

**UNIVERZITET PRIVREDNA AKADEMIJA
U NOVOM SADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET
PANČEVO**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**UTICAJ RAZLIČITO OBRAĐENIH POVRŠINA
KERAMIČKIH ABATMENATA NA
FUNKCIONALNU ADAPTACIJU MEKIH
PERIIMPLANTNIH TKIVA**

MENTOR

*Prof. dr Danimir Jevremović,
vanredni profesor*

KANDIDAT

dr stom. Nenad Borotić

Pančevo,

2017.

**UNIVERZSITY BUSINESS ACADEMY
IN NOVI SAD
FACULTY OF DENTISTRY
PANČEVO**

DOCTORAL DISSERTATION

**THE INFLUENCE OF DIFFERENTLY
PROCESSED SURFACES OF CERAMICS
ABUTMENTS ON FUNCTIONAL ADAPATION
OF SOFT PERIIMPLANT TISSUES**

MENTOR

*Prof. dr Danimir Jevremović
Associate Professor*

CANDIDATE

dr Nenad Borotić

Pančevo,

2017.

UNIVERZITET PRIVREDNA AKADEMIJA U NOVOM SADU

STOMATOLOŠKI FAKULTET PANČEVO

KLJUČNI PODACI O ZAVRŠNOM RADU

Vrsta rada:	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora:	Nenad Borotić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	dr sci. Danimir Jevremović, vanredni profesor, Stomatološki fakultet Pančevo
Naslov rada:	Uticaaj različito obrađenih površina keramičkih abatmenata na funkcionalnu adaptaciju mekih periimplantnih tkiva
Jezik publikacije (pismo):	Srpski (latinica)
Fizički opis rada:	Broj: Stranica____167 Poglavlja____10 Referenci____322 Tabela____9 Slika____43 Grafikona____7 Priloga____2
Naučna oblast:	Stomatološke nauke
Predmetna odrednica, ključne reči:	Stomatološka protetika Ključne reči: cirkonijum dioksid, adherencija ćelija, dentalni implantat, fibroblasti, hrapavost površine

Izvod (apstrakt ili rezime) na jeziku završnog rada:

UVOD: Savremeni modalitet nadoknade izgubljenih zuba podrazumeva ugradnju titanijumskih šrafova - implantata u područja koštanih fundamenata. Na implantat se, u kasnijoj fazi terapije, postavlja komplementarni deo, protetska nadogradnja - abatment. Ovaj deo kompleksa probija mekotkivnu barijeru i obezbeđuje potporu i retenciju za odgovarajuću zubno-protetsku nadoknadu. Cirkonijum dioksid, zahvaljujući svojim dobrim biomehaničkim svojstvima, kao i izvanrednoj biokompatibilnosti, postaje materijal izbora za abatmente. Međutim, bez obzira na činjenicu, da se cirkonijum promovise kao izuzetno biokompatibilan materijal, adherencija fibroblasta za njegovu površinu još uvek nije dovoljno ispitana. Naime, različiti modaliteti obrade površine mogu imati direktan uticaj na kvalitet procesa mekotkivne integracije dentalnog implantata.

CILJ: Cilj istraživanja bio je da se ispita uticaj različito obrađenih površina abatmenta (polirani, glazirani, polirani pa glazirani), izrađenih od itrijum stabilizovanog cirkonijum dioksid polikristala, na kvantifikacijsku zastupljenost adherisanih fibroblasta u sterilnim i nesterilnim uslovima.

MATERIJAL I METODE: Eksperimentalni uzorci su bile pločice dimenzija 5x5x1 mm, napravljene od itrijum stabilizovanog cirkonijum dioksid polikristala. Tokom završne obrade, uzorci su podeljeni u 3 eksperimentalne grupe, prema načinu završne obrade (polirani, polirani pa glazirani, glazirani). Polovina od svake grupe eksperimentalnih uzoraka je izložena faktorima usne duplje u trajanju od 24 h, a druga polovina je sterilisana u autoklavu. Prvi deo istraživanja je obuhvatao tomografsku analizu površine uzoraka pomoću mikroskopa atomskih sila (AFM). Drugi deo eksperimenta je predstavljao in vitro ispitivanje adherencije MRC-5 fibroblasta na površinu sterilnih i nesterilnih eksperimentalnih uzoraka.

REZULTATI: Najmanju vrednost površinske hrapavosti imaju uzorci obrađeni poliranjem (10.762 nm), zatim polirani pa glazirani uzorci (75.414 nm) i, na kraju, najgrublju okarakterisanu površinu imaju eksperimentalni uzorci obrađeni glaziranjem (86.924 nm).

Najveća vrednost adhezije fibroblasta bila je kod poliranih (72166,67±7952,81), a najmanja kod glaziranih (57166,67±9067,12) nesterilnih uzoraka. Kada je u pitanju grupa sterilnih uzoraka, najveća adhezija fibroblasta dobijena je kod poliranih uzoraka (103000,00±8051,56), a najmanja kod poliranih pa glaziranih (97166,67±7273,397) eksperimentalnih uzoraka.

ZAKLJUČAK: Različiti načini završne obrade transmukoznih protetskih nadogradnji utiču na procese adherencije fibroblasta. U okviru ovog

	eksperimenta ustanovljeno je, da protetske nadogradnje izrađene od itrijumom stabilizovanog cirkonijum dioksid polikristala treba polirati pre kliničke upotrebe, bez tretmana glazurom.
Datum odbrane: (Popunjiva naknadno odgovarajuća služba)	
Članovi komisije: (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	Predsednik: Član: Član:
Napomena:	Autor doktorske disertacije potpisao je sledeće Izjave: 1. Izjava o autorstvu, 2. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije dokorskog rada i 3. Izjava o korišćenju. Ove Izjave se čuvaju na fakultetu u štampanom i elektronskom obliku.

UNIVERSITY BUSINESS ACADEMY IN NOVI SAD

FACULTY OF DENTISTRY PANCEVO

KEY WORD DOCUMENTATION

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Nenad Borotić
Menthor (title, first name, last name, position, institution)	dr sci. Danimir Jevremović, Associate Professor, Faculty of Dentistry Pančevo
Title:	The influence of differently processed surfaces of ceramics abutments on functional adapation of soft periimplant tissues
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: Pages_____167 Chapters____10 References____322 Tables_____9 Illustrations_____43 Graphs_____7 Appendices____2
Scientific field:	Dentistry
Subject, Key words:	Prosthetics Key words: zirconium dioxide, cell adherence, dental implant, fibroblasts, surface roughness
Abstract (or resume) in the language of the text:	INTRODUCTION. Contemporary solution for missing teeth therapy is represented by implantation of titanium screws – implants in osseous fundaments. Consequently, implant is being complemented by prosthetic implant abutment. This complex penetrates soft tissue barrier and secures support and retention for accomplishing prosthetic

	<p>restoration. Zirconium dioxide, thanks to its potent biomechanical properties and excellent biocompatibility becomes material of choice for dental abutments. However, despite the fact that zirconium dioxide is promoted as highly biocompatible, it is not fully investigated when fibroblast adhesion to its surface is concerned. Namely, different surface treatments may directly influence quality of dental implant soft tissue integration.</p> <p>AIM. The aim of this research was to investigate the influence of different abutment surface treatments (polished, glazed, polished then glazed), produced from ittria stabilized zirconium dioxide polycrystal on quantified presence of adhered fibroblast in sterile and nonsterile environment.</p> <p>MATERIAL AND METHODS. Experimental samples were plates 5x5x1 mm in dimension, made out of ittrium stabilized zirconium dioxide polycrystal. During final processing, samples were divided into three experimental groups, corresponding to the way they were treated (polished, polished then glazed, glazed). Half of each group of these experimental samples was exposed to oral environment in duration of 24 h, and other half was sterilized in autoclave. The first part consisted of tomographic analysis of specimen's surface, performed with atomic force microscopy (AFM). In the second part, in vitro analysis of MRC-5 fibroblasts adhesion was performed on sterile and nonsterile experimental samples.</p> <p>RESULTS. Lowest value of surface roughness were recorded on polished samples (10.762 nm), then on samples that were polished then glazed (75.414 nm). Finally, the roughest surface was on glazed surfaces (86.924 nm). Adhesion of fibroblasts was highest on samples that were polished (72166,67±7952,81), the lowest was on glazed nonsterile samples (57166,67±9067,12). Within sterile samples group, highest fibroblast adhesion was recorded in polished samples (103000,00±8051,56), lowest within polished then glazed experimental samples (97166,67±7273,397).</p> <p>CONCLUSION. Various ways of surface treatment of transmucose prosthetic abutments influence fibroblast adherence process. Within the scope of this experiment, it has been concluded that prosthetic abutments, made from yttrium stabilized zirconium dioxide polycrystal, should be polished prior to clinical use, without the glaze treatment.</p>
Defended:	

(The faculty service fills later.)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President: Member: Member:
Note:	The author of doctoral dissertation has signed the following Statements: 1. Statement on the authority, 2. Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and 3. Statement on copyright licenses. The paper and e-versions of Statements are held at the faculty.

