoprotein produkt gena SOST, i predstavlja negativni regulator koštane formacije. Sklerostin eksprimiraju ćelije koje su involvirane u metabolizam mineralizovanog intercelularnog matriksa: osteociti, hipertrofični mineralizovani hondrociti i cementociti (van Bezooijen i sar. 2004, van Bezooijen i sar. 2009), pri čemu ga osteoblasti i osteoklasti ne eksprimiraju. Sklerostin predstavlja antagonistu koštanih morfogenetskih proteina (BMP) i intezivni inhibitor Wnt signalizacije, centralnog regulatornog obrasca koštane mase (Ellies i sar. 2006, ten Dijke i sar. 2008).

Sklerostin poseduje više mehanizama kojima deluje na koštani metabolizam u smeru redukcije mineralnog sadržaja, debljine korteksa, količine trabekularne kosti i otpornosti same kosti. Ovaj biomolekul inhibira razvoj osteoblasta počevši od proliferacije osteogenih ćelija, pa do rane i kasne diferencijacije osteoblasta (Winkler i sar. 2003, Sutherland i sar. 2004). Istovremeno on stimulira apoptozu osteocita i osteoblasta (Sutherland i sar. 2004), dovodi do povećanja aktivnosti kaspaza i DNK udruženih sa fragmenitiranim histonima u mezenhimalnim ćelijama i može dovesti do apoptoze osteocita auto-ligiranjem sopstvenih receptora (van Bezooijen i sar. 2005).

Sklerostin se obično dovodi u vezu sa gubitkom kosti kao posledica smanjenja ili gubitka opterećenja kosti (Suva 2009), međutim pro-inflamatorni citokini afektiraju sklerostin u smeru njegovog porasta (Wehmeyer i sar. 2010) čineći ga značajnim faktorom inflamatorne osteoklastogeneze. Takođe, utvrđeno je da se koncentracija sklerostina povećava sa godinama (Ulrike i sar. 2011), ali taj mehanizam još uvek nije potpuno objašnjen. Appel je sa saradnicima (Appel i sar. 2009) pokazao da je smanjenje koncentracije sklerostina udruženo sa ankilozitajućim spondilitisom odnosno fenomenom ankiloze.

Prema našem saznanju, ne postoje publikovani rezultati o distribuciji i profilu sklerostina u parodontologiji i peri-implantitisu, ali uzimajući u obzir njegovu

involviranost u inflamatornu osteoklastogenezu i osteoklastogenezu udruženu sa poremećenim opterećenjem kosti, ovaj marker bi mogao da nađe svoje mesto kao biomarker stanja peri-implantne kosti.

VEGF poznat i kao vaskulotropin, odnosno faktor vaskularne permeabilnosti predstavlja kritični faktor angiogeneze kako pod fiziološkim, tako i u patološkim uslovima (Booth i sar. 1998). U okviru regulacije angiogeneze VEGF reguliše sve instance procesa uključujući proliferaciju endotelnih ćelija, sekreciju proteolitičkih enzima, hemotaksu i migraciju. Na bazi svog visokog potencijala povećanja permeabilnosti endotela koji je 50,000 puta veći od histamina (Connolly 1989), VEGF predstavlja glavni faktor u pojavi edema i oticanja. VEGF je glikoprotein od 42 kDa koji se javlja u četiri izoforme pri čemu je najzastupljenija i najčešće razmatrana VEGF₁₆₅ i ona odgovara nativnoj formi VEGF (Ferrara i sar. 1989, Houck i sar. 1992). VEGF je involviran u brojne fiziološke procese rasta i razvoja, takođe i u procese zarastanja, ali ovaj faktor rasta je istovremeno udružen sa brojnim patološkim procesima. U prvom redu, VEGF je udružen sa neoangiogenezom kod tumora (Senger 1986), međutim sada se ovaj faktor pripisuje patogenezi različitim inflamatornim stanjima kao što su reakcija kasne preosetljivosti, reumatoidni artritis i parodontopatija (Brown 1995, Booth i sar. 1998, Suthin i sar. 2003). Inflamacija uzrokovana parodontopatogenima se karakteriše visokim lokalnim koncentracijama pro-inflamatornih medijatora, što je od značaja za VEGF je su pro-inflamatorni medijatori poput prostaglandina E2 (PGE₂), IL-1, IL-6 i TNF α stimulatori VEGF-a (Ben-Av i sar. 1995, Frank i sar. 1995). Iz tog razloga su sprovedene studije u parodontologiji i utvrđena je utvrđena povezanost VEGF sa parodontopatogenima i sa parodontalnom inflamacijom (Booth i sar. 1998, Suthin i sar. 2003). Prema našem saznanju ne postoje publikovani rezultati o profilu VEGF-a u peri-implantnim tkivima, ali uzimajući u obzir njegovu udruženost sa inflamacijom, pre svega parodontalnom, kao i sa reakcijama kasne preosetljivosti, ovaj molekul bi potencija mogao da nađe dijagnostičku ulogu u monitoringu peri-implantnih tkiva oko titanijumkih oralnih implantata.

1.5.3. Koncept određivanja biomarkera gubitka kosti u peri- implantitisu

Proces određivanja i profiliranja biomarkera stanja kosti iz PICF predstavlja naučni izazov koji kao rezultat daje objašnjenja lokalne biologije peri-implantnih tkiva i

patogeneze gubitka kosti, i paralelno moćan alat za pouzdano praćenje stanja zdravlja peri-implantnih tkiva, prelaska u patološko stanje odnosno početka bolesti, aktivnosti i obima bolesti i za praćenje ishoda terapije. Peri-implantitis predstavlja patogenetski dublikat parodontopatije i iz tog razloga se predhodna saznanja iz oblasti parodontalnog istraživanja često koriste kao polaznice za istraživanjima u implantologiji. Takođe, patogenetska sličnost čini parodontopatiju faktorom rizika oralnog implantata (Schou i sar. 2006) jer je pokazano parodontopatogeni poreklom od izvađenog zuba koji se nadoknađuje ili od susednih preostalih zuba, kontaminiraju implantne površine (Sumida i sar. 2002, Aoki i sar. 2009). Lokalni regenerativni potencijal tkiva koje je parodontološki kompromitovano, pogotovo u slučaju agresivne parodontopatije može svakako afektirati proces zarastanja kao osnovnu fazu oseintegracije i time dovesti do predominante reparacije na račun regeneracije, do fibroznog zarastanja ili neke druge rane ili kasne komplikacije (De Boever i sar. 2009). Međutim, kako između parodontalnog i peri-implantnog tkiva postoje strukturne i funkcionalne razlike, u prvom redu odsustvo periodoncijuma i cementa oko implantata i prisutnost ankilotične veze sa kosti postignute složenim biološkim mehanizmom oseintegracije, često je profil biomarkera oko implantata drugačiji u odnosu na prirodne zube čak i u uslovima zdravlja (Nowzari i sar. 2010). Osim toga, varijacije mikro i makro dizajna implantata ili njegovih komponenti koje su često modifikovane u smeru povećanja prijemčivosti tkivu, takođe menjaju lokalni metabolizam (Albouy i sar. 2012), a samim tim i profil biomarkera. Ovaj faktor retko kada direktno ugrožava implantat, ali zato u kombinaciji sa drugim faktorima kao što je infekcija dovodi do značajno većeg problema, što samu inflamaciji čini obimnijom u odnosu na parodontalnu destrukciju (Quirynen i sar. 2002). Iz svih navedenih razloga, proces određivanja profila biomarkera oko implantata predstavlja složeni postupak.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je da se ispita potencijal RANK-a, sRANKL-a, OPG-a, Katepsina-K, Sklerostina i VEGF-a kao biomarkera gubitka potporne kosti implantata.

U okviru ovog glavnog cilja pod-ciljevi su bili:

- I. Određivanje koncentracije markera koštanog metabolizma u peri-implantnoj (PICF) tečnosti u uslovima zdravog peri-implantnog tkiva, peri-mukozitisa i peri-implantitisa.
- II. Ispitati da li su koncentracije ispitivanih markera svojstvene različitim stanjima peri-implantnog tkiva
- III. Ispitati međusobni odnos koncentracija ispitivanih biomarkera
- IV. Utvrditi odnos ispitivanih biomarkera i kliničkih parametara peri-implantnog tkiva

4. MATERIJAL I METODE

3.1 Eksperimentalne grupe i kriterijumi uključanja i isključenja

Studija je obuhvatila tri grupe sistemski zdravih nepušača sa ugrađenim endosealnim oralnim implantatima, opterećenih tokom najmanje godinu dana. Kriterijum isključenja su bili: upotreba antibiotika u predhodna tri meseca i upotreba antiinflamatorika u predhodna dva meseca od trenutka uzorkovanja, menstrualni ciklus, trudnoća i laktacija, pušenje i tretiranost parodontalnih/peri-implantnih tkiva u poslednjih godinu dana.

Prvu grupu činilo je 35 pacijenta sa dijagnostikovanim peri-implantitisom. Kao peri-implantitis je usvojen sledeći nalaz: pozitivno krvarenje/supuracija na probu, PD \geq 5mm, u slučaju prisutne recesije vrednost relativnog nivoa pripojnog epitela rNPE \geq 3mm, radiološki dokaz o gubitku \geq 2 navoja u odnosu na radiogram u trenutku protetskog opterećivanja.

Drugu grupu činilo je 30 pacijenata sa dijagnostikovanim peri-mukozitisom. Kao peri-mukozitis se usvojio sledeći nalaz: BOP $>$ 1, PD $>$ 3mm, vrednost rNPE=0 i negativni radiološki znaci gubitka koštanog tkiva u odnosu na radiogram u trenutku protetskog opterećivanja.

Treću grupu činilo je 30 pacijenata sa zdravim peri-implantnim tkivima. Za zdrava peri-implantna tkiva usvojen je sledeći nalaz: BOP=0, PD \leq 3mm i vrednost rNPE=0.

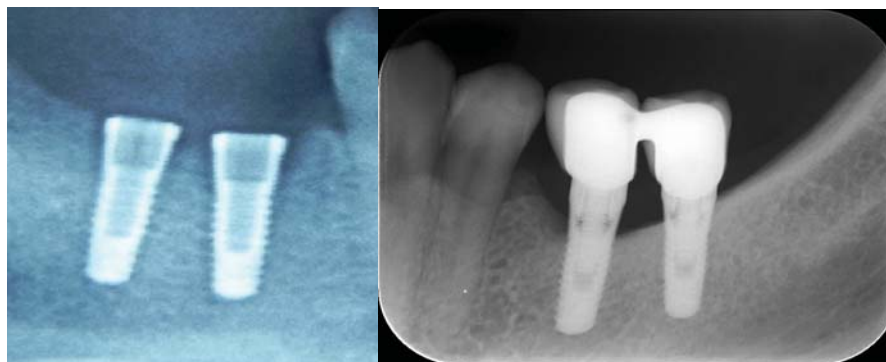
Svi pacijenti su pre uključivanja u studiju bili informisani o procedurama i dali su svoj pismeni pristanak na protokol koji je predhodno odobren od strane nadležnog etičkog komiteta.

3.2 Klinička merenja

Anamnestički podaci i nalazi kliničkog pregleda (slika 3) su beleženi u jedinstveni evidencioni karton. Klinička merenja su obavljena u 6 tačaka (buko-mezijalna, buko-medijalna, buko-distalna, oro-distalna, oro-medijalna i oro-mezijalna) i uključuje određivanje: krvarenja na probu (BOP) odsustvo-0, prisustvo-1, 15 sekundi nakon

sondiranja (Ainamo et al. 1975), indeks akumulacije plaka (PI) odsustvo-0, prisustvo-1 duž marginalne ivice (Ainamo et al. 1975), PD i rNPE graduisanom sondom (North Carolina–Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). U slučaju prisustva više peri-implantitisa ili peri-mukozitisa kod jednog pacijenta, zapaljenje sa većim defektom je bilo uključeno u studiju, a u slučaju sličnih karakteristika defekta u 6 tačaka, najdostupnije, odnosno anterijorno mesto je birano kao reprezentativno. Pacijenti sa utvrđenim znacima inflamacije oko oralnog implantata su radiografsani retroalveolarnim metodom, a zatim je nalaz upoređivan sa radiogramom uzetim u trenutku protetskog opterećivanja implantata.





Slika 3. Klinički pregled: A) Sondiranje B) Određivanje okluzalnih markera C) Radiogram pre protetskog opterećivanja D) Kontrolni radiogram

3.3. Uzorkovanje peri-implantne krevikularne tečnosti (PICF)

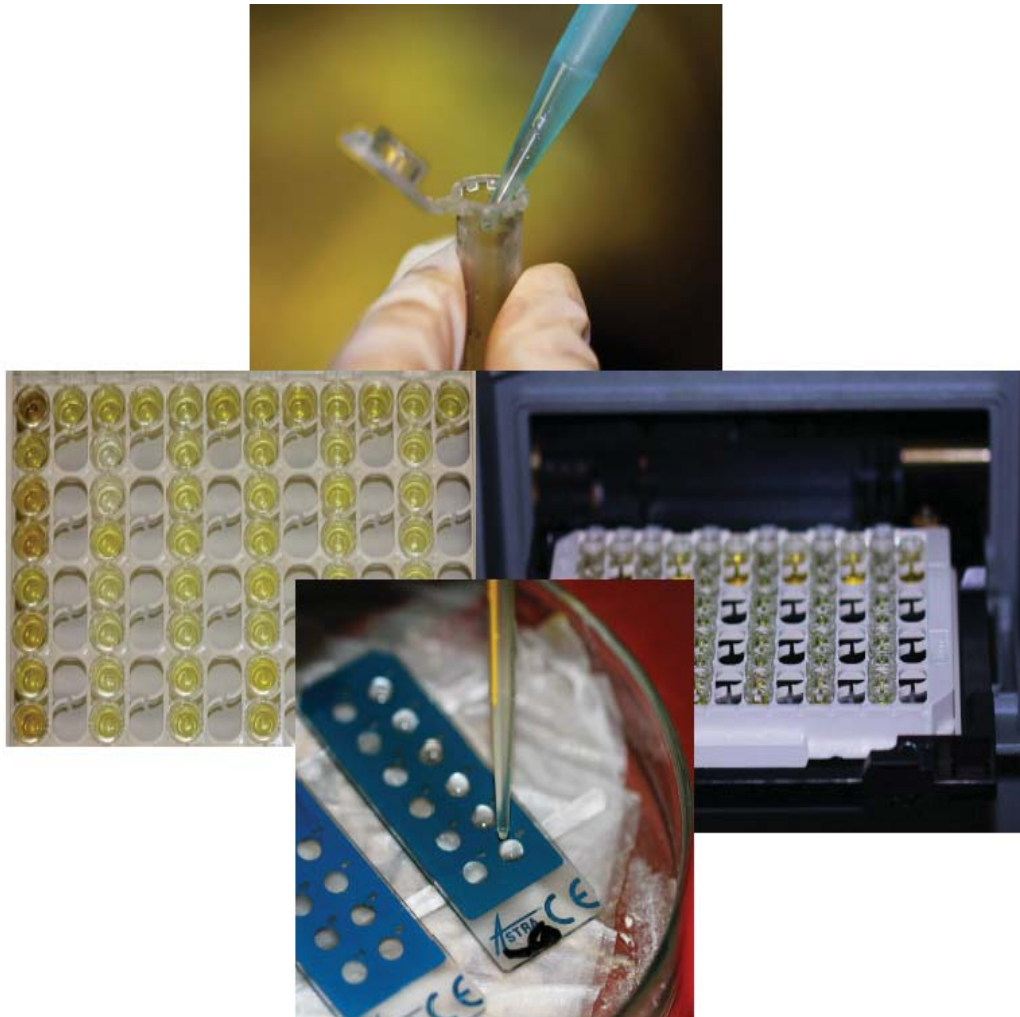
Uzorak peri-implantne tečnosti sakupljan je sa mezijalne površine reprezentativnog implantata participanta studije. Uzorci su uzimani 24 časa nakon kliničkih merenja kako bi se izbegla kontaminacija uzorka krvlju, u grupama sa zapaljenjem sa mesta sa najvećom dubinom sondiranja, a u grupi zdravih peri-implantnih tkiva sa najdostupnijeg

mesta. Uzorci su dobijeni i metodom filter papira (Petkovic et al. 2010). Mesto uzorkovanja je bilo izolovano vaterolnoma, posušeno pusterom ali u smeru suprotnom otvoru džepa/sulkusa, supragingivalni plak je pažljivo uklanjan vaterolnom, a zatim je sterilna filter tracića (Periopaper, Pro Flow, Amityville, NY, USA) plasirana u peri-implantni džep/sulkus do momenta prvog blagog otpora, i ostavljena je tokom 30 sekundi. Tračice vidljivo kontaminirane krvlju su bile odbačene. Dobijeni volumen tečnosti iz tračica je određivan pomoću kalibrisanog aparata Periotron 6000 (Interstate Drug Exchange, Amityville, NY, USA), a zatim su tračice odlagane u plastične tubice sa 0.5mL sterilnog fosfatnog pufera. Nakon 10s vorteksovanja, uzorci su centrifugirani tokom 5 minuta na 3000g u cilju odvajanja ćelija i debrisa, a zatime je tračica eliminisana iz tubice. Dobijeni supernatant je, zatim, zamrzavan na -20°C do početka biohemijske analize pomoću „enzyme linked immunosorbent assays“ (ELISA) metodom.

3.4. Evaluacija biomarkera u uzorku PICF

Komercijalni ELISA kitovi su korišćeni za evaluaciju koštanih biomarkera u uzorku PICF (slika 4): Human RANK/TNFRSF11A (DuoSet, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), ampli-sRANKL, OPG, cathepsin-K i sclerostin (Biomedica Gruppe, Vienna, Austria) i VEGF (Human VEGF ELISA Development Kit, Promokine, PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany). Minimalne detekcione granice kitova su bile sledeće: sRANKL (0.02 pmol/L), RANK (62.5 pmol/L), OPG (0.14 pmol/L), kathepsin-k (1.1 pmol/L), sklerostin (2.6pmol/L) i VEGF.

Ukratko, mikroploča je bila obložena antitelima specifičnim za ciljne biomarkere. Uzorci i standardi su plasirani u bunare i inkubirani tokom 3 sata na sobnoj temperature. Nakon „pranja“ ploče, enzimom obeležena antitela specifična biomarkeru su dodavana u svaki bunar. Zatim je ploča inkubirana tokom 2 sata na sobnoj temperaturi i bunari su ponovo „prani“. Nakon inkubacije od 20-30 minuta, stop-rastvor (sulfurična kiselina) je dodavan i reakcija je zaustavljena. Boja koja se pojavila je bila proporcijalna količini vezanih biomarkera u inicijalnoj fazi, i njen intezitet je evaluiran pomoću spektrofotometrije (450/620 nm, ELISA processor II, Boehring, Germany).



Slika 4. Evaluacija biomarkera ELISA metodom

Kalibraciona kriva je bila zadana regresionom analizom, a optička gustina uzorka je korišćena za estimaciju koncentracije biomarkera. Koncentracija biomarkera je izražena kao biomarker po uzorku (biomarker (pg)/ PICF volumen (mL), odnosno (ng)/mL za VEGF). U studiju su bile uključene isključivo koncentracije koje su se nalazile u opsegu primenjenog ELISA kita, a uzorci čije su koncentracije prevazivazile opseg bili su eliminisani iz istraživanja.

3.5. Statistička analiza podataka

Primarne ishodišne varijable u istraživanju su bile koncentracije RANK, sRANKL-a, OPG-a, Cathepsin-K, Sclerostin-a i VEGF-a u uzorku PICF. Sekundarne ishodišne varijable bile su BOP, PI, PD i rCAL koje su izražene kao srednja vrednost merenja u 6 tačaka po implantatu. Svi parametri su izraženi kao srednja vrednost, standardna devijacija, vrednost medijane i intervala poverenja.

Kako je statistički uzorak bio relativno mali, u analizi su primenjeni ne-parametrijski testovi. Demografski parametri poput pola i godina starosti su upoređivani pomoću hi-kvadrat testa. Poređenje među grupama izvršeno je pomoću Kruskal-Wallis testa, a zatim su razlike evaluirane pomoću Mann-Whitney testa. Korelacije između merenih parametara su merene pomoću "Spearman's rank correlation" testa. Sve analize izvršene su pomoću statističkog paketa SPSS (SPSS 20.0, Inc., Chicago, IL, USA) sa nivoom značajnosti postignutim na 5% ($p < 0.05$).

5. REZULTATI

Sprovedeno istraživanje predstavlja studiju preseka, koja je obuhvatila 95 pacijenata, od kojih 35 sa dijagnostikovanim peri-implantitisom, 30 sa dijagnostikovanim peri-mukozitisom i 30 sa zdravim peri-implantnim tkivima.

4.1. Demografske i deskriptivne karakteristike podataka ispitivanih grupa

Svi ispitanici su bili sličnih godina starosti i bez statistički značajnih razlika u distribuciji godina između ispitivanih grupa (Tabela 1). Zapremina PICF je bila značajno veća kod peri-implantitisa u poređenju sa zdravim peri-implantnim tkivima ($p=0.003$) i u poređenju sa peri-mukozitisom ($p=0.000$) (Tabela 1).

Tabela1. Deskriptivne karakteristike godina starosti, zapremine PICF i kliničkih parametara između grupa.

	Zdrava peri-implantna tkiva	Peri-mukozitis	Peri-implantitis	
Godine starosti	54,66±12,24 (49,7; 50,00-59,31)	51,83±14,94 (43,2; 36,15-67,52)	57,39±13,14 (53,2; 51,71-63,08)	PI /PM $p=0.250$ PI /ZI $p=0.188$ PM /ZI $p=0.378$
PICF (pg/mL)	0,48±0,14 (0,45; 0,44-0,58)	0,39±0,19 (0,35; 0,28-0,56)	0,71± 0,2 (0,67; 0,31-1,92)	PI >PM $p=0.000^*$ PI >ZI $p=0.003^*$ PM /ZI $p=0.210$
PI	0,87 ±0,551 (1,0; 0,72-1,02)	3,65 ±0,745 (3,97; 3,30-4,00)	3,88± 1,452 (4,0; 3,42-4,34)	PI /PM $p=0.512$ PI >ZI $p=0.000^*$ PM >ZI $p=0.000^*$
BOP	0 (-)	5,25± 0,639 (5,0; 4,95-5,55)	5,51± 0,506 (5,0; 5,35- 5,67)	PI /PM $p=0.087$ PI >ZI $p=0.000^*$ PM >ZI $p=0.000^*$
rCAL (mm)	0 (-)	0 (-)	4,76±0,624 (5,0; 4,56-4,95)	PI> PM $p=0.000^*$ PI >/ZI $p=0.000^*$ PM /ZI $p=1.00$
PD (mm)	1,83±1,62 (1,53; 1,67-2,00)	2,95±0,60 (3,10; 2,67-3,23)	4,71±1,43 (5,21; 4,25-5,16)	PI >PM $p=0.000^*$ PI >ZI $p=0.000^*$ PM > ZI $p=0.000^*$

*Sve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija i interval poverenja. *- $p<0.05$

Rezultati deskriptivne statistike kliničkih parametara su istaknuti u tabeli 1. Svi mereni klinički parametri su bili statistički značajno veći kod peri-implantitisa u odnosu na zdrava peri-implantna tkiva, uključujući PI ($p=0.000$), BOP ($p=0.000$), rCAL ($p=0.000$) i PD ($p=0.000$). U komparaciji kliničkih parametara između peri-implantitisa i peri-mukozitisa, utvrđeno je da su rCAL ($p=0.000$) i PD ($p=0.000$) bili značajno veći kod peri-implantitisa. U analizi kliničkih parametara između peri-mukozitisa i zdravih peri-implantnih tkiva, jedini klinički parametar koji nije bio značajno veći kod peri-mukozitisa bio je rCAL (1.00).

Karakteristike implantata uključujući dijametar, region i dužinu opterećenosti, istaknuti su u tabeli 2.

Tabela 2. Karakteristike implantata na nivou kojih je evaluirana koncentracija biomarkera po grupama.

	Zdrava peri-implantna tkiva	Peri-mukozitis	Peri-implantitis
Dijametar implantata (%)			
4.5 _{mm}	29,6	33,3	45,5
4.0 _{mm}	48,1	-	22,7
3.5 _{mm}	3,7	-	4,5
3.2 _{mm}	18,5	66,7	27,3
Region (%)			
Frontalni region maksile	13,7	37,5	25,8
Premolarni region maksile	17,6	37,5	9,7
Bočni region maksile	7,8	-	3,2
Frontalni region mandibule	11,8	12,5	22,6
Premolarni region mandibule	19,6	-	22,6
Bočni region mandibule	29,4	12,5	16,1
Dužina opterećenosti implantata			
	4,84±2,53 (5,85-3,86)	4±3,56 (8,71-1,29)	6,85±4,59 (8,99-4,7)

*Vrednosti dužine opterećenja implantata su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (interval poverenja)

4.2 Distribucija koncentracija biomarkera između grupa

U svim analiziranim uzorcima PICF-a su dokazane koncentracije RANK-a, sRANKL-a, OPG-a, katepsina-K i VEGF-a iznad detekcionog limita, pri čemu je za sklerostin samo 6% uzoraka bilo pozitivno. Vrednosti biomarkera u uzorku PICF i njihovi međugrupni odnosi dati su u tabeli 3.

Koncentracija RANK-a je bila značajno veća kod peri-implantitisa u odnosu na zdrava peri-implantna tkiva ($p=0.002$), takođe je bila veća i kod peri-mukozitisa u odnosu na zdrave implantate ($p=0.021$). Vrednosti sRANKL-a bile su značajno veće u grupi peri-implantitisa u odnosu na zdrava peri-implantna tkiva ($p=0.010$), ali ne i u odnosu na peri-mukozitise, kao ni između peri-mukozitisa i zdravih peri-implantnih tkiva, gde nije postignuta statistička značajnost. Koncentracija OPG-a je bila značajno veća kod peri-implantitisa u odnosu na zdrava peri-implantna tkiva ($p=0.031$), i to je ujedno bila jedina značajnost za ovaj marker. Relativni odnos sRANKL/OPG nije pokazao značajnu razliku u distribuciji vrednosti između ispitivanih grupa. Vrednosti katepsina-K su bile više na mestima zapaljenja, ali je jedina značajnost uočena između peri-mukozitisa i zdravih peri-implantnih tkiva ($p=0.039$). Sklerostin je dokazan u izuzetno malom broju uzoraka, ali su razlike bile upadljive pa su vrednosti bile značajno veće u grupi peri-implantitisa u odnosu na druge dve grupe (tabela 4). Koncentracija VEGF-a je bila značajno veća kod peri-implantitisa u odnosu na druge dve grupe, i grupu peri-mukozitisa ($p=0.014$) i zdravih peri-implantnih tkiva ($p=0.000$).

Tabela 3. Distribucija vrednosti biomarkera i njihove razlike između grupa

	Zdrava peri-implantna tkiva	Peri-mukozitis	Peri-implantitis	PI /PM PI /ZI PM >ZI	p=0.400 p=0.002* p=0.021*
RANK (pg/mL)	432,19±306,66 (201,33; 286,8-577,58)	992,15±741,46 (830,44; 214,04-953,58)	1274,86±551,11 (1084,33; 795,74-1753,98)		
RANKL (pg/mL)	5,22 ± 3,55 (2,10; 2,68- 7,76)	8,29 ± 13,27 (8,18; 2,8- 9,78)	9,29 ± 15,97 (9,10; 2,19- 49,71)	PI /PM PI >ZI PM /ZI	p=0.779 p=0.010* p=0.210
OPG (pg/mL)	15,92 ± 8,98 (5,20; 9,48-56,45)	14,46 ±1,84 (6,70; 13,44-15,49)	18,99 ± 9,96 (6,93; 10,43-68,22)	PI /PM PI >ZI PM/ZI	p=0.512 p=0.031* p=0.283
RANKL/OPG	0,81 ± 0,61 (0,74; 0,17-2,12)	0,92 ± 1,32 (0,84; 0,52-2,56)	1,01 ± 1,17 (0,98; 0,62-3,46)	PI /PM PI >ZI PM/ZI	p=0.417 p=0.921 p=0.383
CATEPSIN-K (pg/mL)	439,39±46,03 (435,01; 918,98-959,8)	966,86± 44,11 (950,21; 944,17-989,56)	1020,91± 372,23 (850,33; 881,92- 1159,92)	PI /PM PI /ZI PM >ZI	p=0.177 p=0.147 p=0.039*
Sklerostin (pg/mL)	146,16±95,83 (131,30; 45,59-246,73)	31±4,24 (0,00; 7,11-69,11)	2625,50±3669,19 (260,00; 4,56-4,95)	PI> PM PI >ZI PM /ZI	p=0.000* p=0.000* p=1,00
VEGF (ng/mL)	0,39±1,62 (0,45, 0,21-1,87)	1,46±3,01 (1,72; 0,67-4,23)	7,92±10,86 (7,51; 4,25-18,16)	PI >PM PI >ZI PM/ZI	p=0.014* p=0.000* p=0.484

4.3. Korelacija merenih biomarkera sa kliničkim parametrima

Korelacije merenih biomarkera, kliničkih parametara i volumena PICF su date u tabeli 4. RANK i sRANKL su pokazali značajno pozitivnu korelaciju sa svim merenim kliničkim parametrima (tabela 5), a OPG je pokazao takođe značajnu pozitivnu korelaciju sa gotovo svim merenim kliničkim parametrima, izuzev sa PI ($p=0.121$), a identičan slučaj je bio sa sklerostinom (tabela 4). VEGF nije pokazao nijednu značajnu korelaciju sa merenim kliničkim parametrima.