S A D R Ž A J

1. UVOD	1.
2. IMPLANTO-PROTETSKI KOMPLEKS	5.
2.1. Istorijski razvoj implantologije	5.
2.2. Elementi i vrste implanto-protetskog kompleksa	7.
2.2.1. Transdentalni implantati	7.
2.2.2. Subperiostalni implantati	8.
2.2.3. Intramukozni implantati	8.
2.2.4. Endosealni implantati	8.
2.2.5. Telo implantata	10.
2.2.6. Protetska nadogradnja	12.
2.3. Biološka tkiva u kontaktu s implanto-protetskim kompleksom	14.
2.3.1. Koštano tkivo	15.
2.3.1.1. Osteoblasti	16.
2.3.1.2. Osteociti	16.
2.3.1.3. Osteoklasti	17.
2.3.1.4. Zarastanje koštanog tkiva - oseointegracija	18.
2.3.2. Oralna mukoza	20.
2.3.2.1. Struktura oralne mukoze	22.
2.3.2.2. Vezivno tkivo	22.
2.3.2.3. Oralni epitel	23.
2.4. Periimplantna tkiva	25.
2.4.1. Periimplantni sulkus i tečnost	26.
2.4.2. Mikroorganizmi periimplantnih tkiva	27.
3. UTICAJ VRSTE MATERIJALA I NJEGOVE POVRŠINE NA PONAŠANJE MUKOGINGIVALNOG KOMPLEKSA	30.
3.1. Materijal-tkivo interakcija	31.
3.1.1. Tkivni odgovor na materijale	32.
3.1.2. Mehanizam uspostavljanja kontakta na ćelijskom nivou	33.
3.1.2.1. Ćelijski citoskelet	33.
3.1.2.2. Ćelijske veze	34.
3.2. In vitro testovi	42.
3.2.1. Ćelijske linije	42.
3.3. Karakteristike materijala za protetske nadogradnje	46.

3.3.1. Hrapavost materijala	46.
3.3.1.1. Parametri hrapavosti s obzirom na funkciju površine	48.
3.3.1.2. Hrapavost površine dentalnih implantata	49.
3.3.1.3. Ispitivanje površinske hrapavosti biomaterijala	53.
3.3.2. Cirkonijum dioksid	57.
4. PREGLED LITERATURE	63.
5. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	89.
6. MATERIJAL I METODE	91.
6.1. Eksperimentalni uzorci	91.
6.1.1. Obrada uzoraka	92.
6.1.2. Klasifikacija eksperimentalnih uzoraka	95.
6.1.2.1. Nesterilni uzorci	95.
6.1.2.2. Sterilni uzorci	98.
6.2. Analiza topografije površine uzoraka	98.
6.3. Ispitivanje adhezije fibroblasta	99.
6.3.1. Brojanje MRC-5 ćelija hemocitometrom	103.
6.4. Statistička analiza	105.
7. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	106.
7.1. Rezultati analize topografije površine uzoraka	106.
7.2. Rezultati ispitivanja adhezije ćelija	110.
7.2.1. Uticaj vrste uzorka i načina obrade na broj fibroblasta	110.
7.2.2. Linearna regresiona analiza uticaja posmatranih faktora na broj fibroblasta	115.
7.2.3. Logistička regresiona analiza u odnosu na vrstu uzorka	117.
8. DISKUSIJA	120.
9. ZAKLJUČCI	137.
10. LITERATURA	138.
PRILOZI	165.
Prilog 1.	165.
Prilog 2.	167.

1. UVOD

*„Niko ne bi trebao umreti sa svojim zubima u
čashi vode pored kreveta.“*

P.I. Brånemark

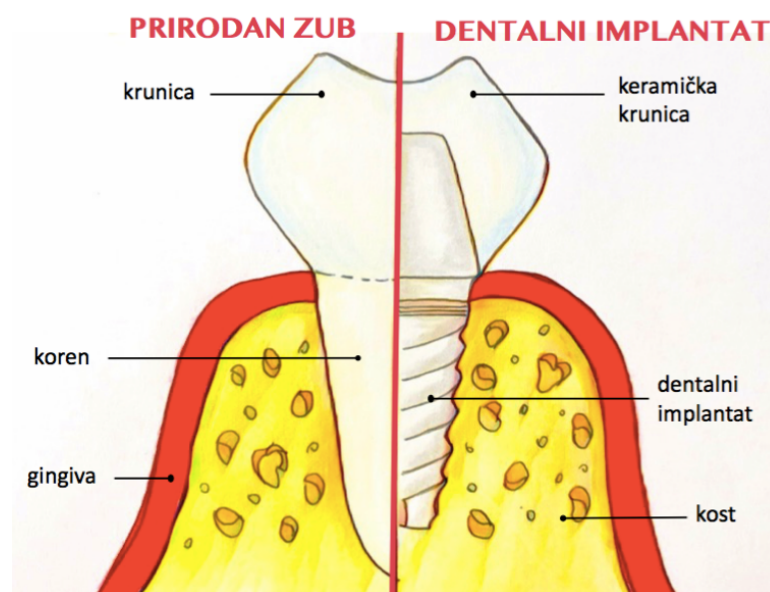
Karijes zuba, kao i oboljenja potpornog aparata zuba danas predstavljaju najčešće bolesti savremenog čoveka. Ova oboljenja kao krajnju konsekvencu imaju gubitak zuba, čiji nedostatak su još stari narodi, nadoknađivali na različite načine. Osim pisanih dokumenata u mnogim arheološkim nalazištima su pronađeni materijalni dokazi koji ukazuju da su se ljudi oduvek bavili nadoknadom izgubljenih zuba. Naime, narod na prostoru Italije poznat kao Etrurci počinju da se bave protetikom i prvi put u istoriji se koriste strane supstance da bi se nadoknadili izgubljeni zubi. U grobovima Etruraca, koji su živeli od 8. veka pre nove ere do 2. veka nove ere, pronađeni su izuzetno očuvani primerci zubnih proteza. Oni su protetske nadoknade izrađivali od zlatnih traka i zuba domaćih životinja koje su preoblikovali. Ljudske zube nisu koristili jer su verovali da je pokojnikovo telo postajalo sveto, čak su pronađene i specijalno pravljenе proteze sa velikim količinama zlata za koje se predpostavlja da su nosili ljudi visoke staleži (McGrew i Roderick, 1985).

Izgubljeni zubi mogu se nadoknaditi na različite načine. Tradicionalni načini protetske rehabilitacije pacijenata bilo fiksnim ili mobilnim stomatoprotetskim nadoknadama uvek ispoljavaju izvestan stepen nedostataka u poređenju sa prirodnim zubima. Fiksne konvencionalne nadoknade zahtevaju žrtvovanje velike količine zdrave zubne supstance, a mobilne protetske nadoknade su neretko za pacijenta vrlo nekomforne.

Nakon otkrivanja biokompatibilnosti titanijuma i njegovog potencijala da bude prihvaćen od strane koštanog tkiva domaćina kroz proces oseintegracije, novi, superiorniji modaliteti protetske rehabilitacije pacijenata su uvedeni u svakodnevnu stomatološku praksu (Albrektsson i sar. 1981). Novi modaliteti podrazumevaju ugradnju titanijumskih šrafova

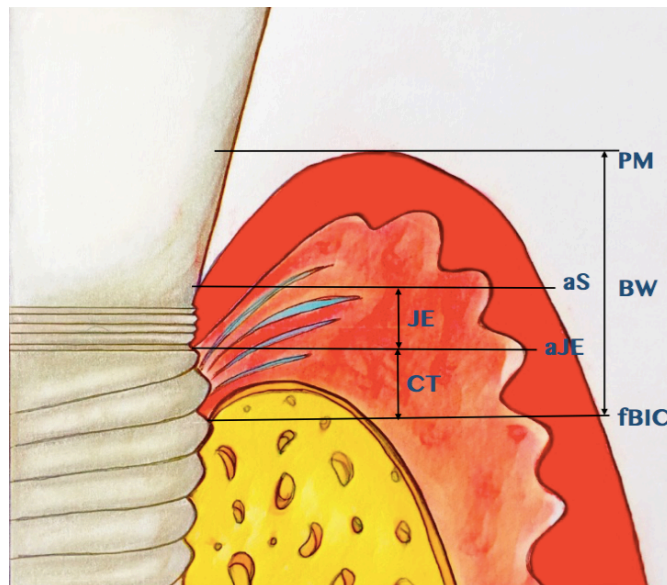
(implantata) u područja koštanih fundamenata gornje i donje vilice, a u cilju nadoknade korenova nedostajućih zuba. Na implantat se u kasnijoj fazi terapije postavlja komplementarni deo, protetska nadogradnja, u anglosaksonskoj literaturi poznata kao „abutment“. Ovakva protetska nadogradnja probija mekotkivnu barijeru i obezbeđuje potporu i retenciju za odgovarajuću zubno-protetsku nadoknadu. Na ovaj način pacijentu se omogućava veći komfor u nošenju protetske nadoknade, ali se i čuvaju preostali zdravi zubi. Protetske nadoknade izrađene na implantatima (proteze, krunice ili mostovi), kao alternativa konvencionalnoj protetskoj terapiji, danas predstavljaju široko prihvaćeno terapijsko rešenje u okvirima brojnih indikacijskih izazova. Takođe, zahvaljujući značajnom napretku u oblasti razumevanja bioloških, biomehaničkih i biohemijskih principa koji utiču na uspešnost kliničke primene dentalnih implantata, postali su standard u rešavanju brojnih kliničkih stanja.

Istorijski gledano, oseointegracija je predstavljala ključni predmet laboratorijskih i kliničkih istraživanja. Poslednjih nekoliko decenija istraživački fokus je prebačen na polje odnosa između protetske nadogradnje i mekih tkiva oko njih. Analogno oseointegraciji ovaj odnos je definisan kao mekotkivna integracija. Ovaj koncept je danas prepoznat kao značajni faktor uspešnosti implantološke terapije. Mnogi autori su opisali proces formiranja epitelnog i mekotkivnog pripoja na suprastrukturu implantata, kao i na vrat samog implantata na sličan način kao što je to slučaj sa prirodnim zubom (Bauman i sar.1993) (slika 1).



Slika 1. Šematski prikaz odnosa mekih i tvrdih tkiva sa strukturama prirodnog zuba i dentalnog implantata

Ovaj mekotkivni kompleks oko implantata i njegove protetske nadogradnje čini svojevrsni protektivni čep koji onemogućava prodor mikroorganizama prema koštanom tkivu i čuva implant od disruptivnih činilaca (slika 2).



Slika 2. Mekotkivni kompleks oko vrata implantata, histometrijska analiza

Skraćenice: PM, površina marginalne gingive; aS, apikalna ekstenzija sulkusa; aJE, apikalni deo vezivnog epitela; fBIC, prvi, kost – implant kontakt; JE, dužina vezivnog epitela (as/aJE); BW, biološka širina (PM/fBIC)

Epitelna komponenta ovog mekotkivnog kompleksa predstavlja prvu liniju odbrane od stranih antigena, a pre svega od invazivnih mikroorganizama. Epitelni pripoj sa protetskom nadogradnjom ili vratom implantata, takođe omogućava mekom tkivu da na adekvatan način prekrije opisane strukture implantata i tako nedvosmisleno poboljša ukupni estetski učinak protetske nadoknade izrađene na implantatu (Al-Sabbah, 2006; Lee i Jun, 2000).

Epitelne ćelije zajedno sa fibroblastima, kao glavnom komponentom vezivnog tkiva, predstavljaju fundamentalne gradivne histološke činioce mekotkivnog kompleksa i direktno utiču na kvalitet procesa oseointegracije dentalnog implantata.

Mnogi faktori rasta, kao što su morfogeni proteini i citokini, bivaju sekretovani od strane ovih ćelija i imaju direktan uticaj na koštanu histofiziologiju. Da bi ćelija mogla da se diferentuje ili iskaže svoj sekretorni potencijal, neophodno je da se veže za odgovarajući supstrat. Ovakva ćelijska adhezija, dešava se posredstvom odgovarajućih celularnih struktura, kao što su hemidezmozomi, fokalne adhezije ili specifični proteinski molekuli, tj. receptori. Tako, na primer, integrin svoju ulogu ispoljava u domenu fokalnih adhezija (Chrzanowska-Wodnicka i Burrige, 1996), dok kadherini svoju ulogu ispoljavaju u hemidezmozomima (Chrzanowska-Wodnicka i Burrige, 1997).

Hemijska priroda kao i topografija samog supstrata u značajnoj meri utiču na prirodu preliminarnog sloja koji će se formirati na njegovoj površini, kao i na kasnije celularne adhezije, proliferacije, orijentacije, diferencijacije i celularne ekspresije, bilo da su u pitanju epitelne ćelije ili fibroblasti (Schaller, 2001; Schlaepfer, Hauck, i Sieg, 1999).

Tretiranje površine različitih biomaterijala na različite načine izvodi se sa ciljem ostvarivanja što većeg broja celularnih adhezija. Tradicionalno, titanijum je najčešće eksploatisan materijal u svrhe izrade dentalnih implantata, te je stoga i najšire ispitivan.

Najčešće primenjivane metode u cilju poboljšanja integrativnih karakteristika materijala kada je u pitanju titanijum, su prekrivanje hidroksiapatitom (HA), plazmiranje titanijumskim oksidima i nagrivanje kiselinom. Povećanje hrapavosti površine, dugo je smatrano ključnim faktorom za povećanje celularnih adhezija, ali je takođe eksperimentalno ustanovljeno da to zavisi i od tipa samih ćelija. Shodno tome, spomenuta korelacija je važila za osteoblaste, ali je bila potpuno oprečna kada su u pitanju epitelne ćelije i fibroblasti (Grossner-Schreiber i sar., 2006). Kada je u pitanju zavisnost broja adheriranih fibroblasta od hrapavosti površine materijala, objavljujane su mnoge kontradiktorne studije (Abrahamsson i sar., 2002; Catherine C. Berry, 2004; Kamal Mustafaa, 2005; Cochran DL, 1994), što nameće potrebu za daljim istraživanjima na ovu temu.

Pojava novih materijala, kao i njihova sveobuhvatnija primena u stomatologiji, dodatno promovise potrebu za ovakvim ispitivanjima, naročito kada je u pitanju cirkonijum. Ovaj keramički materijal je dobro poznat po svojoj biokompatibilnosti i povoljnim mehaničkim karakteristikama, jer je tradicionalno korišćen u ortopedskoj hirurgiji, a naročito u artroplastici kuka. Bela boja čini ovaj materijal vrlo atraktivnim kada su u pitanju nadoknade nedostajućih zuba. Uveden je pre dve decenije kao revolucionaran materijal u polju implantologije, u prvom redu za izradu protetskih nadogradnji na implantatima. Zbog svoje biokompatibilnosti, povoljnih mehaničkih karakteristika i izvanredne estetske privlačnosti postao je brzo najpoželjniji materijal u polju estetske stomatologije i implantologije. Estetske prednosti ovog materijala su neosporne. Tako na primer njegovom primenom se izbegava sivkasta prebojenost mekih tkiva oko protetske nadoknade na implantatu. Takođe, cirkonijumska suprastruktura dozvoljava izradu i cirkonijumske protetske nadoknade, koja zbog veće transparentnosti i translucenosti značajno doprinosi postizanju boljih estetskih rezultata.

Međutim bez obzira na činjenicu da se cirkonijum promovise kao izuzetno biokompatibilan materijal, smatra se još uvek nedovoljno ispitanim, kada je u pitanju adhezija fibroblasta za njegovu površinu kao i mekotkivna integracija implantata.

2. IMPLANTO-PROTETSKI KOMPLEKS

2.1. Istorijski razvoj implantologije

Pokušaji i nastojanja ljudi da nadoknade nedostajuće zube implantatima sežu u same početke civilizacije. Različite kulture koje zauzimaju važno mesto u istoriji ostavile su tragove koji su otkriveni u arheološkim nalazištima. Pre oko 4000 godina, pripadnici drevne kineske civilizacije koristili su stabla bambusovog drveta za pravljenje šiljaka oblika zuba koje su postavljali u koštano tkivo vilica. Takođe, pre 2000 godina drevni egipćani su pokušavali isto sa plemenitim metalima (Misch, 2005).

Plemena u Srednjoj Americi čije su kulture cvetale sve do dolaska Evropljana sredinom 15. veka ukrašavala su zube brušenjem, ugradnjom poludragog kamenja u obliku inleja ili ugradnjom inleja od plemenitih legura. Osim ukrašavanja, postoje i brojni dokazi o pokušajima transplantacije zuba kao i različiti pokušaji implantacije na mestima ekstrakcije (Knežević, 2002). Posebno zanimljiv arheološki nalaz za istoriju dentalne implantologije pripada *Wilsonu Popenoea-u* i njegovoj supruzi. Naime, oni su u Hondurasu pronašli deo donje vilice pripadnika civilizacije Maja iz 7. veka, u kojoj su se u alveolama triju donjih sekutića nalazile replike zuba izrađenih od školjki. Posle su rendgenska snimanja dokazala stvaranje nove kosti oko mesta implantacije (Sullivan, 2001).

Do samog kraja 19. i početka 20. veka koncept implantologije pomalo je zapušten, a onda su ponovo krenula nastojanja da se aloplastični materijali upotrebljavaju za implantaciju. Materijali poput kaučuka, zlata i porcelana vežu se uz autore kao što su *Perry* 1888. i *Snamensky* 1891. godine. Nakon toga, počinju da se koriste legure metala kao zamena za pojedinačni zub ili kao retencija za fiksnu ili mobilnu protetsku nadoknadu. Tadašnji implantati su dizajnirani u različitim oblicima kao što su šuplji šraf, puni šraf, clinidrična mrežica, igla itd. (Knežević, 2002).

U Evropi, prvi literaturni tragovi o dentalnim implantatima javljaju se 1809. godine, a do kraja 19. veka istraživači u ovoj oblasti, na obe strane Atlantika prave brojne pokušaje.

Ozbiljan napredak dešava se tek 1941. godine kada je *Gustav Dahl*, švedski doktor, uspešno postavio metalnu strukturu ispod periosta koja je prominirala iznad nivoa desni. Sledeći pomak dešava se kada je *Leonard Linkow*, 1946. godine, predstavio samonarezujući titanijumski implanat, koji je kasnije zamenio implantatom oblika sečiva. Ovaj implantat je bio najšire primenjivani dentalni implantat sedamdesetih godina prošlog veka (Sullivan, 2001).