Tabela 4. Korelacija merenih biomarkera i kliničkih parametara

	RANK	sRANKL	OPG	CATHEPSIN-K	SCLEROSTIN	VEGF
PICF	R=0.097 p=0.579	R=-0.110 p=0.413	R=0.221 p=0.096	R=-0.257 p=0.111	R=-0.200 p=0.800	R=-0.214 p=0.314
PI	R=0.422 p=0.003*	R=0,302 p=0.0391*	R=0,228 p=0,121	R=0.263 p=0,029*	R=0,926 p=0.073	R=0.315 p=0.057
BOP	R=0.433 p=0.003*	R=0,327 p=0.0246*	R=0,325 p=0.0255*	R=0.145 p=0.236	R=1.000 p=0.000*	R=0.307 p=0.065
PD	R=0.369 p=0.012*	R=0,309 p=0.0342*	R=0,323 p=0.0265*	R=0,132 p=0,289	R=0.989* p=0.011*	R=0,069 p=0.683
rCAL	R=0.394 p=0.003*	R=0,357 p=0.0137*	R=0,288 p=0.0493*	R=0.143 p=0.231	1.000 p=0.000*	R=0.257 p=0.125

4.4. Međusobna korelacija merenih biomarkera

Međusobna korelacija merenih biomarkera istaknuta je u tabeli 5. RANK je pokazao jedinu značajnu i pozitivnu korelaciju sa sRANKL-om ($p=0.026$). Sa druge strane

sRANKL je pokazao najveći broj korelacija od svih markera, i bio je pozitivno korelisan sa RANK-om ($p=0.026$), katepsinom-K ($p=0.000$) i sklerostinom ($p=0.000$).

Tabela 5. Inter-korelacija merenih biomarkera.

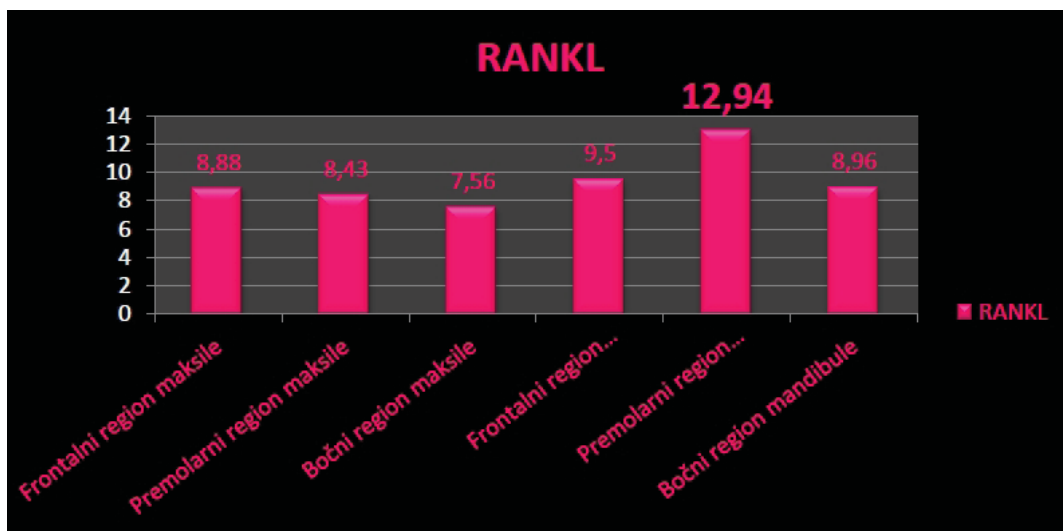
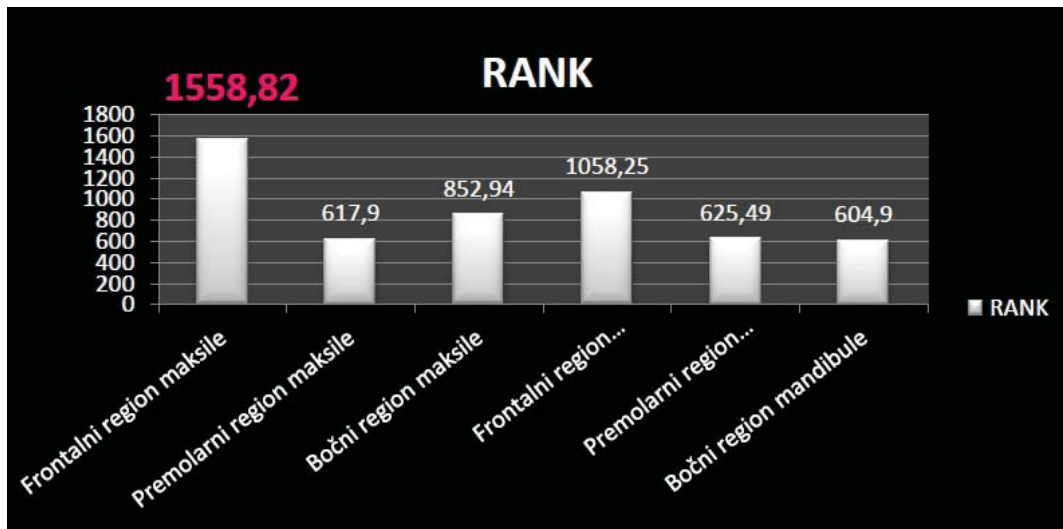
	RANK	sRANKL	OPG	Katepsin-K	Sklerostin	VEGF
RANK		R=0.329 p=0,026*	R=-0.835 p=0.091	R=-0.146 p=0.468	R=-0.821 p=0.089	R=-0.003 p=0.991
sRANKL	R=0.329 p=0,026*		R=0.147 p=0.239	R=0.860 p=0,000*	R=0.808 p=0,000*	R=0.086 p=0.617
OPG	R=-0.835 p=0.091	R=0.147 p=0.239		R=-0,156 p=0,207	R=0.018 p=0.852	R=0.170 p=0.323
Katepsin-K	R=-0.146 p=0.468	R=0.860 p=0,000*	R=-0,156 p=0,207		R=1.00 p=0,019*	R=-0.132 p=0.653
Sklerostin	R=-0.821 p=0.089	R=0.808 p=0,000*	R=0.018 p=0.852	R=1.00 p=0,019*		-
VEGF	R=-0.003 p=0.991	R=0.086 p=0.617	R=0.170 p=0.323	R=-0.132 p=0.653	-	

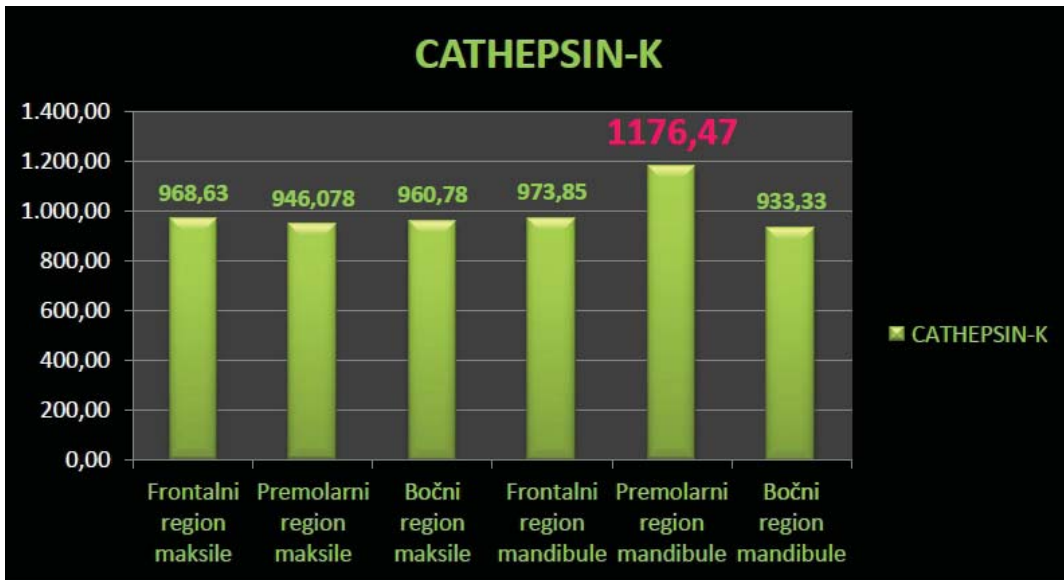
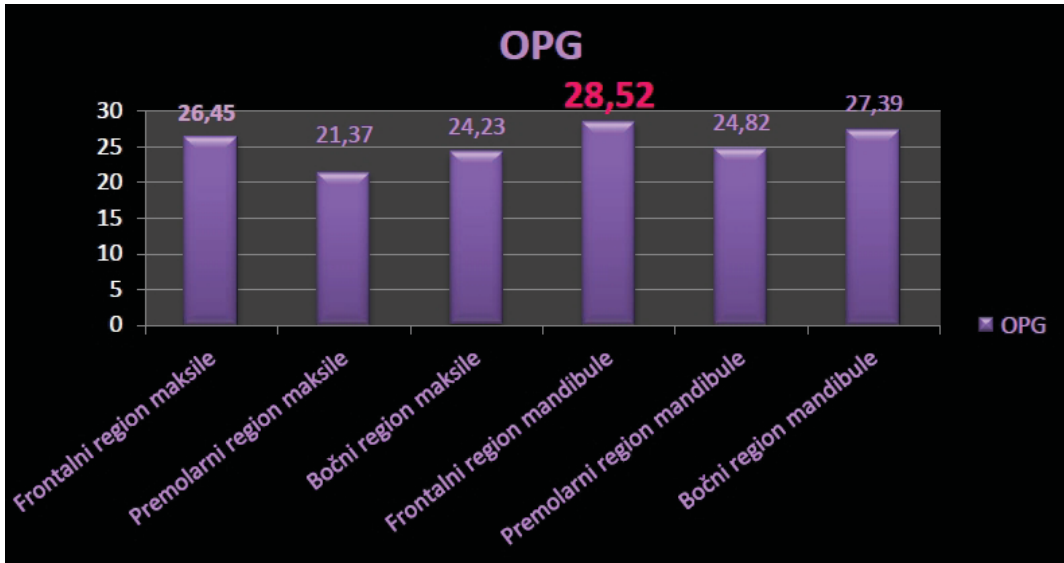
OPG nije pokazao nijednu pozitivnu korelaciju sa merenim biomarkerima, a katepsin-K i sklerostin su pored pozitivne korelacije sa sRANKL-om pokazali pozitivnu međusobnu pozitivnu korelisanost ($p=0.019$). VEGF nije pokazao ni jednu pozitivnu korelaciju sa merenim biomarkera.

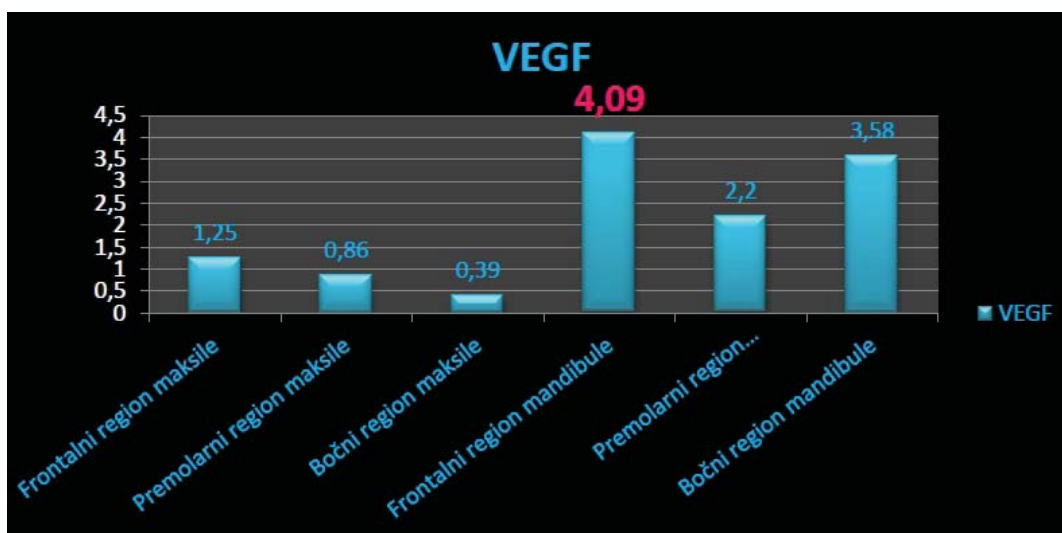
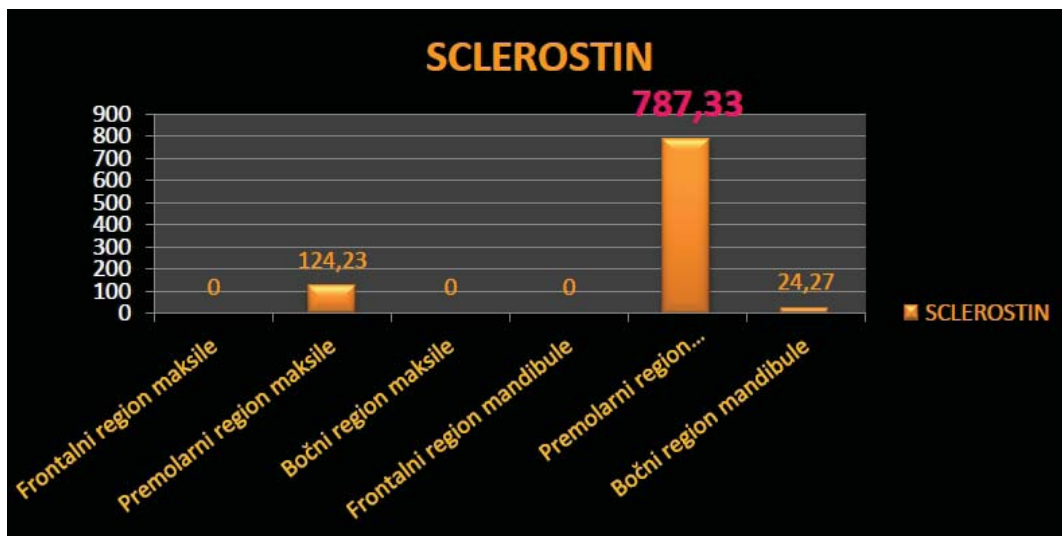
4.5. Distribucija vrednosti biomarkera u različitim regionima vilica

Distribucija vrednosti merenih biomarkera u različitim regionima vilica je istaknuta u okviru slike 5. Statističkom analizom distribucije vrednosti značajno veće vrednosti RANK-a su utvrđene u frontalnom regionu maksile u odnosu na premolarni region maksile ($p=0.022$), premolarni region mandibule ($p=0.04$) i bočni region mandibule

($p=0.021$). Takođe, utvrđeno je da su vrednosti OPG-a bile značajno veće u frontalnom regionu maksile ($p=0.045$) i bočnom regionu mandibule ($p=0.015$) u odnosu na premolarni region maksile. Vrednosti sRANKL-a, katepsina-K i sklerostina su bile najviše u premolarnom regionu mandibule, ali to nije bilo od statističke značajnosti. Sa druge strane, VEGF je bio najjišu u frontalnom regionu mandibule.





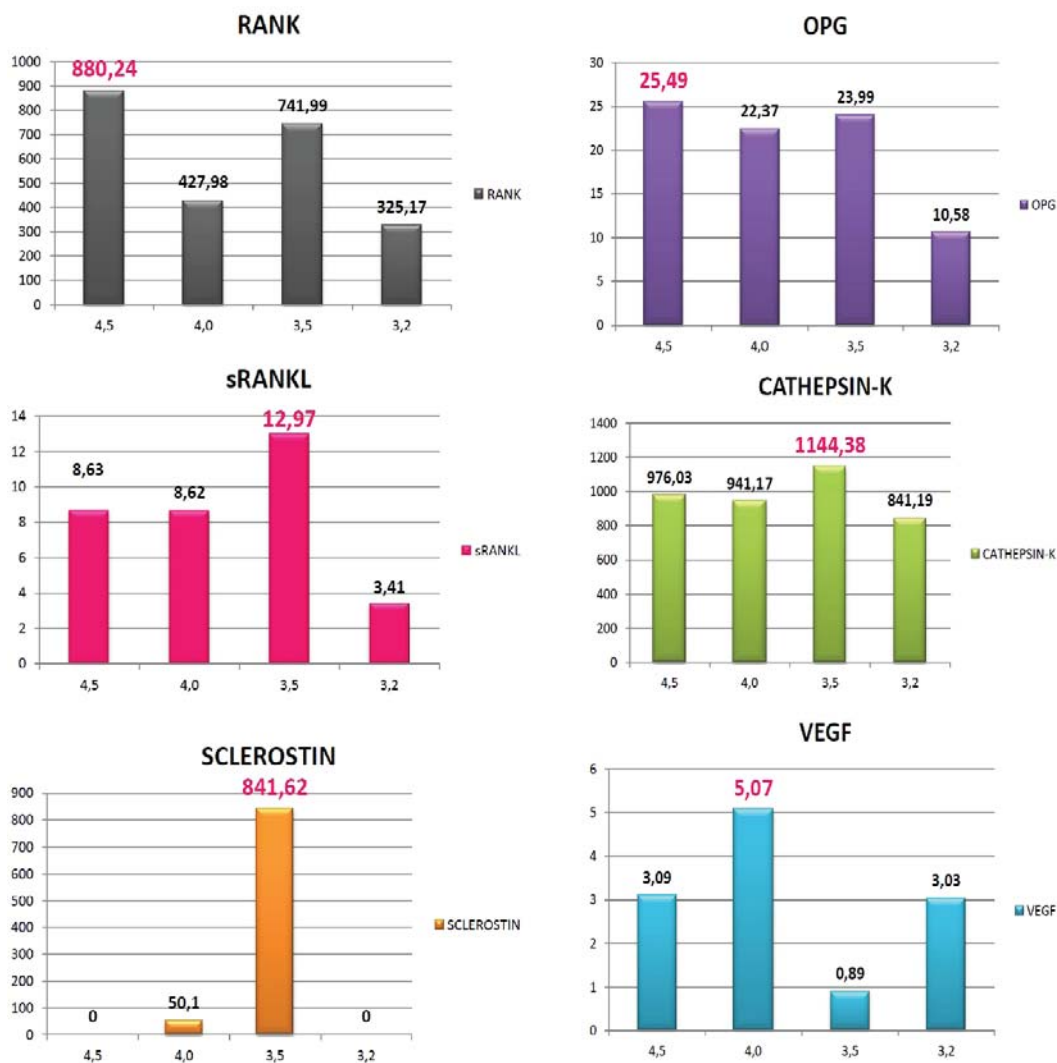


Slika 5. Distribucija vrednosti merenih biomarkera u različitim regionima vilica
*istaknute vrednosti predstavljaju srednju vrednost merenog biomarkera

4.6. Distribucija vrednosti biomarkera oko implantata različitih dijametara

Distribucija vrednosti biomarkera u peri-implantnoj tečnosti implantata različitog dijametara prikazana je u okviru slike 6. Statističkom analizom vrednosti u oko implantata različitog dijametara, utvrđeno je da je oko najvećeg dijametre, odnosno 4.5 bila značajno veća koncentracija RANK-a ($p=0.04$) i katepsina-K ($p=0.019$) u odnosu

na 4.0. OPG je takođe bio najviši u grupi dijametara od 4.5, ali nikakva statistička značajnost nije postignuta. Vrednosti sRANKL-a, katepsina-K i sklerostina su bile najviše oko dijametara 3.5, ali ni u ovim slučajevima ni jedna statistička značajnost nije potvrđena, kao ni za VEGF koji je u najvećoj koncentraciji bio prisutan oko implantata dijametara 4.0.



Slika 6. Distribucija vrednosti biomarkera oko implantata različitih dijametara

*istaknute vrednosti predstavljaju srednju vrednost merenog biomarkera

6. DISKUSIJA

5.1. Glavne opservacije

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su vrednosti RANK-a, sRANKL-a, OPG-a, sklerostina i VEGF-a u PICF uzorcima pacijentata sa peri-implantitisom bile značajno veće u odnosu na zdrava peri-implantna tkiva. Ovi markeri, sa izuzetkom VEGF su bili pozitivno korelisani sa kliničkim parametrima inflamacije (BOP i PD) i gubitka kosti (rCAL), što dodatno potkrepljuje njihov profil markera udruženih sa peri-implantitisom. Sa druge strane, vrednosti RANK-a, sRANKL-a i OPG-a nisu bile značajno drugačije između peri-implantitisa i peri-mukozitisa, ali su zato vrednosti sklerostina i VEGF-a bile značajno veće kod peri-implantitisa. Poređenjem vrednosti između peri-mukozitisa i zdravih peri-implantnih tkiva, utvrđeno je da su vrednosti RANK-a i katepsina-K bile značajno veće u grupi peri-mukozitisa. Vrednosti relativnog odnosa sRANKL/OPG nisu pokazale značajne razlike među grupama. Analiza međusobnih korelacija merenih biohemijskih markera pokazala je pozitivnu korelaciju sRANKL-a sa RANK-om, katepsinom-k i sklerostinom. U pogledu profila merenih biomarkera u različitim regionima vilica, utvrđeno je da je RANK bio značajno veći u frontalom regionu maksile u odnosu na bočni region maksile, takođe utvrđeno je da je OPG bio značajno veći u frontalnom regionu maksile i bočnom regionu mandibule, u odnosu na premolarni region maksile. Analizom vrednosti merenih biomarkera u PICF tečnosti implantata različitih dijametara, utvrđeno je da je oko implantata najvećeg dijametara (4.5) vrednost RANK-a i katepsina-K bila značajno veća u odnosu na dijametar od 4.0.

5.2. Profil biomarkera u različitim stanjima peri-implantnih tkiva

U literaturi su dostupni rezultati o distribuciji sRANKL, OPG i katepsina-K u PICF, ali iz razloga drugačijeg dizajna studije i odsustva rezultata za RANK, sklerostin i VEGF, komparacija u okviru diskusije će biti limitirana.

U implantologiji je sprovedeno svega 4 studije koje su merile RANKL i OPG u PICF. Monov i sar. (Monov i sar. 2006) su evaluirali sRANKL i OPG u 84 uzoraka PICF pacijenata sa različitim stanjem peri-implantnih tkiva. OPG nije bio identifikovan ni u jednom uzorku, dok je sRANKL je bio dokazan u 35% uzoraka, pri čemu nije demonstrirao nikakvu značajnu korelaciju između koncentracije i kliničkih parametara.

U sličnoj studiji (Arikan i sar. 2008) su određivali koncentraciju RANKL-a i OPG-a u PICF uzorcima peri-implantitisa, peri-mukozitisa i zdravih peri-implantnih tkiva. OPG je detektovan u 79% uzoraka i pokazao je značajnu korelaciju sa BOP, dok je sRANKL detektovan u samo 12% i nije pokazao nikakve korelacije sa kliničkim znacima inflamacije. Autori nisu istakli odnos i statističku značajnost vrednosti merenih biomarkera između grupa. U našoj studiji postigli smo stopostotnu detektibilnost i za sRANKL i za OPG, i utvrdili smo pozitivnu korelaciju sa svim kliničkim parametrima peri-implantne patologije, sa izuzetkom OPG/PI korelacije koja nije bila značajna. Ove diskrepance između naših rezultata i rezultata pomenutih studija su potencijalno uzrokovane različitim kitovima i metodologijom koja je primenjena, jer smo u našoj studiji koristili visokosenzitivne kitove za ELISA koji su imali niži detekcioni limit od kitova, primenjenih u pomenutim studijama. Za sRANKL smo upotrebili kit sa amplifikovanom senzitivnošću i detekcionim limitom od 0.02 pmol/L, dok su u drugim studijama upotrebljeni kitovi sa 4 puta manjom senzitivnošću.

Novija studija koja je takođe pokazala udruženost visoke koncentracije OPG sa peri-implantitisom u odnosu na zdrava peri-implantna tkiva, ali nisu uspeli da pokažu značajne razlike za sRANKL (Arikan et al. 2011). Naši rezultati su takođe u saglasnosti sa rezultatima Duarte i sar. (Duarte i sar. 2009) koja je pokazala da je povećana ekspresija gena za RANKL i snižen relativan odnos RANKL/OPG svojstven peri-implantitisu. Naš nalaz o sniženom relativnom odnosu ova dva biomolekula korespondira rezultatima Arikana i sar. (Arikan i sar. 2011).

Strbac i sar. (Strbac i sar. 2006) su u svojoj studiji ispitivali korelaciju koncentracije katepsina-K sa peri-implantitisom i sa odgovarajućim kliničkim parametrima. Autori su pokazali da su koncentracije proteina, normalizovane prema vremenu uzorkovanja bile značajno veće u peri-implantitisu i bile su pozitivno udružene sa dubinom sondiranja i odgovarajućim indeksima krvarenja i plaka. Međutim, kada su vrednosti normalizovane

prema zapremini absorbovanog volumena, nije registrovana značajna razlika između peri-implantitisa i zdravih tkiva, što odgovara našim rezultatima, i utvrđena je značajna negativna korelacija sa PD i PI, što nije usaglašeno sa našim rezultatima, gde smo mi potvrdili značajno pozitivnu korelaciju samo sa PI.

U drugoj studiji Yamalik (Yamalick i sar. 2011) sa saradnicima je upoređivao aktivnost katepsina-K između različitih stanja zdravlja parodontalnih i peri-implantnih tkiva, i pokazao je da je aktivnost enzima bila značajno veća kod peri-implantitisa u odnosu na peri-mukozitisa, a da nije postojala značajna razlika u aktivnosti enzima između peri-mukozitisa i zdravih peri-implantnih tkiva, zaključujući da je aktivnost katepsina-K pozitivno udružena sa gubitkom kosti, a ne sa inflamacijom koja ne uključuje osteoklastogenezu.

U studiji novijeg datuma, Yamalik i saradnici (Yamalick i sar. 2012) su merili aktivnost katepsina-K u različitim stanjima zdravlja potpornih tkiva prirodnih zuba i implantata, a zatim su upoređivali vrednosti između ispitivanih grupa. Grupa autora je pokazala da ne postoje značajne razlike u aktivnosti proteina između odgovarajućih stanja u prirodnoj i implantnoj denticiji, takođe, pokazali su da postoji značajna razlika u aktivnosti katepsina-K između peri-implantitisa i peri-mukozitisa, između peri-implantitisa i zdravih peri-implantnih tkiva, kao i između peri-mukozitisa i zdravih tkiva. Pokazali su takođe pozitivnu korelaciju ovog enzima sa PD i gingivalnim indeksom, i predložili su ovaj marker kao adekvatan biohemijski marker gubitka potporne kosti implantata i prirodnog zuba. U našoj studiji uočili smo značajno veću koncentraciju katepsina-K u grupi peri-mukozitisa, i nismo uočili značajnu korelaciju ovog markera sa gubitkom kosti, kako je jedina značajna korelacija postignuta sa PI. Ali treba imati u vidu da su primenjene različite metode dokazivanja, i da aktivnost ne mora da bude obligatno korelisana sa stvarnom koncentracijom proteina.