Moderni koncepti implantologije kakvi se danas poznaju oblikovali su se na temelju istraživanja švedskog anatora *Per-Ingvar Branemarka* koja počinju pedesetih godina prošloga veka. Branemark je zečevima ugradio titansku napravu u fibulu kako bi pratio zarastanje kosti. Nakon nekoliko meseci, kada je te iste naprave trebalo izvaditi, primetio je kako se kost čvrsto vezala za materijal. Taj fenomen Branemark je nazvao oseintegracijom. Trebalo je još 10 godina da ovo revolucionarno otkriće prikaže svoj značaj u kliničkoj praksi, kada je ranih šezdesetih godina, ustanovio da se biokompatibilnost titanijuma manifestuje i na koži i mekim tkivima humanog porekla (Sullivan, 2001).

Prvi klinički slučaj ugradnje implantata Branemark je izveo davne 1965. godine. U narednih 5 godina, prateći postignute rezultate ovako primenjene terapije, došao je do zaključka da su bili neprihvatljivo loši, i to sa postotkom neuspeha od čak 50 % (Albrektsson i Wennerberg, 2005). Tokom sledećih godina objavio je brojne radove, a 1978. svoja dostignuća je komercijalizovao, plasirajući na tržište titanijumske dentalne implanate. Njegove studije su trajale skoro 30 godina i bile su poprilično skeptično gledane sve do 1981. godine, kada je konačno objavio sve svoje pronalaskе nakon brojnih testiranja u in vitro i in vivo uslovima.

Prošlo je još dosta vremena dok 1976. godine, Švedski nacionalni zdravstveni savet nije deklarirao ovaj terapijski modalitet kao validnu metodu lečenja bezubosti vilica. Nakon ove formalne verifikacije *Brenemarkovog* terapijskog modaliteta, dolazi do proširenja interesovanja za isti, naročito na Severno-američkom kontinentu. Tako je tim lekara sa Kanadskog Univerziteta, predvođenih *Georg-om Zarbom* otišao u Švedsku kasnih sedamdesetih godina prošloga veka, kako bi se obučili u *Brenemarkovoj* metodi postavljanja dentalnih implantata. Na konferenciji u Torontu 1982. godine definišu se smernice za implantologiju. Standardizacija procesa bila je „vetar u leđa“ tadašnjoj mladoj grani stomatologije i javnost počinje da prihvata implantologiju kao punopravni i sigurni oblik terapije bezubosti vilica. Ovakvo veliko interesovanje za dentalnu implantologiju dovelo je do sprovođenja slične kliničke studije u Kanadi, koja je za kratko vreme postala svojevrsna paradigma u implantologiji, predstavljajući takođe i prvo mesto na svetu posle *Geteburga* gde se razume i prihvata *Brenemarkov* koncept oseintegracije. Za kratko vreme požrtvovano radeći u ovoj oblasti napravili su najveću

implantološku bazu podataka u svetu. Nakon brojnih kliničkih studija koje su izvedene, a zaslugama *dr Zarba*, prošireno je i indikacijsko područje za ugradnju dentalnih implantata, sa isključivo bezubih i na krezube vilice pacijenata. Ubrzo je objavio i prve rezultate kliničkih ispitivanja ugradnje implantata kod krezubih pacijenata, što je dovelo do opšteg prihvatanja ovakovog terapijskog modaliteta kao validnog (Zarb, Zarb i Schmitt, 1987; Zarb i Schmitt, 1993a; Zarb i Schmitt, 1993b). Nakon konferencije u Torontu, u osamdesetim godinama 20. veka implantologija doživljava i komercijalni procvat i rezultati uspešne oseintegracije penju se na više od 90 %.

Sledeće dve decenije obeležene su napretkom tehnološkog proizvodnog procesa dentalnih implantata, kao što su primjerice modifikacije površine implantata (Ajay, 2013). Dentalni implantati su od tog trenutka počeli da se razvijaju vrtoglavom brzinom. Nakon usresređenja isključivo na funkcionalni aspekt oralne implantologije, fokus interesovanja polako počinje da se premešta i na estetski aspekt. Manje ili više koncept imedijatnog opterećenja implantata biva zamenjen odloženim. Takođe, uvode se i procedure koštanih augmentacija kako bi se postigli neophodni uslovi za izvođenje implantološke terapije, u situacijama kada raspoloživost koštanih fundamentata to ne dozvoljavaju. Takozvani tkivni inženjering, otvara potpuno nove vidike u planiranju, ali i u izvođenju implantoloških zahvata.

2.2. Elementi i vrsta implanto-protetskog kompleksa

Osnovna podela dentalnih implantata je na: transdentalne, subperiostalne, intramukozne i endosealne (Knežević i sar. 2002). Najčešće primenjivani tip dentalnih implantata su endosealni implantati oblika korena zuba, te će njima će biti posvećena posebna pažnja.

2.2.1. Transdentalni implantati

Transdentalni implantati predstavljaju kočiće s kugličastim završetkom na kraju, koji danas imaju samo istorijski značaj. Ovi implantati su se ugrađivali u koren zuba s apikalne strane. Osnovna je ideja bila produžiti uzdužnu osovinu zuba nakon resekcije više od apikalne trećine korena kod radikularnih cista vilica, ili pak produžiti vek replantiranih ili transplantiranih zuba kod kojih se kao komplikacija očekivala lakunarna resorpcija korena pa je sam implantat trebao da preuzme funkciju korena. Osim spomenutih indikacija, transdentalni

implantati primenjivani su se i kod fraktura korena, proširenih indikacija za apikotomiju ili parodontopatije (Knežević i sar., 2002).

2.2.2. Subperiostalni implantati

Subperiostalni implantati poput mrežice leže na koštanom tkivu ispod periosta. Ova vrsta implantata uvedena još 40-ih godina prošlog veka i ima najdužu istoriju upotrebe u dentalnoj implantologiji. Glavna indikacija za ovaj tip dentalnih implantata je bezubost, kada zbog resorpcije kosti nema dovoljno mesta za ugradnju endosealnih implantata, a pacijent ne može da nosi konvencionalnu protezu.

2.2.3. Intramukozni implantati

Intramukozni implantati se prostiru kroz celu zapreminu kosti. Mogu se koristiti samo u donjoj vilici, a razvijeni su za pacijente sa izraženom resorpcijom alveolarnog grebena.

2.2.4. Endosealni implantati

Endosealni implantati se hirurški ugrađuju u kost kako bi zamenili koren jednog ili više zuba koji nedostaju. Reč „endosealni“ je izvedena iz grčke reči „endo“, što znači „u“ i reči „osealni“, što znači „kost“. Najčešće su strukturalna rešenja implantata takva, da podrazumevaju kompleks, sačinjen iz dve mehaničke celine, koje su međusobno komplementarne. Takav kompleks podrazumeva postojanje tela implantata, koje može biti različitog dizajna i protetsku nadogradnju koja se za telo implantata može fiksirati na različite načine, a najčešće lepljenjem, šrafljenjem ili pomoću magneta. Nasuprot gore navedenoj činjenici, postoji i nekoliko implantoloških sistema koji su jednokomadni, tj. telo implantata i protetska nadogradnja su neodvojivo povezani.

Endosealni implantati predstavljaju vrstu dentalnih implantata koja se danas najčešće upotrebljava, a prema obliku se mogu podeliti na:

- igličaste;
- pločaste;
- implantate u obliku korena zuba (Branemark i sar. 2001).

Igličasti implantati, kao što i sama reč kaže po svom izgledu podsećaju na iglu. Dizajnirao ih je i predstavio u ranim 60-im godinama prošlog veka francuski stomatolog *Scialom*. Uglavnom su se koristili u slučajevima kada je preostala kost smanjene gustine i stabilnost implantata se postiže kortikalnim sidrenjem (Ćalasan, 2014).

Pločasti implantati svojim izgledom podsećaju na oštricu sekire. Upotrebljavaju se kad je preostali koštani greben preuzak za ugrađivanje implantata oblika korena i nije moguća augmentacija kosti.

Implantati u obliku korena zuba smatraju se zlatnim standardom u dentalnoj implantologiji (slika 1). To su najpopularniji i najčešće korišćeni implantati u celom svetu. Indikovani su u slučaju kada pacijentu nedostaje jedan ili više zuba, a prisutan je dovoljan volumen kosti. Ovaj tip implantata se proizvodi u različitim oblicima i veličinama.



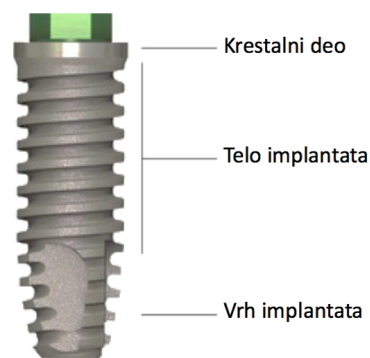
Slika 1. Šematski prikaz endosealnog dentalnog implantata oblika korena zuba

Stabilnost dentalnih implantata postiže se direktnim kontaktom između koštanog tkiva i površine implantata, a što je veća primarna stabilnost, to je uspešnija implantološka terapija. Upravo je dizajn, uz svojstva materijala, jedan od najvažnijih činioca za postizanje dobre primarne stabilnosti. Postoje dva osnovna aspekta dizajna: makrostruktura, karakterizirana oblikom vrata, tela i apeksa implantata, brojem i nagibom navoja, i mikrostruktura, karakterizirana obradom površine.

Kod dvokomponentnih implantoloških sistema u sklopu protetske nadogradnje razlikuju se telo implantata i transmukozni deo.