Prema našem najboljem saznanju, ova studija predstavlja prvu studiju koja se bavi određivanjem koncentracije RANK-a u PICF pacijenata sa peri-implantitisom, peri-mukozitisom i zdravim peri-implantnim tkivima. Interakcija RANK/RANKL/OPG predstavlja kompleksan regulatorni proces u homeostazi osteoklasta (Crotti i sar. 2003, Nagasawa i sar. 2007), pri čemu je podložan uticaju brojnih faktora poput zdravstvenog statusa, hormonskog i metaboličkog statusa, konzumiranje lekova i stepena funkcije kosti (Theoleyre i sar. 2004, Taubman i sar. 2005, Yoshinaga i sar. 2007). Stimulacija

RANK-a dovodi do pokretanja kaskade Nf-kB što pokreće i intezivira biosintezu pro-inflamatornih citokina (Nichols i sar. 2001, Koide i sar. 2010). RANK receptor je istovremeno visoko aktiviran auto-ligacijom indukovanom povećanim koncentracijama pro-inflamatornih citokina i LPS (Kanazawa i sar. 2005, Bostanci et al. 2007, Dutzan et al. 2009, Otero i sar. 2010), što ukazuje na potencijalni mehanizam infalamcije u peri-implantitisu. Uzimajući u obzir navedene karakteristike ovog receptora, i naše nalaze da gde je RANK ubedljivo veći u uslovima peri-mukozitisa i još više u uslovima peri-implantitisa u odnosu na zdrava peri-implantna tkiva, RANK bi mogao da se razmotri kao jedan od ključnih karika u inflamatornoj osteoklastogenezi u peri-implantitisu. Kako su vrednosti RANK-a u peri-implantitisu bile veće 3-5 puta u odnosu na zdrava peri-implantna tkiva, može se zaključiti da je njegova aktivacija i eferentna aktivnost bila recipročno uvećana, što ukazuje na posledično pojačavanje čitavog osteoklastnog metabolizma. Paralelno, pravilo u fiziologiji receptora je da se intezitet eferentne reakcije srazmerno povećava sa brojem ligand-receptor interakcija, a mi smo takođe pokazali da je sRANKL bio značajno veći u peri-implantitisu u odnosu na zdrava tkiva, i pokazali smo da su receptor i ligand pozitivno korelisani, što neosporno potvrđuje još jedan mehanizam inteziviranja osteoklastogeneze posredovan RANK-om.

Imunološka hiper-senzitivnost prisutna u peri-implantitisu (Berglundh et al. 2011) može potencijalno biti zasnovana na porastu RANK-a uočenom u peri-implantitisu. Takođe, treba uzeti u obzir značajno veći koncentraciju pro-inflamatornih citokina oko zdravih implantata u donosu na parodontološki zdrave zube što je pokazao Nowzari sa saradnicima (Nowzari i sar. 2010). Ove povećane koncentracije pro-inflamatornih citokina mogu delovati na RANK i njegovu aktivnost, i time dodatno pojačati osteoklastogenezu u peri-implantitisu. Uzimajući u obzir navedeno i činjenicu o masivnoj koštanoj destrukciji prisutnoj u peri-implantitisu koja histološki odgovara lezijama agresivne parodontopatije, RANK bi mogao da bude potencijalni nosilac ovog obrasca.

Naši rezultati su pokazali da je RANK bio značajnije veći i u peri-implantitisu i u peri-mukozitisu u odnosu na zdrava peri-implantna tkiva, ali razlika između vrednosti peri-mukozitisa i peri-implantitisa nije bila značajno drugačija, iako su vrednosti u grupi peri-implantitisa bile vidno veće. Potencijalan razlog ovakvog profila je pozitivna zavisnost RANK-a od koncentracija pro-inflamatornih citokina i stimulacije

parodontopatogenima, koji su već uveliko i značajno povećani u uslovima peri-mukozitisa (Petkovic i sar. 2010). Takođe, u grupi peri-mukozitisa je bilo nekoliko značajno većih vrednosti u odnosu na ostale vrednosti što bi potencijalno moglo da znači da su to bile prodromalne faze peri-implantitisa. Bilansno, RANK se može usvojiti kao neosporni biomarker peri-implantne inflamacije, ali koji iz razloga afektiranosti ushodnim regulatornim faktorima prisutnim u predhodnom razvojnom stadijumu inflamacije, ne može pouzdano ukazati na eksteniranje inflamacije iz mekih tkiva na koštano tkivo.

U istraživanju smo, takođe merili koncentraciju solubilne forme RANKL-a, koja predstavlja indirektnu meru RANKL-a (Walsh et al. 2003), i iako u predhodnim istraživanjima istraživači nisu uspjeli da postignu korelaciju sRANKL-a sa peri-implantitisom, mi smo pod našim protokolom uspjeli da postignemo statistički značajnu udruženost ovog biomarkera sa peri-implantitisom. Takođe smo pokazali značajnu pozitivnu korelaciju ovog biomarkera sa svim merenim kliničkim parametrima i sa rCAL-om kao indikatorom gubitka marginalne kosti, ali nismo pokazali da se koncentracija ovog molekula značajno razlikuje između peri-implantitisa i peri-mukozitisa. Objašnjenje za ovu pojavu bi moglo da bude slično kao za RANK, zato što je ekspresija RANKL-a direktno stimulirana povećanom koncentracijom pro-inflamatornih citokina i LPS, neminovnih faktora peri-mukozitisa. Iz tog razloga možemo zaključiti je s RANKL pouzdani marker peri-implantitisa, ali da nema dovoljni potencijal razlikovanja inflamacije u mekom i koštanom tkivu.

Rezultati istraživanja su takođe pokazali da je povećana koncentracija OPG udružena sa peri-implantnom inflamacijom, što je suprotno profilu ovog biomarkera u uslovima parodontalne inflamacije. Visoke koncentracije OPG su udružene sa parodontalnom inflamacijom pacijenata sa dijabetes melitusom tip-1 (Lappin et al. 2009), ali je takođe udružen sa parodontalnim zdravljem kod sistemski zdravih pacijenata (Crotti et al. 2003, Bostanci et al. 2007). Ovo treba razmotriti zajednos sa činjenicom da se dijabetes melitus karakteriše imunološkom hiper-senzitivnošću što ga čini sličnim sa peri-implantitisom i to nudi potencijalno objašnjenje za isti profil OPG-a u ova dva oboljenja.

Takođe, pokazali smo da su sRANKL i OPG statistički značajno povišeni u peri-implantitisima u odnosu na zdrava peri-implantna tkiva, ali ne i u odnosu na peri-mukozitis niti između peri-mukozitisa i zdravih peri-implantnih tkiva, što ukazuje da je ovaj marker upotrebljiv za razlikovanje peri-implantitisa od zdravog peri-implantnog tkiva, ali da nije podoban za razlikovanje prelaza iz stanja zdravlja u peri-mukozitis, odnosno za blaže forme inflamacije. Ovaj nalaz je takođe bitan jer ukazuje na to da su ova dva markera udružena sa stanjem gubitka kosti i da su nespecifično distribuirani u uslovima inflamacije ograničene na meka tkiva.

Sklerostin je negativni faktor koštane formacije koji deluje na nivou osteocita, inhibirajući oseosintezu na više načina. Ovaj biomolekul se dovodi u vezu sa koštanom resorpcijom kosti koja uzrokovana ne adekvatnim opterećenjem kosti, ali u smeru smanjenog ili potpunog odsustva opterećenja i ankiloze. Ankiloza je najverovatnije razmotrena jer nedostatak amortizacionog tkiva dovodi do neravnomerne distribucije opterećenja, pa su neke partije kosti ne opterećene, a neke su, sa druge strane, preopterećene. Dodatno, često se u ovakvim uslovima teži ka namenskom smanjenju opterećenja fragilnih regiona što sigurno afektira sam metabolizam kosti.

U literaturi ne postoje dostupni podaci o profilu sklerostina u peri-implantnim tkivima, niti u parodontalnim tkivima. Sklerostin bio mogao da bude značajan regulator metabolizma peri-implantne potporne kosti iz razloga jer je veza implantata i kosti po svojoj strukturi ankilotična. Kliničari su često orijentisani ka rasterećivanju imlnatata u cilju prevencije dejstva ekcesivnih sila, a vrlo je teško postići pravu meru opterećenosti implantata i ovaj parametar je teško proverljiv. Iz tog razloga postoji niz istraživanja koja se bave standardizacijom protokola za utvrđivanje stepena opterećenosti implantata. Istovremeno, sklerostin je pozitivno regulisan pro-inflamatornim citokinima, što ga dodatno opravdava kao potencijalni biomarker gubitka kosti u peri-implantitisu. U našem istraživanju sklerostin je bio jedini biomarker koji nije bio detektovan u 100% testiranih uzoraka, pri čemu se i na malom broju pozitivnih uzoraka pokazalo da je ovaj marker bio statistički veći kod peri-implantitisa u odnosu, ne samo na zdrava peri-implantna, već i na peri-mukozitise. Razmatrajući rezultate u celosti, uključujući dosta negativnih nalaza i ubedljivu razliku između peri-implantitisa i oba stanja u kojima nije bio prisutan gubitak kosti, moglo bi se zaključiti da je sklerostin u porastu u uslovima ne adekvatnog opterećenja kosti. Uzimajući u obzir da nisu svi uzorci peri-implantitisa

bili pozitivni na ovaj biomarker, a da su oni koji su bili pozitivni pokazali izuzetno visoke koncentracije sklerostina i uzimajući u obzir stimulatívni efekat pro-inflamatornih citokina na sklerostin, najverovatniji obrazac sklerostina je on u porastu u uslovima ne adekvatnog opterećenja i da je dodatno stimulisan lokalnom inflamacijom. To navodi na zaključak da bi sklerostin mogao da bude biomarker peri-implantitisa uzrokovanog ne adekvatnom distribucijom biomehaničkih sila, što je jedan od dva osnovna etiološka faktora peri-implantitisa, a kako je ne moguće da se peri-implantitis razvije bez infekcije, ovaj faktor čini da se koncentracija sklerostina toliko razlikuje u peri-implantitisu u odnosu na peri-mukozitis i zdrava peri-implantna tkiva. U cilju utvrđivanja precizne biologije i obrasca ponašanja ovog biomolekula kao osnovnog preduslova za utvrđivanje njegovog profila kao biomarkera, neophodno je sprovesti detaljnija istraživanja usmerena ka utvrđivanju korelacije između koncentracije sklerostina i okluzije, odnosno opterećenosti implantata, kao i prospektivne studije radi determinisanja profila ovog biomolekula u peri-implantnim tkivima.

VEGF predstavlja jedan od najznačajnijih mitogena za endotelne ćelije, tkivnu remodelaciju, zarastanje rana i inflamatorne procese. Međutim, VEGF predstavlja regulatorni faktor osteoklastogeneze u procesu gubitka kosti. U implantologiji ne postoje dostupni podaci o profilu ovog faktora rasta, dok u parodontologiji postoje svega dva rada koja su se bavila ulogom VEGF-a u patogenezi parodontopatije. Booth i saradnici (Booth i sar. 1998) su određivali VEGF u parodontalnom tkivu i GCF pacijenata sa parodontopatijom i kod pojedinaca sa zdravim parodontalnim tkivima. Utvrdili su da je VEGF bio eksprimiran na endotelnim ćelijama, neutrofilima, plazma ćelijama, i ćelijama pripojnog epitela, mekog zida parodontalnog džepa i gingivalnog tkiva. Utvrdili su da je totalna koncentracija faktora rasta bila značajno veća kod obolelih u odnosu na zdrave, međutim kada je bila preračunata u odnosu na absorbovani volumen GCF, situacija je bila obrnuta. Takođe su ispitivali korelaciju sa kliničkim parametrima i utvrdili su značajno pozitivnu korelaciju sa PI. U drugoj studiji Suthin i sar. (Suthin i sar. 2003) su evaluirali ekspresiju VEGF u gingivalnim fibroblastima na stimulaciju različitim faktorima virulencije iz *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Porphyromonas gingivalis*, i utvrdili su da je nivo ekspresije značajno povećan kao odgovor na stimulaciju ispitivanim faktorima virulencije.

Zasnovano na ovim nalazima, promovisali su ovaj obrazac i sam faktor rasta kao značajne u patogenezi parodontopatije.

VEGF je ispitivan u ortopediji u cilju ispitivanja njegovog ponašanja tokom procesa odbacivanja titanijumskih implantata. Miyanishi i sar. (Miyanishi i sar. 2003) su u svojoj studiji ispitivali ekspresiju VEGF-a i njegovog receptora u 10 peri-protetskih tkiva izgubljenih proteza, kvantifikovali su efekat titanijumskih partikula na oslobađanje VEGF-a, intracelularnu signalizaciju i VEGF-zavisnu hemotaksu u primarnoj humanoj kulturi monocita/makrofaga. Utvrdili su da je povećanu ekspresiju VEGF i receptora u peri-protetskom tkivu, izlaganje kulture monocita/makrofaga rezultovalo je u povećanoj ekspresiji VEGF-a i intracelularnom aktivacijom fosforilacije p44/42 mitogenom aktivirane protein kinaze i VEGF-zavisnom hemotaksom. U ranijim istraživanjima koja su se bavila biologijom VEGF već je pokazano da ovaj faktor rasta ima značajan efekat na osteoklastogenezu tokom procesa gubitka kosti (Niida i sar. 1999, Nakagawa i sar. 2000) Takođe je pokazano da VEGF direktno stimuliše hemotaksu i proliferaciju pre-osteoklasta (Matsumoto i sar. 2002) i usvojeno je da povećana ekspresija VEGF potekom od, ne bitno kog izvora, očekivano pojačava osteolitičke procese. Miyanishi i sar. (Miyanishi i sar. 2003) su upravo to pokazali i potvrdili složenim i sistematskim ispitivanjem na svim regulatornim novcima peri-protezne osteolize.

U našoj studiji pokazali smo da je koncentracija VEGF bila signifikantno povećana u peri-implantitisu i u odnosu na zdrava peri-implantna tkiva, ali i u odnosu na peri-mukozitis što ima poseban značaj. Ovakav nalaz bi mogao da ukaže na to da VEGF nije svojstven klasičnoj peri-implantnoj inflamaciji koja je prisutna u peri-mukozitisu, već da je svojstven inflamatornoj osteoklastogenezi, odnosno da je potencijalno udružen sa osteolizom kao reakcijom na titanijum.

Površina proizvedenog implantata predstavlja modifikovanu titanijumsku leguru koja je biokompatibilna. Titanijum, inicijalno, predstavlja visokoreaktivni element koji se oksidiše pod uticajem kiseonika u nanosekundi, a u slučaju oralnih implantata, namenski se modifikuje tokom procesa proizvodnje u cilju povećanja biokompatibilnosti i oseoprijemčivosti. Međutim, oksidovani odnosno modifikovani titanijum predstavlja samo jedan površinski sloj implantata koji se u funkciji vremena menja pod uticajem različitih faktora poput biofluida, njihovog sastava i karakteristika

koje mogu varirati i pod uticajem lokalne infekcije, između ostalog. Miyanihi i sar. (Miyanihi i sar. 2003) su pokazali da izlaganje makrofaga titanijumskim partikulama rezultira u oslobađanju VEGF dozom i vremenski zavisnim mehanizmom, odnosno da je koncentracija u pozitivnoj korelaciji sa količinom stimulusa i dužinom ekspozicije. Uzimajući to u obzir, moguće je da se implantna površina tokom vremena postepeno menja, da kontinuirano deluje na makrofage i da se u jednom trenutku dostiže pik efekta.

Ekspresija VEGF je intezivno stimulirana faktorima virulencije parodontopatogena uzročnika peri-implantne infekcije (Suthin i sar. 2003), čime dolazi do intezivne stimulacije osteoklastogeneze posredovane VEGF-om. Dalje, VEGF stimuliše makrofage, njihovu hemotaksu i njihovu aktivnost, a makrofagi ekspimiraju i oslobađaju brojne zapaljenske medijatore (stimulatore osteolize) poput $TNF\alpha$, IL-1, IL-6, želatinaze-A i makrofagnog inflamatornog proteina-1 α (Xu i sar. 1996, Goodman i sar. 1998, Nakashima i sar.1999a, Nakashima i sar.1999b), ključnih medijatora inflamatorne osteoklastogeneze. Kako titanijumske čestice, dodatno i intezivno stimulišu VEGF, može se pretpostaviti da obrazac VEGF-om stimulirane osteoklastogeneze zauzima značajnu ulogu u inflamatornoj osteoklastogenezi zastupljenoj u peri-implantitisu.

Rezultati su pokazali da je visoka koncentracija VEGF-a pozitivno udružena sa peri-implantitisom i da je značajno veća nego u oba druga stanja, što sugerise da bi ovaj marker mogao da bude direktni biomarker peri-implantitisa. Međutim, nismo uspeli da postignemo ni jednu značajnu korelaciju sa kliničkim parametrima što bi moglo da ukaže na to da postoji neki jedinstveni faktor koji determiniše profil ovog biomarkera i u odnosu na koji bi trebalo profilisati VEGF.

Radi preciziranja mehanizma dejstva i profila VEGF-a kao biomarkera, trebalo bi ispitati promenu karakteristika implantnih površina u funkciji vremena, i trebalo bi direktno ispitati uticaj različitih implantnih površina i njenih inicijalnih modifikacija i modifikacija tokom vremena na ekspresiju VEGF-a, jer je moguće da implantne površine u određenim uslovima i sastavu čine titanijum imuno reaktivnim.

5.3. Profil biomarkera u različitim regionima vilica i oko implantata različitih dijametara

Gornja i donja vilica kao i njihovi različiti regioni se razlikuju po svojoj histologiji i morfologiji, i te razlike modifikuju lokalni koštani metabolizam. Kako koštani biomarkeri koji su ispitivani u ovoj studiji predstavljaju regulatore koštanog metabolizma, od značaja je bilo utvrditi profil njihovih vrednosti u različitim regionima vilica kako bi njihova standardizacija kao biomarkera bila preciznija. U našoj studiji mi smo ispitali distribuciju koncentracija biomarkera u različitim regionima vilica koje smo podelili u šest delova: frontalni, premolarni i bočni region svake vilice odvojeno. Ovakvo klasterovanje je smanjilo statistički uzorak, i kako raspodela zastupljenih implantata nije bila ravnomerna ni po regionima ni po grupama, ovo treba uzeti u obzir kao potencijalno ograničenje prilikom tumačenja dobijenih rezultata. Biomarkeri su pokazali različitu distribuciju koncentracija u različitim regionima, ali regioni koji su se istakli po najvišim koncentracijama merenih biomarkera bili su frontalni region maksile u kome je bila najveća koncentracija RANK-a, frontalni region mandibule u kome su bile najveće koncentracije OPG-a i VEGF-a, premolarni region mandibule u kome su bile najviše koncentracije sRANKL-a, katepsina-K i sklerostina. Prilikom statističke analize distribucije biomarkera, frontalni region maksile je pokazao značajno više vrednosti RANK-a i OPG-a u odnosu na premolarni region maksile. Bočni region mandibule je takođe pokazao statistički značajno višu vrednost OPG-a u odnosu na premolarni deo maksile. Potencijalni razlog zašto su statističke značajnosti postignute baš između ovih regiona jeste što su ovi regioni bili procentualno najbrojniji. Međutim, kako je frontalni region maksile bio ubedljivo najzastupljeniji u grupi peri-implantitisa (25.8), a premolarni region maksile skoro najmanje zastupljen (9.7%), i kako je na relativnom malom uzorku jasna značajnost postignuta između ove dve grupe, to potkrepljuje jasno utvrđene razlike u distribuciji biomarkera gubitka kosti između ova dva regiona, sugerišući da je frontalni region maksile karakterisan intenzivnom koštanom resorpcijom, a da je premolarni region maksile karakterisan znatno manjom koštanom resorpcijom i uravnoteženim koštanim metabolizmom.

Dijametar implantata i njegova udeo u definitivnom ishodu implantne terapije predstavlja klinički i naučni izazov. U kliničkom smislu postoji opšta težnja za

paostavljanje implantata što većeg promera što zadovoljava biomehantičke zahteve, ali je biološka granica i idealni odnos biološkog i biomehantičkog preduslova idalje nedefinisan. Ivanoff i sar. (Ivanoff i sar. 1999) su u svojoj studiji pokazali pozitivnu korelaciju između gubitka implantata i dijametra implantata i utvrdili su najveći procenat gubitka implantata u grupi sa najvećim dijametrom koji je u njihovom slučaju iznosio 5.0mm. Ovaj rezultat je kompatibilan sa našim rezultatima gde su najveći procenat implantata sa peri-implantitisom činili implantati najvećeg promera, odnosno 4.5mm u našoj studiji (45%). Procentualno najzastupljeniji implantati u celom istraživanju su bili implantati dijametra 4.0mm i 4.5mm i to je potencijalni razlog zašto su, i pored vidljivih razlika i u ostalim dijametrima, statsitičke značajnosti postignute samo između ove dve grupe. Utvrdili smo da su i RANK i katepsin-K bili značajno veći u PICF implantata sa dijametrom od 4.5mm u odnosu na implantate od 4.0mm. Postizanje statističke značajnosti na relativno malom uzorku i između dijametara koji se razlikuju za samo 0.5mm ukazuje na to da dijametar značajno alterira metabolizam kosti.

5.4. Smernice za dalje istraživanje

Određivanje biomarkera u PICF u cilju definisanja stanja peri-implantnih tkiva nesumnjivo predstavlja obećavajući dijagnostički protokol iz razloga jer se registruju elementi aktuelnog koštanog metabolizma, i time se dobija pouzdana informacija o aktuelnim dešavanjima u kosti. Međutim postoje određeni faktori koji se moraju precizno izdiferencirati kako bi metoda bila standardizovana i time davala precizne rezultate koji se interpretiraju sa sigurnošću.

Jedan od faktora jeste biološki faktor, koji se odnosi na kompleksnu i multifaktorsku prirodu procesa, kao i preplitanje nekoliko mehanizama. Naime, razmatranjem koštanog metabolizma i inflamatorne osteoklastogeneze, ovom procesu predhodi zapaljenski proces u mekom tkivu, i dolazi do preplitanja velikog broja medijatora koje mi uzimamo kao biomarkere između dva procesa, iz prostog razloga jer su etiološki faktori peri-implantitisa i peri-mukozitisa zajednički. Takođe, može se očekivati da su inflamatorni medijatori najkoncentrisaniji u početnoj, odnosno akutnoj fazi upale i da u

određenom trenutku dostižu svoj pik na kome se, jednostavno, zadržavaju i sprovode svoj patogeni efekat koji rezultuje ekstenzivanjem inflamacije. To bi moglo da bude potencijalno objašnjenje zašto izuzev dva visoko faktor-specifična biomarkera nijedan od merenih markera nije bio značajno drugačiji između peri-implantitisa i peri-mukozitisa. Dodatno, značajno veća koncentracija katepsina-K, jednog od najpouzdanijih markera koštanog gubitka, je bila značajno veća u peri-mukozitisu nego kod zdravih peri-implantnih tkiva, što može da ukaže upravo na taj udarni skok na samom početku zapaljenskog procesa. Peri-mukozitis neminovno predstavlja stadijum koji predhodi peri-implantitisu iz razloga što reakcija tkiva na biofilm počinje u kontaktnoj zoni, počevši od tkiva peri-implantnog sulkusa, a zatim se proces apikalno ekstenzira ka kosti. U uslovima traume, takođe dolazi do reakcije mekih tkiva koja trpe i mehaničku iritaciju i koja predstavljaju glavni izvor i time lokalizaciju početka inflamacije iz razloga vaskularne mreže, odnosno fiziološkog mesta početka inflamacije. Kako je osnovni etiološki faktor i peri-implantitisa i peri-mukozitisa infekcija, i kako je uprkos svim istraživanjima savremeni stav da nezavisno od svih ostalih etioloških faktora, infekcija predstavlja uvek prisutnu komponentu u oba zapaljenska procesa, peri-mukozitis se može usvojiti kao razvojni stadijum peri-implantitisa, odnosno kao njegova prodromalna faza. Iz tog razloga, trebalo bi ispitati da li dužina perzistiranja inflamacije afektira profil ovih biomarkera, recimo na osnovu kvantitativne i kvalitativne karakterizacije profila inflamacije, uključujući profil citokina ili inflamatornih ćelija, na osnovu čega se utvrđuje "starost" zapaljenja. Na taj način bi se precizno moglo utvrditi biološko ponašanje ispitivanih biomolekula.

Sa druge strane, određivanje specifičnih biomarkera, odnosno biomarkera koji su udruženi sa inflamacijom ali koji imaju određenu biološku specifičnost, kao što bi se za sklerostin mogao uzeti stepen opterećenja, odnosno uticaj okluzalnih sila, ili u slučaju VEGF-a potencijalna reakcija na karakteristike titanijumske legure, imaju veliki značaj jer ove karakteristike svakako daju biološki i klinički značajne informacije koje se ne mogu dobiti ni jednim drugim dijagnostičkim metodom. Ova dva markera imaju posebnu vrednost jer su bili ne samo značajno, već i ubedljivo veći u peri-implantitisu nego u oba druga dva stanja što ukazuje na komponentu koštanog gubitka uzrokovanu određenim i specifičnim uzrokom, a ne samo inflamatornim procesom.

Drugi faktor koji bi trebalo da bude jasno diferenciran da bi metoda bila precizno diferencirana, jeste protokol sakupljanja i određivanja samih biomarkera. Još uvek ne postoji idealna metoda za određivanje biomarkera u GCF i PICF, čemu je najznačajniji razlog mala količina uzorka i niska koncentracija biomolekula u samom uzorku. Ovaj problem diktira upotrebu sofisticiranih i nestandardnih aparata za merenje same tečnosti, kao što je periotron i paralelno upotrebu dijagnostičkih kitova koji su daleko senzitivniji od komercijalnih kitova za svakodnevnu laboratorijsku dijagnostiku. Takođe, prilikom standardizacije biomarkera, neophodni je utvrditi interval vrednosti karakterističan za različita stanja, koji podrazumeva da opseg vrednosti treba da bude srednja vrednost biomarkera ± 3 standardne devijacije pri čemu da ni donja ni gornja vrednost ne ulaze u opseg vrednosti predhodnog ili narednog razvojnog stadijuma oboljenja. Sa tako niskokoncentrovanim uzorkom malog volumena, kao što je GCF/PICF, veoma je teško dostići ovakve intervale vrednosti. Takođe, primenjivanje standardni protokola standardizacije kao što je preračunavanje koncentracije na nivou određenog volumena, kao što se određuje nivo glukoze u tačno određenom broju mililitara krvi, u slučaju ovako niskih koncentracija i volumena, postavlja se pitanje da li je primenljivo. Naime, GCF/PICF predstavljaju eksudat, eksudacija je direktno proporcionalna inflamaciji i iz tog razloga veliki volumen sadrži proporcionalno više medijatora. Međutim produkcija GCF/PICF kao i salivacija predstavlja individualnu karakteristiku pojedinca što rezultuje time da volumen izlučenog fluida varira od izrazito niskih do izrazito visokih vrednosti i u uslovima zdravlja i u patološkim uslovima. Navedena pojava zajedno sa prilično oskudnim uzorkom poput GCF/PICF svakako povećava rizik od nepouzdanih rezultata. U brojnim studijama su upoređivane koncentracije biomarkera preračunate prema vremenu uzorkovanja, odnosno koncentracija dobijena iz reprezentativnog volumena uzorka i koncentracije preračunate prema zapremini absorbovanog fluida, i dobijeni rezultati su pokazali da razlike koje su bile značajne u punoj koncentraciji uzorka, kada su preračunate prema volumenu absorbovanog uzorka, ne samo da nisu bile značajne, nego su bile invertne. To navodi na zaključak da bi za tako zahtevan uzorak poput PICF bilo primerenije primenjivati metod koncentracije prema vremenu uzorkovanja. Dodatno, ukoliko razmatramo biomarkere kao dijagnostički alat u kliničkoj praksi, ovaj metod bi bio daleko primenljiviji jer je lakši za sprovođenje od upotrebe osetljivog periotrona koji iziskuje

laboratorijsko znanje, iskustvo i veštinu za kalibraciju. Iz tog razloga, možda bi težnja daljih istraživanja trebalo da bude usmerena ka standardizaciji protokola određivanja koncentracije preračunate prema vremenu uzorkovanja.

Evaluacija biomarkera gubitka kosti u PICF predstavlja obećavajući dijagnostički alat za procenu stanja peri-implantnih tkiva. Iz razloga složenosti lokalnog metabolizma kosti regulisanog nizom faktora vezanih za varijacije samog tkiva, stanja lokalnih tkiva i karakteristika implantata, niz detaljnih istraživanja je neophodan kako bi se metoda standardizovala tako da daje precizne informacije o peri-implantnim tkivima.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem koncentracije RANK-a, sRANKL-a, OPG-a, katepsina-K, sklerostina i VEGF-a možemo izvesti sledeće zaključke:

- RANK, sRANKL, OPG, sklerostin i VEGF su biomarkeri koji su udruženi sa peri-implantitisom bazirano na distribuciji njihove koncentracije i pozitivne korelacije sa kliničkim parametrima peri-implantitisa. Među njima se izdvajaju sklerostin i VEGF koji su značajno veći u peri-implantitisu u odnosu na peri-mukozitis, pri zasnovano na specifičnim biološkim svojstvima ovih biomolekula, ova razlika ukazuje i na određene patogenetske karakteristike osteoklastogeneze peri-implantitisa.
- Katepsin-K predstavlja biomarker svosjtvten peri-mukozitisu. Uzimajući u obzir da je ovaj biomolekul jedan od značajnijih regulatora osteoklastogeneze, moguće objašnjenje je da je ovaj marker povišen na početku same osteoklastogeneze, a da nakon toga perzistira.
- Evaluirani biomarkeri su drugačije distribuirani u različitim regionima vilica i u PICF implantata razligutih dijametara. RANK i OPG su značajno povišeni u frontalnom regionu maksile, što ujedno ukazuje na intezivnije osteolitičke procese u ovom regionu. RANK i katepsin-K su značajno povišeni u grupi implantata sa najvećim dijametrom, što na molekularnom nivou potvrđuje predhodne rezultate kliničkih studija da su dijametar implantata i gubitak implantata u pozitivnoj korelaciji.