2.2.5. Telo implantata

Telo implantata predstavlja deo implanto-protetskog kompleksa koji se postavlja u oblast koštanog fundamenta vilice, a na mestu nedostajućeg zuba. Telo implantata se strukturalno deli na tri segmenta. Gornji deo, koji je okrenut prema površini kosti, definisan je kao krestalni deo (modul) ili vrat implantata. Srednji segment implantnog tela predstavlja telo implantata u užem smislu. Donji deo tela implantata, duboko potopljen u koštanom tkivu, definisan je kao apeks tela implantata (slika 2).



Slika 2. Šematski prikaz tela dentalnog endosealnog implantata

Telo implantata može biti dizajnirano na različite načine, a najčešće je u formi tipičnog šrafa, odnosno konusa ili oblika cilindra ili je u pitanju kombinacija prethodna dva dizajna (slika 3). Obe varijante mogu biti s navojima ili bez navoja. Navojima se postiže povećanje kontaktne površine, kao i dobra mehanička veza s koštanim tkivom. Pokazalo se da navoji u obliku slova V i širi četvrtasti navoji stvaraju manje stresa i bolje prenose sile u poređenju s tankim navojima i navojima koji se sužavaju na vrhu (Hupp i sar. 2013).



Slika 3. Različiti dizajni tela implantata: cilindrični implantati (prvi red); implantati oblika šrafa, (srednji red); kombinacija prethodna dva dizajna (donji red)

Najčešće korišćeni dizajn dentalnih implantata je šraf, koji je do sada pokazao najbolje rezultate u postizanju primarne stabilnosti. To je omogućeno zbog uspostavljanja veće kontaktne površine implantata i kosti, ključne za uspešnost implantološke terapije. Cilindrični implantati su nekada jednostavniji za postavljanje, naročito u mekšoj kosti, ali zahtevaju bioaktivnu površinu kako bi se kompenzovala redukovana površina kontakta implantata i kosti (Misch, 2005).

Krestalni modul tela implantata je dizajniran za komplementarno sjedinjavanje s protetskom komponentom i tako je nazvan jer se obično nalazi u krestalnom delu alveolarnog gerebena. Kod nekih implantoloških sistema ovaj krestalni deo je tako dizajniran da istovremeno predstavlja transmukoznu komponentu. Vrat implantata predstavlja područje na kojem je prisutna najveća koncentracija naprezanja. Može imati paralelne, divergentne ili konvergentne zidove. Krestalni deo je obično većeg stepena glatkoće u odnosu na ostatak tela implantata, a sa ciljem umanjavanja plak prijemčljivosti, te bolje mekotkivne integrativne sposobnosti (Misch, 2005). Iako nekolicina autora tvrdi da hrapavost površine ne utiče u značajnoj meri i na plak prijemčljivost (Wennerberg i sar., 2003), danas je opšte prihvaćeno da ovakva korelacija ipak postoji (Quirynen i sar., 1993). Sa druge strane dokazano je da ispoliranost površine ispod vrednosti Ra od 0.2 mikrometra ne utiče dalje na akumulaciju

dentalnog plaka, ali značajno redukuje adherenciju epitelnih ćelija i fibroblasta, što sa tog aspekta posmatrano, kompromituje toliko željenu mekotkivnu integraciju (Bollen i sar, 1996).

Prema izgledu apeksa (vrha) dentalnog implanta razlikujemo ravni, zaobljeni i V oblik vrha.

2.2.6. Protetska nadogradnja

Bez obzira na dizajnerski tip implantata, transmukozna komponenta je neophodna kao svojevrsna podrška protetskoj nadoknadi. Kod implantata forme korena zuba ova komponenta pokazuje širok opseg varijacija u pogledu oblika i materijala od kojih je napravljena (slika 4).

U kliničkoj praksi postoje jednokomadni implantološki sistemi, kod kojih su telo implantata i transmukozna komponenta neodvojivo povezani. Međutim, danas su više zastupljeni implantološki sistemi koji se sastoje iz dve ili više zasebnih međusobno mehanički komplementarnih jedinica (Sitbon, 2009).



Slika 4. Različiti tipovi protetskih nadogradnji u pogledu dizajna i materijala

Transmukozna komponenta može biti prosto produžetak krestalnog modula koji prominira u oblast usne duplje, ili se fiksira za krestalni modul tela implantata na različite načine (šrafljenjem, cementiranjem, mehaničkim uzgloblavanjem itd.). Transmukozna komponenta kod nekih implantata predstavlja substrukturu za fiksiranje treće komponente koja je protetska i koja služi za retenciju protetske nadoknade nošene implantatima (Bollen, 2006).

Radi pojednostavljenja, transmukoznu komponentu ćemo u daljem tekstu definisati, kao protetsku nadogradnju, a u anglosaksonskoj literaturi pozanatu kao „abutment”, iako terminologija suštinski posmatrano ne mora biti apsolutno tačna.

Različiti dizajni, kao i strukturalno-tehnička rešenja izrade dentalnih implantata usloveli su i različite protokole za ugradnju. Tradicionalni, dvofazni hirurški protokol ugradnje dentalnih implantata, podrazumeva postavljanje tela implantata u ispreparisani koštani fundament vilice, te njegovo prekrivanje mukoperiostalnim režnjem. Tek u drugoj fazi hirurške terapije, vrši se ekspozicija tela implantata i to njegovog krestalnog modula, te postavljanje transmukozne komponente (Ćalasan, 2014).

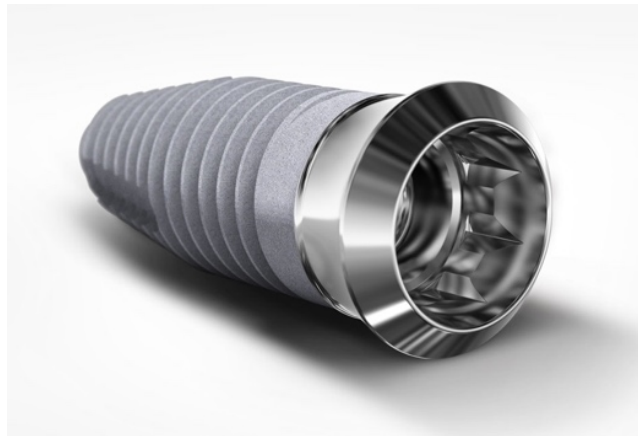
Nasuprot opisanom dvofaznom protokolu ugradnje implantata, postoji i jednofazni. Ovaj protokol podrazumeva, ugradnju tela implantata u koštano tkivo vilica i sledstveno postavljanje transmukozne komponente, koja prominira u oblast usne šupljine. U ovom slučaju lekar može odabrati i imedijatno opterećenje implantata, koje podrazumeva postavljanje privremene protetske nadogradnje i privremene protetske nadoknade, a koja u tom slučaju mora biti isključena iz opsega delovanja svih okluzalnih sila (Knežević, 2012).

Protetska nadogradnja, ukoliko ne predstavlja sastavni deo tela implantata, za njega se može fiksirati na različite načine ali u domenu dva modusa, eksterne ili interne konekcije (Bollen, 2006). Kod implantoloških sistema sa eksternom konekcijom, krestalni modul tela implantata je ustvari platforma, s anti-rotacionim svojstvom, najčešće s heksagonalnim konekcijskim profilom, koja prominira iznad nivoa desni (slika 5). Komplementarni transmukozni deo koji strukturalno odgovara ovoj platformi se zatim na podesan način za nju fiksira, najčešće nezavisnim šrafom (Sitbon, 2009).



Slika 5. Implant sa eksternom heksagonalnom konekcijom

Implantološki sistemi s internom konekcijom mogu imati širok opseg varijacija, kada je u pitanju dizajn ove konekcije. Zajednička karakteristika svih ovih implantoloških sistema je postojanje šupljine u kralnom modulu tela implantata. Šupljina može imati heksagonalni, oktagonalni (slika 6), konični, cilindrični, trouglasti profil, itd... Transmukozna komponenta ustvari predstavlja bazu protetske nadogradnje, a po dizajnu je komplementarna šupljini u telu implantata i za njega se fiksira šrafljenjem, cementiranjem ili uzglobljavanjem (Sitbon, 2009).



Slika 6. Interna oktagonalna konekcija

2.3. Biološka tkiva u kontaktu s implanto-protetskim kompleksom

Osnovna uloga implantata i protetske nadogradnje je nadoknada nedostajućeg zuba. Suštinski, telo implantata zamenjuje koren nedostajućeg zuba, dok protetska nadogradnja služi kao nosač i veza za odgovarajuću protetsku nadoknadu. Telo implantata nema istu vezu s okolnim tkivima kao i prirodan zub. Osnovna razlika je izostajanje periodontalnog ligamenta, koji u slučaju prirodnog zuba predstavlja element sidrenja, vezujući koren zuba u koštanoj čašici kroz mrežu mnogobrojnih vlakana (Jemt i sar., 1989). Ovaj ligament sadrži mnoštvo različitih ćelija i histoloških elemenata, koji mu obezbeđuju multifunkcionalnost. Tako se, na primer, za periodontalni ligament vezuju mehanoreceptori, koji kroz mehanizam povratne sprege direktno utiču na magnitudu ali i smer delovanja okluzalnih sila. Pored ovoga, periodontalni ligament služi i kao svojevrsan biološki amortizer zahvaljujući svojoj viskoelastičnoj prirodi (Glišić, 2016). Mehanički kompleks tela implantata i protetske nadogradnje, usled odsustva ovog ligamenta, manjka u pogledu senzorne i protektivne uloge. Odnos

implantata sa okolnim koštanim i mekim tkivima je neposredan, baziran na direktnom kontaktu, bez prisustva organizacije i strukture periodontalnog ligamnta. Protetska nadogradnja, kao transmukozna komponenta, takođe ispoljava signifikantane različitosti u svom odnosu s mekim tkivima, u poređenju s prirodnim zubom. Ova činjenica se dominantno manifestuje u odsustvu vezivnih vlakana, koja karakterišu periodontalni ligament (Kay, 1993).

2.3.1. Koštano tkivo

Koštano tkivo predstavlja mineralizovano vezivno tkivo koje obezbeđuje potporu, zaštitu, lokomotornu funkciju i predstavlja ujedno važan rezervoar minerala (Marks, 1997). Ono se sastoji težinski od 28 % kolagena tipa 1 i 5 % nekolagenih proteina. Organski matriks prožimaju substituisani kristali hidroksiapatita, čineći preostalih 67 % koštanog tkiva. Kost predstavlja čvrsto tkivo konstituisano iz kompaktne ili kortikalne kosti i šuplikave, tj. spongiozne kosti. Kortikalna kost se nalazi uglavnom na površni dok je spongioza rezervisana za centralne delove kosti. Kortikalna i spongiozna kost imaju različito metaboličko ponašanje, ali u osnovi dele slične histološke karakteristike (Kobayashi i sar., 2005).

One se sastoje iz slojeva takozvanih lamela. Ovi slojevi su organizovani u koncentrične, cirkumferencijalne i intersticijalne strukture. Koncentrične lamele obrazuju cilindrične formacije kosti, nazvane osteoni, koji su uglavnom orijentisani paralelno s uzdužnom osovinom kosti. Osteon je primarna metabolička jedinica kosti. U njegovom centralnom delu se nalazi Haverzov kanal. On sadrži kapilare i nervna vlakna, i ovičen je koštanim ćelijama. Susedni Haverzovi kanali su međusobno povezani Volkmanovim kanalima, koji takođe sadrže krvne sudove, što omogućava obrazovanje bogatog vaskularnog kompleksa. Intersticijalne lamele popunjavaju prostor između osteona. Obrazovanje novog koštanog tkiva, procesi remodelacije, kao i reparacije dešavaju se zahvaljujući aktivnosti za to specijalizovanih ćelija, osteoblasta i osteoklasta (Everts i sar., 2002).

Različite ćelije su odgovorne za formiranje, resorpciju i održavanje koštane arhitekture. Dve vrste ćelijskih linija su prisutne u kosti, svaka sa specifičnom funkcijom koju obavlja:

- Osteogene ćelije koje formiraju i održavaju koštano tkivo; i
- Osteoklasti koji resorbuju kost (Klein-Nulend i sar., 2003).

2.3.1.1. Osteoblasti

Osteoblasti predstavljaju mononukleusne ćelije i odgovorne su za sintezu kolagenih i nekolagenih proteina koštanog matriksa. Koštani matriks je definisan kao osteoid i predstavlja svojevrsnu potku za procese kasnije mineralizacije kosti. Osteoblasti su pluripotentne ćelijske formacije uglavnom mezenhimalnog porekla. U kostima glave osteoblasti imaju ektomezenhimalno poreklo (Cate i Nanci, 2001).

Na spoljašnjoj površini ćelijske membrane ispoljavaju visok nivo prisustva alkalne fosfataze. Ovaj enzim je odgovoran za odvajanje fosfatnih molekula, te na taj način nedvosmisleno doprinosi incijaciji i propagaciji mineralizacije osteoida. Pored strukturalnih proteina matriksa, uglavnom tipa kolagena, osteoblasti sekretuju nekolagene proteine, kao što su dekorin, trombospondin, fibronektin osteopontin, itd. Ova sekretorna aktivnost direktno proporcionalno zavisi od razvojnog stepena ćelije (Klein-Nulend i sar., 2003).

Preciznije gledano, osteoblasti, kao i njihove prekursorne ćelije, sekretuju različite faktore rasta i citokine, koji direktno participiraju u procesima regulacije celularnih funkcija, a samim tim koštane sinteze ili resorpcije. U spomenute faktore spadaju koštani morfogeni proteini (BMPs), insulin zavisni faktori rasta (IGF), fibroblastni faktor rasta (FGF), faktor rasta dobijen iz trombocita (PDGF), itd. Nakon završetka procesa stvaranja nove kosti, osteoblasti ostaju na njenoj površini u vidu tanke linijske celularne formacije (Martin, 1994).

2.3.1.2. Osteociti

Dok osteoblasti formiraju koštano tkivo, nekolicina biva zarobljena u mineralizovanom matriksu i tada se dešava njihova konverzija u osteocite. Na taj način se obrazuje prostor definisan kao osteocitna lakuna (Cate i Nanci, 2001). Male celularne ekstenzije održavaju kontakt između susednih lakuna, a samim tim između susednih osteocita i osteoblasta, doprinoseći očuvanju intercelularnog funkcijskog integriteta. Ovakva komunikacijska mreža održava integritet kosti i njenu vitalnost, što se naročito ogleda u reparatornim procesima stvorenih mikropukotina u kosti. Ukoliko ovakva mreža ne bi postojala, došlo bi do procesa hipermineralizacije ili skleroze kosti, kao i do njenog odumiranja (Martin, 1994).

2.3.1.3. Osteoklasti

Osteoklasti su velike mutinukleusne ćelije, lokalizovane uglavnom na površini kosti. Njihova osnovna uloga je u resorpciji kosti (Cate i Nanci, 2001). Udruženo delujući sa osteoblastima odgovorni su za procese formiranja nove kosti, kao i za procese remodelacije, te reparacije postojeće kosti. Morfološki gledano, karakteriše ih iregularna talasasta površina, sa brojnim evaginacijama citoplazmatske membrane, a orijentisanim prema površini kosti. Oko ove talasaste membrane osteoklasta, nalazi se periferna adherentna zona, koja obezbeđuje vezivanje ćelije za površinu kosti. Na taj način se zatvaraju mikroskopski prostori obrazovani između invaginacija ćelijske membrane osteoklasta i površine kosti (Salo i sar., 2003). Protonske pumpe koje su udružene sa talasastom ćelijskom membranom osteoklasta, povećavaju koncentraciju vodoničnih jona u formiranim prostorima, te na taj način redukuju pH vrednosti. Ovakvo smanjenje pH vrednosti dovodi do demineralizacije površine kosti. Kada do toga dođe osteoklasti oslobađaju brojne vezikule u taj prostor, koje sadže različite enzime, kao što je katepsin, koji razgrađuje organski matriks koji je sada eksponiran procesom demineralizacije (Salo i sar., 2003). Organski i neorganski produkti procesa demineralizacije, tj. degradacije koštanog tkiva, bivaju zatim eliminisani endocitozom i transcitozom. Ulegnuća formirana na površini kosti resorptivnom aktivnošću osteoklasta, definisane su kao Hovšipove lakune.

Osteoklasti imaju hematopoetsko poreklo i slično kao i osteoblasti pokazuju više nivoa u okviru procesa diferencijacije. Svaki od spomenutih nivoa diferencijacije, kontrolisan je aktivnošću različitih citokina, faktora rasta i hormona. Takođe, značajno je napomenuti da diferencijacija osteoklasta iz njihovih prekursornih ćelija, zavisi i od prisustva osteoblasta, što se manifestuje kroz receptor-ligand vezujući mehanizam. Na prekursornim ćelijama osteoklasta, postoji receptor zvani RANK, a koji se vezuje za ligand na površini osteoblasta zvani RANKL. Ovakva veza direktno podstiče diferencijaciju prekursornih ćelija osteoklasta, u zrele i aktivne osteoklaste. Imajući u vidu ovu činjenicu, nameće se logičan zaključak da će se resorpcija dešavati samo na mestima gde će spremni osteoblasti moći da sintetišu novu kost (Roodman, 1998).

Takođe solubilni protein sekretovan od strane osteoblasta, osteoprotegrin, koji je ujedno član velike familije Tumor Nekrozis Faktora, ima sposobnost blokade RANKL-a, što direktno utiče na inhibiciju dalje interakcije između osteoblasta i prekursora osteoklasta. Na ovaj način

osteoblasti ostvaruju direktan uticaj na diferencijaciju i aktivnost samih osteoklasta (Salo i sar., 2003).

2.3.1.4. Zarastanje koštanog tkiva - oseointegracija

Oseointegracija se može definisati kao „direktan kontakt ili veza vitalnog koštanog tkiva sa površinom implantata bez prisustva vezivnog tkiva”. To je strukturna i funkcionalna veza između koštanog tkiva i površine implantata koja podnosi opterećenje. Tokom oseointegracije dolazi do konstantnih metaboličkih i morfoloških promena koje se dešavaju na nivou koštanog grebena u koji je integrisan implantat i kontaktne kosti na površini implantata, čime se obezbeđuje funkcionalnost implantata. Da bi se za implantat moglo reći da je oseointegrisan dovoljno je da ostvari kontakt na 75% površine (Branemark, 2001).