7. LITERATURA

1. Albouy, J.,P., Abrahamsson, I., Berglundh, T. (2012) Spontaneous progression of experimental peri-implantitis at implants with different surface characteristics. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* **39**: 182–187.
2. Albrektsson, T. & Isidor, F. (1994) Consensus report: implant therapy. In: Lang, N. P. & Karring, T. (eds). Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology, pp. 365–369. Berlin: Quintessence.
3. Aoki, M., Takanashi, K., Matsukubo, T., Yajima, Y., Okuda, K., Sato, T., Ishihara, K. (2009) Transmission of Periodontopathic Bacteria from Natural Teeth to Implants. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* DOI: 10.1111/j.1708-8208.2009.00260.x.
4. Appel, H., Ruiz-Heiland, G., Listing, J., Zwerina, J., Herrmann, M., Mueller, R., Haibel, H., Baraliakos, X., Hempfing, A., Rudwaleit, M., Sieper, J., Schett, G. (2009) Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis and Rheumatism* **60**:3257-62.
5. Arikan, F., Buduneli, N. & Kütükçüler, N. (2008) Osteoprotegerin levels in peri-implant crevicular fluid. *Clinical Oral Implants Research* **19**:283-8.
6. Arikan, F., Buduneli, N. & Lappin, D.F. (2011) C-Telopeptide Pyridinoline Crosslinks of Type I Collagen, Soluble RANKL, and Osteoprotegerin Levels in Crevicular Fluid of Dental Implants with Peri-implantitis: A Case-Control Study. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* **26**, 282-9.
7. Armitage, G. (1996) Periodontal disease: diagnosis. *Annals of Periodontology* **1**:37-215.
8. Armitage, G. (2004) Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontology 2000* **34**: 109-119.

9. Belibasakis, G.N., Johansson, A., Wang, Y., Chen, C., Kalfas, S., Lerner, U.,H. (2005) The cytolethal-distending toxin induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *Infection and Immunity* **73**: 342–351.
10. Bostanci, N., I'genli, T., Emingil, G., Afacan, B., Han, B., Toz, H., Atilla, G., Hughes, F.,J., Belibasakis, G.,N. (2007) Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *Journal of Clinical Periodontology* **34**: 370–376.
11. Belibasakis, G.,N., Bostanci, N., Hashim, A., Johnsson, A., Aduse-Opoku, J., Curtis, M.,A., Hughes FJ. (2007) Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: a putative role of the Arg-gingipains. *Microbial Pathogenesis* **43**: 46–53.
12. Belibasakis GN, Bostanci N. (2011) The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01810.x.
13. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. (1995) Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett* **372**:83-87.
14. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. (1991) The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clinical Oral Implants Research* **2**:81-90.
15. Berglundh, T., Lindhe, J., Marinello, C., Ericsson, I. & Liljenberg, B. (1992) Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **3**: 1–8.
16. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. (2003) De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. A model study in the dog. *Clinical Oral Implant Research* **14**: 251–262

17. Berglundh T, Zitzmann NU, Donati M. (2011) Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *Journal of Clinical Periodontology* **38** (Suppl. 11): 188–202.
18. Booth V, Young S, Cruchley A, Taichman NS, Paleolog E. (1998) Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *Journal of Periodontal Research* **33**: 491-499.
19. Boutros, S., Michalowicz, B., Smith, Q. & Aeppli, D. (1996) Crevicular fluid enzymes from endosseous dental implants and natural teeth. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **11**, 322–330.
20. Bragger U, Hafeli U, Huber B, Hammerle CH, Lang NP. (1998) Evaluation of postsurgical crestal bone levels adjacent to non-submerged dental implants. *Clinical Oral Implant Research* **9**:218-24.
21. Bragger U. (1998) Use of radiographs in evaluating success, stability and failure in implant dentistry. *Periodontology 2000* **17**:77-88.
22. Bossard, M. J., Tomaszek, T. A., Thompson, S. K., Amegadzie, B. Y., Hanning, C. R., Jones, C., Kurdyla, J. T., McNulty, D. E., Drake, F. H., Gowen, M. & Levy, M. A. (1996) Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 12517–12524.
23. Bostanci, N., Ilgenli, T., Emingil, G., Afacan, B., Han, B., Toz, H., Atilla, G., Hughes, F.J. & Belibasakis, G.N. (2007) Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 370-6.
24. Branemark, P.-I., Adell, R., Breine, U., Hansson, B.O., Lindstrom, J., Halle'n, O. & O'hman, A. (1969) Intra-osseous anchorage of dental prostheses I. Experimental studies. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery* **3**: 81–100.

25. Buduneli N, Buduneli E, Kütükçüler N. (2009) Interleukin-17, RANKL, and osteoprotegerin levels in gingival crevicular fluid from smoking and non-smoking patients with chronic periodontitis during initial periodontal treatment. *Journal of Periodontology* **80**: 1274-1280.
26. Buduneli N, Kinane DF. (2011) Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **38**: 85–105.
27. Cochran D. (2008) Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of Periodontology* **79** Suppl 8: 1569-1576.
28. Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P. (2011) Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. **276**: 20659–20672.
29. Connolly DT, Olander JV , Heuvelman D, et al. (1989) Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 20,017-20,024.
30. Crotti T, Smith M, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, et al. (2005) Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **38**: 380-387
31. De Boever AL, Quirynen M, Coucke W, Theuniers G, De Boever JA. (2009) Clinical and radiographic study of implant treatment outcome in periodontally susceptible and nonsusceptible patients: a prospective long-term study. *Clinical Oral Implant Research* **20**: 1341–1350.
32. Dodds, R. A., James, I. E., Rieman, D., Ahern, R., Hwang, S. M., Connor, J. R., Thompson, S. D., Veber, D. F., Drake, F. H., Holmes, S., Lark, M. W. & Gowen, M. (2001) Human osteoclast cathepsin K is processed intracellularly

- prior to attachment and bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research* **16**, 478–486.
33. Drake FH, Dodds RA, James IE, et al. (1996) Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 12511- 12516.
34. Duarte, P.M., de Mendonca, A.C., Maximo, MBB, Santos VR, Bastos MF & Nociti Junior FH. (2009) Differential cytokine expressions affect severity of peri-implant disease. *Clinical Oral Implants Research* **20**, 514–520.
35. Dutzan N, Gamonal J, Silva A, Sanz M, Vernal R. (2009) 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. *Journal of Clinical Periodontology* **36**: 396-403.
36. Ellies DL, Viviano B, McCarthy J, Rey JP, Itasaki N, Saunders S, Krumlauf R. Bone density ligand, Sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity. *Journal of Bone and Mineral Research* **21**:1738-49.
37. Ericsson, I., Berglundh, T., Marinello, C., Liljenberg, B. & Lindhe, J. (1992) Long-standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **3**: 99–103.
38. Ferrara, N. & Henzel, W.J. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **161**, 851–858.
39. Frank, S., Hubner, G., Breier, G., Longaker, M., T., Greenhalgh, D., G., Werner, S. (1995) Regulation of vascular endothelial growth factor in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *Journal of Biological Chemistry* **270**:12,607-12,613.

40. Fransson, C., Wennstrom, J. & Berglundh, T. (2008) Clinical characteristics of implants with a history of progressive bone loss. *Clinical Oral Implants Research* **2**: 142–147.
41. Garg, G., Pradeep, A. R. & Thorat, M. K. (2009) Effect of nonsurgical periodontal therapy on crevicular fluid levels of cathepsin K in periodontitis. *Archives of Oral Biology* **54**, 1046–1051.
42. Garlet, G.P., Cardoso, C.R., Silva, T.A., et al. (2006) Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiology and Immunology* **21**:12-20.
43. Goodman, S.B., Huie, P., Song, Y., Schurman, D., Maloney, W., Woolson, S., Sibley, R. (1998) Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements. *Journal of Bone and Joint Surgery* **80**: 531–539.
44. Gould, T.R., Westbury, L., Brunette, D.M. (1984) Ultrastructural study of the attachment of human gingiva to titanium in vivo. *Journal of Prosthetic Dentistry* **52**: 418-20.
45. Graves, D.T., Cochran, D. (2003) The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology* **74**:391-401.
46. Graves, D. (2008) Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology* **79**, 1585-91.
47. Gualini, F., Berglundh, T. (2003) Immunohistochemical characteristics of inflammatory lesions at implants. *Journal of Clinical Periodontology* **30**: 14–18.
48. Guida, L., Annunziata, M., Rocci, A., Contaldo, M., Rullo, R., Oliva, A. (2010) Biological response of human bone marrow mesenchymal stem cells to fluoride-modified titanium surfaces. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 1234–1241.

49. Hajishengallis, G., Sojar, H., Genco, R.,J., DeNardin, E. (2004) Intracellular signaling and cytokine induction upon interactions of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae with pattern-recognition receptors. *Immunological Investigations* **33**:157-72.
50. Hammerle, C.,H.,E., Bragger, U., Burgin, W., Lang, N.,P. (1996) The effect of subcrestal placement of the polished surface of ITI" implants on marginal soft and hard tissues *Clinical Oral Implants Research* **7**: 30-37.
51. Hämmerle, C.,H., Glauser, R. (2004) Clinical evaluation of dental implant treatment. *Periodontology* 2000 **34**:230-9.
52. Hasegawa, T., Yoshimura, Y., Kikuri, T., Yawaka, Y., Takeyama, S., Matsumoto, A., Oguchi, H., Shirakawa, T. (2002) Expression of receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research* **37**: 405–411.
53. Heitz-Mayfield, L.,J.,A. (2008) Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *Journal of Clinical Periodontology* **35** (Suppl. 8): 292–304.
54. Heitz-Mayfield, L.J. & Lang, N.P. (2010) Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontology* 2000 **53**: 167-81.
55. Houck, K.A., Leung, D.W., Rowland, A.M., Winer, J. & Ferrara, N. (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 26031–26037.
56. Ikeda, T., Kasai, M., Utsuyama, M., Hirokawa, K. (2001) Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* **142**:1419–26.
57. Ivanoff, C.J., Gröndahl, K., Sennerby, L., Bergström, C., Lekholm, U. (1999) Influence of variations in implant diameters: a 3- to 5-year retrospective clinical report. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **14**:173-80.
58. Imamura, T., (2003) The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontology* **74**:111-8.

59. Jung, Y., Han, C., Lee, K. (1996) A 1-year radiographic evaluation of marginal bone around dental implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **11**: 811-818.
60. Kadowaki, T., Takii, R., Yamatake, K., Kawakubo, T., Tsukuba, T., Yamamoto, K. (2007) A role for gingipains in cellular responses and bacterial survival in *Porphyromonas gingivalis*-infected cells. *Frontiers in Bioscience* **12**:4800-9.
61. Kanazawa, K. & Kudo, A. (2005) Self-Assembled RANK Induces Osteoclastogenesis Ligand-Independently. *Journal of Bone and Mineral Research* **20**, 2053–2060.
62. Khosla, S. (2001) Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* **142**: 5050 –5055.
63. Koide, M., Kinugawa, S., Takahashi, N., Udagawa, N. (2010) Osteoclastic bone resorption induced by innate immune responses. *Periodontology 2000* **54**:235-46.
64. Kusumi, A., Sakaki, H., Kusumi, T. i sar. (2005) Regulation of synthesis of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand in normal human osteoblasts via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by the application of cyclic tensile strain. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **23**:373–381.
65. Kwan Tat, S., Padrines, M., Théoleyre, S., Heymann, D., Fortun, Y. (2004) IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & Growth Factors Review* **15**: 49-60.
66. Kwon, B.S., Wang, S., Udagawa, N., Haridas, V., Lee, Z.,H., Kim, K.,K., Oh, K.O., Greene, J., Li, Y., Su, J., Gentz, R., Aggarwal, B.,B., Ni, J. (1998) TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB Journal* **12**:845–54.

67. Lacey, D.L. i sar. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93(2):165–76.
68. Lang, N.P., Bragger, U., Walther, D., Beamer, B. & Kornman, K.S. (1993) Ligature-induced periimplant infection in cynomolgus monkeys. I. Clinical and radiographic findings. *Clinical Oral Implants Research* 4: 2–11.
69. Lee, J.M., Garon, E., Wong, D.,T. (2009) Salivary diagnostics. *Orthodontics and Craniofacial Research* 12:206–211
70. Lindhe, J., Berglundh, T., Ericsson, I., Liljenberg, B. & Marinello, C. (1992) Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. *Clinical Oral Implants Research* 3: 9–16.
71. Lindhe, J., Meyle, J. (2008) Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* 35 (Suppl. 8): 282–285.
72. Lindhe, J., Lang, N., Karring, Thorkild. (2008) Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 5th edition, Blackwell Munksgaard, Oxford, UK.
73. Liu, Y.,C, Lerner, U.,H, Teng, Y.,T. (2010) Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontology 2000*. 52:163-206.
74. Lum, L., Wong, B.,R, Josien, R., Becherer, J.,D., Erdjument-Bromage. H., Schlondorff, J., i sar. (1999) Evidence for a role of a tumor necrosis factoralpha (TNF-alpha) converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *Journal of Biological Chemistry* 274:13613–8.
75. Malavez, C.,H., Hermans, M., Daelemans, P.,H. (1996) Marginal bone levels at Branemark system implants used for single tooth restoration. The influence of implant design and anatomical region. *Clinical Oral Implants Research* 7: 162-169.