U odnosu na tip procesa, proces oseointegracije prolazi kroz dve faze, gde prva faza podrazumeva primarno oseointegrisanje implantata, a druga faza podrazumeva adaptaciju tkiva na opterećenje okluzalnim silama. Proces implantacije podrazumeva niz tkivnih povreda počevši od incizije, odizanja mukoperiostalnog režnja, preparacije kanala i pozicioniranja samog implantata. Sledstveno tome, proces oseointegracije 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 koaguluma, 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). 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).

Karakteristike kosti kao i njena reakcija na ugradnju implantata, karakteristike implantata (makro i mikro-dizajn), zajedno sa karakteristikama hirurške tehnike koja mora biti maksimalno atraumatska, kao i biokompatibilnost materijala su najvažniji parametri koji uglavnom utiču na kliničke rezultate uspešnosti oseointegriranih implantata i koriste se za protetsku rehabilitaciju parcijalne ili bezubosti (Glišić, 2016). Pored navedenih parametara, na oseointegraciju utiču i starosti, pol, opšte zdravstveno stanje, opšte oralno stanje, osteogenetički faktori.

U daljem tekstu će akcenat biti na dizajnu implantata i na histološku građu oralnih tkiva koja su u kontaktu sa dentalnim implantatima, dok će o biokompatibilnosti materijala biti reči u sledećem poglavlju.

2.3.1.4.1. Dizajn implantata

U današnje vreme uglavnom su u primeni endoosealni implantati oblika korena zuba, čiji je dizajn sličan korenu zuba. Svoju oseointegraciju ostvaruju preko nepravilnih useka raspoređenih na apeksu ili na sredini tela implantata.

Karakteristike dizajna implantata predstavljaju osnovne elemente koji utiču na primarnu stabilnost i mogućnost implantata da izdrži opterećenje za vreme i nakon procesa oseointegracije. Dizajn implantata se može podeliti u dve kategorije: makrodizajn i mikrodizajn.

Makrodizajn implantata podrazumeva navoj, oblik implantata i dizajn navoja (Geng i sar., 2004 a, b).

Mikrodizajn predstavlja materijale od kojih su napravljeni implantati, morfologiju površine i oblaganje površine implantata različitim slojevima.

Makrodizajn implantata

Mehaničke karakteristike i sposobnost implantata da optimalno prihvati i distribuira okluzalno opterećenje određuje makrodizajn implantata. Oblik implantata (dijametar i dužina) i navoja (dubina, širina, nagibni ugao, gustina) doprinosi optimalnoj primarnoj stabilnosti i ravnomernoj distribuciji zagrižajnih sila na okolnu alveolarnu kost (Wyatt i Zarb, 1998; Lekholm, 1994).

Mikrodizajn implantata

Mikrodizajn implantata je važan preduslov oseointegracije. Integracija implantata u koštanom tkivu nakon postupka ugradnje implantata predstavlja osnovnu ideju na kojoj se bazira oseointegracija. Materijal izbora je titanijum, a danas postoje samo različiti oblici površinske obrade implantata (Massaro i sar., 2002).

Dugi niz godina površina implantata obrađivana je samo mašinski, međutim polazeći od toga da se značajno bolji rezultati postižu sa implantatima čija je površina poboljšana, danas su u upotrebi implantati sa povećanom, tj. modifikovanom površinom (Rupp i sar., 2006)

Hrapava, odnosno modifikovana površina implantata povećava površinski kontakt implantata i kosti dovodeći do bolje distribucije okluzalnog opterećenja i poboljšanja primarne stabilnosti implantata (Masaki i sar., 2005; Massaro i sar., 2002).

Sastav površine, hidrofilnost i hrapavost su parametri koji mogu imati važnu ulogu u interakciji između tkiva i implantata i oseintegracije (Le Gu'ehennec i sar., 2006)

S obzirom na temu ove doktorske disertacije, posebna pažnja biće posvećena opisivanju hrapavosti površine implantata u sklopu sledećeg poglavlja.

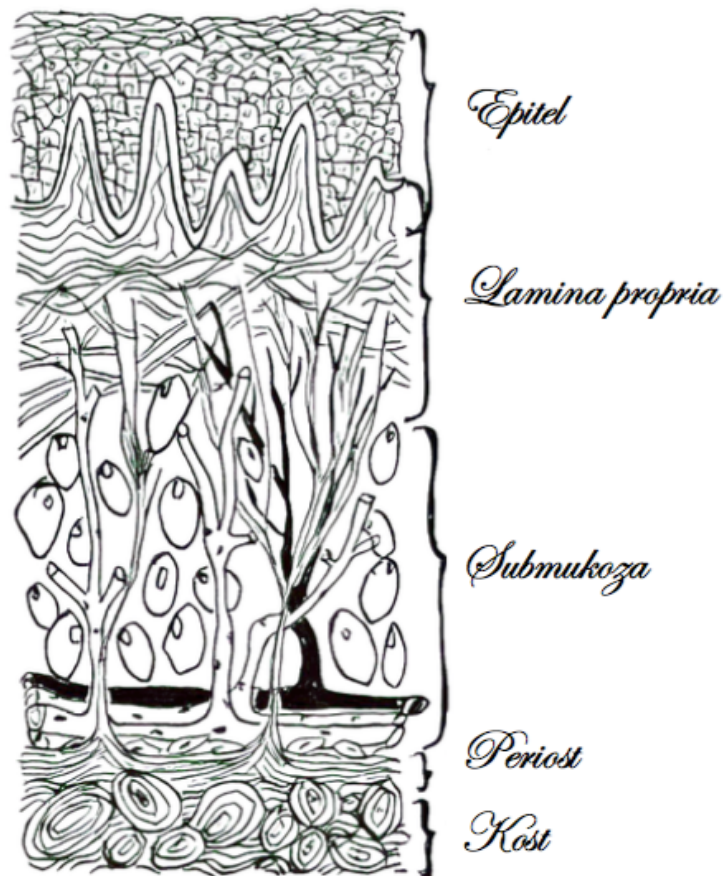
2.3.2. Oralna mukoza

Oralna mukoza (sluzokoža) je pokrovno tkivo, koje razdvaja usnu šupljinu od spoljašnje sredine. Ona pokriva većinu površina u usnoj šupljini, izuzev površine zuba. Spoj između mukoze i zuba je specijalizovani tip veze, koji omogućava semipermebilnu propustljivost, sprečavajući prodor različitih antigena, u prvom redu bakterija. Oralna mukoza je sačinjena od dve odvojene tkivne komponente: pokrovnog stratimiziranog skvamoznog epitela i vezivnog tkiva, koje leži ispod nje, zvanog lamina propria (slika 7). Ova dva sloja imaju zajedničke funkcije i smatraju se organom. Te funkcije su: protektivna, senzorna, sekretorna i funkcija termalne regulacije. One variraju od jedne do druge regije usne šupljine. Protektivna uloga je od fundamentalnog značaja za biološki i fizički integritet usne šupljine, a zbog direktnog kontakta oralne mukoze sa spoljašnjom sredinom, permanentnom prisustvu bakterija u usnoj šupljini, kao i stalnom delovanju mehaničkih noksi u toku žvakanja (Cate i Nanci, 2001).

Mekotkivna „kragna” koja okružuje vrat dentalnog implantata ili protetsku nadogradnju, može biti predstavljena keratinizovanom, pripojnom sluzokožom ili pokretnom sluzokožom. Sekretija pljuvačke je takođe fundamentalna funkcija oralne sluzokože, ali je ne izvodi sluzokoža koja okružuje kompleks dentalnog implantata (Armitage, 2004).

Zarastanje sluzokožne rane nakon hirurške procedure, odvija se po istim principima kao i zarastanje gingive u predelu prirodnih zuba posle modi kovane Widmanove režanj operacije. Proliferacija oralnog epitela sa ivice rane stvara epitel koji histološki odgovara sulkusnom

epitelu (pločasto slojevit epitel koji ne orožava). U daljem toku zarastanja stvara se i pripojni epitel, koji je nešto duži (oko 2 mm). Na ovaj način formira se periimplantatni sulkus kao kapilarni prostor oko implantata, analogno gingivalnom sulkusu. Njegova dubina je, međutim, veća i u proseku iznosi 2-3 mm. Vezivno tkivo mukoze formira čvrsto pripojen prsten sačinjen od kolagenih vlakana, ali je njihov pravac pružanja paralelan sa površinom implantata, za razliku od zuba gde su vlakna postavljena perpendilularno (Petrović, 2004).



Slika 7. Tkiva oralne mukoze

Imajući sve navedeno u vidu uočavaju se razlike u mikrostrukturi mekih tkiva oko implantata i zuba. To se pre svega odnosi na pravac pružanja vlakana koja su slabije vezana za površinu implantata i organizaciju krvnih sudova u apikalnom delu pripojnog epitela. Rezultat ovih razlika je manja otpornost u odnosu na delovanje patogenih toksina (Squier i Brogden, 2011).

2.3.2.1. Struktura oralne mukoze

Kontakt između epitela i vezivnog tkiva, koje se nalazi ispod, iregularnog je oblika. Prominencije vezivnog tkiva (papile vezivnog tkiva) uzglobljavaju se sa epitelnim grebenima i klinovima, čineći ovaj kontakt specifičnim (Squier i Brogden, 2011). Na mestu ovog kontakta prisutna je bazalna lamina koja predstavlja sloj bez strukture. Ispod sloja vezivnog tkiva nalazi se submukoza usne šupljine. Granica između submukoze i mukoze nije jasno definisana. Submukoza sadrži glavne krvne sudove, nerve i ponekad masno i žlezdano tkivo (slika 10).