76. Mamalis, A.,A., Markopoulou ,C., Vrotsos, I., Koutsilirieris, M. (2011) Chemical modification of an implant surface increases osteogenesis and simultaneously reduces osteoclastogenesis: an in vitro study. *Clinical Oral Implant Research* **22**: 619–626.
77. Matsumoto, Y., Tanaka, K., Hirata, G., Hanada, M., Matsuda, S., Shuto, T., Iwamoto, Y. (2002) Possible involvement of the vascular endothelial growth factor-Flt-1-focal adhesion kinase pathway in chemotaxis and the cell proliferation of osteoclast precursor cells in arthritic joints. *Journal of Immunology* **168**:5824–5831.
78. Mogi, M., Ootogoto, J., Ota, N. & Togari, A. (2004) Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Journal of Dental Research* **83**, 166–169.
79. Mogi, M. i Ootogoto, J. (2007) Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Archives of Oral Biology* **52**:894-898.
80. Mombelli, A. i Lang, N. (1998) The diagnosis and treatment of peri-implantitis, *Periodontology 2000* **17**: 63-76
81. Monov, G., Strbac, G.D., Baron, M., Kandler, B., Watzek, G. & Gruber, R. (2006) Soluble RANKL in crevicular fluid of dental implants: a pilot study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **8**, 135-41.
82. Moon, I.S., Berglundh, T., Abrahamsson, I., Linder, E., Lindhe, J. (1999) The barrier between the keratinized mucosa and the dental implant. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* **26**:658-63.
83. Murata, M., Tatsumi, J., Kato, Y., Suda, S., Nunokawa, Y., Kobayashi, Y., Takeda, H., Araki, H., Shin, K., Okuda, K., Miyata, T. & Yoshie, H. (2002) Osteocalcin, deoxypyridinoline and interleukin-1beta in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research* **13**, 637–643.

84. Nagasawa, T., Kiji, M., Yashiro, R., Hormdee, D., Lu, H., Kunze, M., i sar. (2007) Roles of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontology 2000* **43**: 65-84
85. Nakagawa, M., Kaneda, T., Arakawa, T., Morita, S., Sato, T., Yomada, T., Hanada, K., Kumegawa, M., Hakeda, Y. (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett* **473**:161–164.
86. Nakashima Y, Sun DH, Trindade MC, Maloney WJ, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL (1999a) Signaling pathways for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression in human macrophages exposed to titanium-alloy particulate debris in vitro. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume* **81**:603–615.
87. Nakashima Y, Sun DH, Trindade MC, Chun LE, Song Y, Goodman SB, Schurman DJ, Maloney WJ, Smith RL (1999b) Induction of macrophage C-C chemokine expression by titanium alloy and bone cement particles. *Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume* **81**:155–162.
88. Nakashima, T., et al. (2000) 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **275**:768–75.
89. Nakao, K., Goto, T., Gunjigake, K.,K., Konoo, T., Kobayashi, S., Yamaguchi, K. (2007) Intermittent force induces high RANKL expression in human periodontal ligament cells. *Journal of Dental Research* **86**:623–628.
90. Newman, Takei, Klokkevold, Caranza 2007, Clinical Periodontology, 10th edition, Saunders Elsevier, St. Louis, USA, str. 1075.
91. Nichols, T., Fische, T., Deliarhyris, E., Baldwin, A.,S. Jr. (2001) Role of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis. *Annals of Periodontology* **6**: 20-29.

92. Niida, S., Kaku, M., Amano, H., Yoshida, H., Kataoka, H., Nishikawa, S., Tanne, K., Maeda, N., Nishikawa, S., Kodama, H. (1999) Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colonystimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *Journal of Experimental Medicine* **190**:293–298.
93. Nowzari, H., Phamduong, S., Botero, J.E., Villacres, M.C. & Rich, S.K. (2010) The Profile of Inflammatory Cytokines in Gingival Crevicular Fluid around Healthy Osseointegrated Implants. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, doi:10.1111/j.1708-8208.2010.00299.x.
94. Nozaki, K., Kaku, M., Yamashita, Y., Yamauchi, M., Miura, H. (2010) Effect of cyclic mechanical loading on osteoclast recruitment in periodontal tissue. *Journal of Periodontal Research* **45**: 8–15.
95. Okaji, M., Saka,i H., Sakai, E., et al. (2003) The regulation of bone resorption in tooth formation and eruption processes in mouse alveolar crest devoid of cathepsin k. *Journal of Pharmacological Science* **91**:285-294.
96. Otero, J.E., Dai, S., Alhawagri, M.A., Darwech, I. & Abu-Amer, Y. (2010) IKKbeta activation is sufficient for RANK-independent osteoclast differentiation and osteolysis. *Journal of Bone and Mineral Research* **25**, 1282-94.
97. Panagakos, F., Aboyoussef, H., Dondero, R. & Jandinski, J. (1996) Detection and measurement of inflammatory cytokines in implant crevicular fluid: a pilot study. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **11**, 794–799.
98. Persson, G.R., Salvi, G.E., Heitz-Mayfield, L.J. & Lang, N.P. (2006) Antimicrobial therapy using a local drug delivery system (Arestin) in the treatment of peri-implantitis. I: microbiological outcomes. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 386–393.

99. Pontoriero, R., Tonelli, M.P., Carnevale, G., Mombelli, A., Nyman, S.R. & Lang, N.P. (1994) Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clinical Oral Implants Research* **5**: 254–259.
100. Quirynen, M., De Soete, M., van Steenberghe, D. (2002) Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clinical Oral Implant Research* **13**: 1–19
101. Rantakokko, J., Aro, H. T., Savontaus, M. & Vuorio, E. (1996) Mouse cathepsin K: cDNA cloning and predominant expression of the gene in osteoclasts, and in some hypertrophying chondrocytes during mouse development. *FEBS Letters* **393**, 307–313.
102. Renvert, S., Roos-Jaˆnsaker, A.M., Lindahl, C., Renvert, H. & Rutger-Persson, G. (2007) Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clinical Oral Implants Research* **18**: 509–516
103. Renvert, S., Persson, GR. (2009) Periodontitis as a potential risk factor for peri-implantitis. *Journal of Clinical Periodontology* **36** (Suppl. 10): 9–14.
104. Roos-Jansaker, A. M., Renvert, H., Lindahl, C. & Renvert, S. (2006) Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions. *Journal of Clinical Periodontology* **33**: 296–301.
105. Sakellari, D., Menti, S., Konstantinidis, A. (2008) Free soluble receptor activator of nuclear factor-kb ligand in gingival crevicular fluid correlates with distinct pathogens in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **35**: 938–943.
106. Schenk, R.,K., (1994) Bone regeneration: biologic basis. In: Buser, D., Dahlin, C., & Schenk, R.K., Eds. Guided bone regeneration in implant dentistry, Chapter 3, 49–100. Chicago: Quintessence Publishing Co., Inc.

107. Schou, S., Holmstrup, P., Worthington, H.,V., Esposito, M. (2006) Outcome of implant therapy in patients with previous tooth loss due to periodontitis. *Clinical Oral Implant Research* **17** (Suppl. 2): 104–123,
108. Senger, D.,R., Perruzi, C.,A., Feder, J., Dvorak, H.,F. (1986) A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumour cell lines. *Cancer Research* **46**:5629-5632.
109. Shibli, J.,A., Melo, L., Ferrari, D.,S., Figueiredo, L.,C., Favari, M., Feres, M. (2008) Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clinical Oral Implant Research* **19**: 975–982
110. Schroeder, A., Pohler, O. & Sutter, F. (1976) Gewebereaktion auf ein Titan-Hohlzylinderimplantat mit Titan-Spritzschichtoberfläche. *Schweizer Monatsschrift für Zahnheilkunde* **86**: 713–727.
111. Simonet WS i sar. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**:309–19.
112. Skoumal, M., Haberhauer, G., Kolarz, G., Hawa, G., Woloszczuk, W. & Klingler, A. (2005) Serum cathepsin K levels of patients with longstanding rheumatoid arthritis: correlation with radiological destruction. *Arthritis Research Therapy* **7**: R65–R70.
113. Soedarsono, N., Rabello, D., Kamei, H., Fuma, D., Ishihara, Y., Suzuki, M., i sar. (2006) Evaluation of RANK/RANKL/OPG gene polymorphisms in aggressive periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **41**: 397–404.
114. Strbac GD, Monov G, Cei S, Kandler B, Watzek G, Gruber R. (2006) Cathepsin K levels in the crevicular fluid of dental implants: a pilot study. *Journal of Clinical Periodontology* **33**: 302– 308.
115. Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.,T., Martin, T.,J. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumour necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Reviews* **20**: 345–357.

116. Sumida, S., Ishihara, K., Kishi, M., Okuda, K. (2002) Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **17**:696-702.
117. Sutherland, M.,K., Geoghegan, J.,C, Yu, C., Turcott, E., Skonier, J.,E., Winkler, D.,G., i sar. (2004) Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a nove regulation of bone formation. *Bone* **35**:828–35.
118. Suthin, K., Matsushita, K., Machigashira, M., Tatsuyama, S., Imamura, T., Torii, M., Izumi, Y. (2003) Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research* **38**: 90–96.
119. Suva. L.,J. (2009) Sclerostin and the unloading of bone. *Journal of Bone and Mineral Research* **24**:1649-50.
120. Taubman, M.,A., Valverde, P., Han, X., Kawai, T. (2006) Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *Journal of Periodontology* **76** Suppl 11 : 2033-2041.
121. Teitelbaum, S.,L. (2000) Bone Resorption by Osteoclasts. *Science* **289**: 1504-1508.
122. ten Dijke, P., Krause, C., de Gorte,r D.,J., Lowik, C.,W., van Bezooijen, R.,L. (2008) Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: Its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *J Bone Joint Surg Am* **90** (Suppl 1):31–35.
123. Theoleyre, S., Wittrant, Y., Tat, S.,K., Fortun, Y., Redini, F., Heymann, D. (2004) The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine & Growth Factors Review* **15**: 457-75.
124. Tsuda. E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T., Higashio, K. (1997) Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts

that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **234**:137–42.

125. Mödder, U.I., Hoey, K.A., Amin, S., McCready, L.,K., Achenbach, S.,J., Riggs, B.,L., Melton, L.J. 3rd, Khosla, S. (2011) Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. *Journal of Bone and Mineral Research* **26**:373-9.
126. Van Aken, J. (1969) Optimum conditions for intraoral roentgenograms. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **27**: 475–491.
127. Van Bezooijen, R.,L., Roelen, B.,A, Visser, A., van der Wee-Pals, L., de Wilt, E., Karperien, M., Hamersma, H., Papapoulos, S.,E., ten Dijke, P., Löwik CWGM (2004) Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *Journal of Experimental Medicine* **199**:805–814
128. van Bezooijen, R.,L., ten Dijke, P., Papapoulos, S.,E., Löwik, C.,W.(2005) SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine & Growth Factors Review* **16**:319-27.
129. Van Bezooijen, R.,L., Bronckers, A.,L., Gortzak, R.,A., Hogendoorn, P.,C., van der Wee-Pals, L., Balemans, W., Oostenbroek, H.,J., van Hul, W., Hamersma, H., Dijkers, F.,G., Hamdy, NAT, Papapoulos SE, Löwik CWGM (2009) Sclerostin in mineralized matrices and van Buchem disease. *Journal of Dental Research* **88**:569–574
130. Van Winkelhoff AJ, Wolf JWA. (2007) Actinobacillus actinomycetemcomitans associated peri-implantitis in an edentulous patient. *A case report. Journal of Clinical Periodontology* **27**: 531–535.
131. Vlacic-Zischke J, Hamlet SM, Friis T, Tonetti MS, Ivanovski S. (2011) The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGFβ/BMP signalling in osteoblasts. *Biomaterials* **32**:665-71.

132. Xu JW, Konttinen YT, Lassus J, Natah S, Ceponis A, Solovieva S, Aspenberg P, Santavirta S. (1996) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in loosening of total hip replacement (THR). *Clinical and Experimental Rheumatology* **14**:643–648.
133. Watts NB. (1999) Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clinical Chemistry* **45**:1359-68.
134. Wehmeyer C, Stratis A, Pap T, Dankbar B. (2010) The Role of the WNT inhibitor sclerostin in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatoid Diseases* **69**:A21
135. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, et al. (2003) Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO Journal* **22**:6267–76.
136. Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS 3rd, Frankel WN, Lee SY, Choi Y. (1997) TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *Journal of Biological Chemistry* **272**:25190–4.
137. Yamalik N, Günday S, Kilinc K, Karabulut E, Berker E, Tözüm TF. (2011) Analysis of cathepsin-K levels in biologic fluids from healthy or diseased natural teeth and dental implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 2011 **26**:991-7.
138. Yamalik N, Günday S, Uysal S, Kiliç K, Karabulut E, Tözüm TF. (2012) Analysis of cathepsin-K activity at tooth and dental implant sites and the potential of this enzyme in reflecting alveolar bone loss. *Journal of Periodontology* **83**:498-505.
139. Yamamoto T, Kita M, Oseko F, Nakamura T, Imanishi J, Kanamura N. (2006) Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* **41**: 554–559.

140. Yoshinaga, Y., Ukai, T., Abe, Y. & Hara, Y. (2007) Expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand relates to inflammatory bone resorption, with or without occlusal trauma, in rats. *Journal of Periodontal Research* **42**, 402–409.
141. Yun TJ, et al. (1998) OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *Journal of Immunology* **161**:6113–21.
142. Zitzmann NU, Berglundh T. (2008) Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology* **35**: 286–291.

Biografija

Mia Rakić rođena je 3.11.1984. u Beogradu. Svoje osnovno i gimnazijsko obrazovanje je završila u Beogradu, a Stomatološki fakultet, Univerziteta u Beogradu je upisala 2003. godine. Tokom osnovnih studija bila je demonstrator na klinici za Stomatološku protetiku i prezentovala je 5 naučnih radova, među kojima su dva bila nagrađena. Diplomirala je 2008. godine sa srednjom ocenom 9,26. Pripravnički staž obavila je na klinikama Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i stručni ispiti je položila 2010. godine. Doktorske studije iz oblasti Parodontologije je upisala na ovom fakultetu 2009., i naučno-istraživački rad je u okviru svoje doktorske disertacije obavila pod mentorstvom profesora Voislava Lekovića. Tokom svog istraživačkog rada publikovala je i prezentovala 9 radova, među kojima je 6 publikovano na SCI listi i jedna oralna prezentacija je nagrađena kao najbolja u naučnoj kompeticiji. Bila je saradnika na jednom (#145042 : „Parodontalna medicina, primena koncepta aktivne regeneracije u parodontologiji i implantologiji“, rukovodilac prof.dr Vojislav Leković) , a trenutno je saradnik na dva projekta Ministarstva prosvete i nauke republike Srbije (#175075 „Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije“ rukovodilac prof. Jelena Milašin i 41008 : „Interakcija etiopatogenetskih mehanizama parodontopatije i peri-implantitisa sa sistemskim bolestima današnjice“, rukovodilac prof.dr Vojislav Leković) , a u okviru projekta 41008 je ujedno ko-rukovodilac. Od 2011. delegat je Srpskog udruženja parodontologa u Evropskom udruženju parodontologa.