Struktura, te gradivna kompozicija ovog tkiva, omogućava fleksibilnost veze između oralne mukoze i histoloških struktura ispod nje. U područjima gingive kao i tvrdog nepca, oralna mukoza se pripaja direktno za periost koštanog tkiva, koji se nalazi ispod nje. Ovaj histološki kompleks je definisan kao mukoperiost (Cate i Nanci, 2008).

2.3.2.2. Vezivno tkivo

Vezivno tkivo oralne sluzokože se naziva lamina propria. Ona pruža podršku i nutritivne oralnom epitelu. Ona se sastoji od osnovne supstance u kojoj su prisutne: ćelije, vlakna, krvni sudovi i nervi. Osnovna supstanca je sačinjena od proteoglikana i glikoproteina, kao što je fibronektin, koji je uključen u formiranje pripoja, širenja i migracije ćelija (Schroeder, 1981). U osnovnoj supstanci se nalaze dva osnovna tipa vlakana: elastična i kolagena vlakna (kolagen tipa I i kolagen tipa IV). Ova vlakna obezbeđuju potporu i otpornost mukoze i organizovana su u snopove na osnovu funkcionalne orijentacije (Cate i Nanci, 2008).

Osnovne ćelije lamina-e propria-e su fibroblasti, koji su odgovorni za sintezu vlakana i komponenti osnovne supstance, zahvaljujući čemu direktno doprinose fizičkom i funkcionalnom integritetu sluzokožnog tkiva. Takođe, sekrecijom faktora rasta, citokina i inflamatornih medijatora, kao i njihovom ulogom u degradacijskim procesima ekstracelularnog matriksa, omogućeno im je aktivno učestvovanje u procesima zarastanja rana i remodelacijama tkiva (Presland i Dale, 2000). Lamina propria takođe sadrži i makrofage, histiocite, masne ćelije, polimorfonukleare, leukocite, limfocite, plazma ćelije i endotelne ćelije, koje su zajedno odgovorne za mnoge fundamentalne procese u okviru funkcionisanja imunološkog sistema i zapaljenskim reakcijama (Cate i Nanci, 2008).

2.3.2.3. Oralni epitel

Oralni epitel predstavlja primarnu barijeru između spoljašnje sredine i histološki dublje pozicioniranih tkiva. Histološki gledano, to je pločasto slojeviti epitel. Njegov strukturalni integritet se održava zahvaljujući kontinuiranom procesu obnavljanja skvamoznih ćelija, a zahvaljujući mitotičkim deobama ćelija u najdubljim slojevima oralnog epitela. Sve ćelije pločasto slojevitog epitela se stoga dele u dve velike ćelijske populacije: progenitorne i zrele epitelne ćelije (Cate i Nanci, 2008).

2.3.2.3.1. Proliferacija epitela

Progenitorne ćelije su locirane u dva ili tri parabazalna sloja. Neke od njih su matične stem ćelije, koje se multipliciraju u cilju stvaranja novih progenitornih ćelija, te na taj način održavaju proliferativni potencijal tkiva. Ostale ćelije su suštinski gledano amplifikatori celularnih aktivnosti i obezbeđuju rezervoare ćelija za površnije slojeve oralnog epitela. Promet ćelija kroz slojeve oralnog epitela, koji podrazumeva prolazak ćelije kroz sve postojeće slojeve epitela traje od 41 do 57 dana, kada je u pitanju gingiva i 25 dana, kada je u pitanju epitel sluzokože obraza, dok kod kože taj proces traje od 52 do 75 dana, a u crevima od 4 do 14. Kod keratinizovanog epitela ovaj ćelijski tranzit je značajno sporiji nego kod nekeratinizovanog (Squier i Brogden, 2011).

Proliferacija i diferencijacija je uslovljena različitim faktorima. Ti faktori mogu biti lekovi, doba dana, stres i zapaljenske reakcije. Različiti citokini, kao epidermalni faktor rasta, interleukin-1, i transformišući faktor rasta 1 i 2, takođe mogu uticati na proliferativnu stopu (Presland i Dale, 2000).

2.3.2.3.2. Maturacija epitela

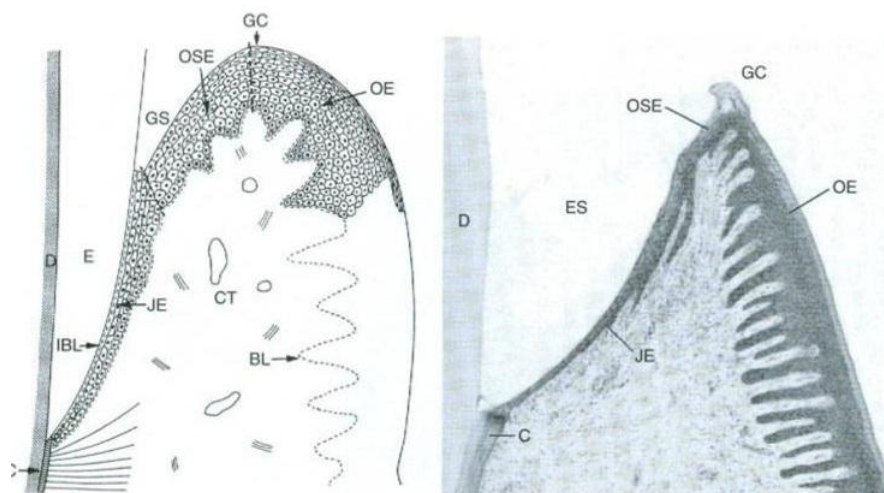
Mitotičkom aktivnošću ćelija u parabazalnim slojevima oralnog epitela, nastaje populacija progenitornih ćelija, koja može ostati na tom nivou ili podleći procesima maturacije u toku migriranja kroz slojeve epitela prema njegovoj površini. Postoje dva osnovna načina maturacije: keratinizacija i maturacija bez keratinizacije (Squier i Brogden, 2011). Neki delovi oralne mukoze, kao na primer sluzokoža tvrdog nepca i gingive su kruti, čvrsti, fizički otporni

i tesno pripojeni za laminu propriju. Ovi fizički fenomeni postoje zahvaljujući formiranju površnog sloja keratina u procesu poznatom kao keratinizacija epitela (Presland i Dale, 2000).

Keratini predstavljaju veliku familiju proteinskih molekula različitih molekulskih težina. U određenim područjima epitelne ćelije oralne mukoze ih proizvode. Ove ćelije su definisane kao keratinociti. Keratinski proteini učestvuju u obrazovanju unutar ćelijskih i međućelijskih struktura, kao što su: tonofibrili, dezmozomi i hemidezmozomi. Na ovaj način doprinose očuvanju ćelijskog oblika i koheziji epitela oralne mukoze (Cate i Nanci, 2008).

2.3.2.3.3. Anatomski odnos mekih tkiva i tvrde zubne supstance

Odnos mekih tkiva i tvrde zubne supstance je detaljno ispitivan u proteklih nekoliko decenija. U okviru ovog odnosa opisuju se dve histološke zone: epitelna zona i zona vezivnog tkiva. Epitelna zona se proteže od krestalne površine gingive, pa do najapikalnijeg dela vezivnog epitela, gde počinje zona vezivnog tkiva. Vezivno tkivo se prostire do vrha alveolarnog grebena, gde se nastavlja u periodontalni ligament. Epitelna komponenta ima debljinu između 0.5 i 3 mm. Dimenzije veće od ovih smatraju se patološkim (parodontalni džep). Epitelna zona se deli u dva odvojena histološka entiteta: oralni sulkusni epitel i vezivni epitel. Vezivni epitel ima direktan odnos sa tvrdom zubnom supstancom, tj. gled (slika 8) (Cate i Nanci, 2008).



Slika 8. Šematski prikaz dentogingivalne veze

Legenda: Oralni epitel (OE), oralni sulkusni epitel, vezivni epitel (OSE), gled (E), unutrašnja bazalna lamina (IBL), cement (C), bazalna lamina (BL), vezivno tkivo (CT), dentin (D), gingivalna kresta (GC), gingivalni sulkus (GS)

Veživno tkivo kao integralni činilac dento-gingivalne veze deli se u dva odvojena segmenta: veživno tkivo koje je lokalizovano ispod epitela i veživno tkivo koje je u direktnom kontaktu sa cementom korena zuba. Veživno tkivo koje je u direktnom kontaktu sa površinom korena zuba sadrži kolagena vlakna i fibroblaste, i bogato je krvnim sudovima i nervnim vlaknima. Neposredno iznad krestalne kosti alveolarnog grebena, kolagena vlakna su smeštena u lamini proprije gingive i učestvuju u obrazovanju gingivalnog ligamenta (Cate & Nanci, 2008). Ova vlakna su svrstana u različite grupe, u zavisnosti od njihovog porekla, terminacije i orijentacije.

Najbrojnija su dento-gingivalna vlakna, koja se pružaju od cementa korena zuba, pa do lamine proprije slobodne i pripojene gingive. Ova vlakna su orijentisana perpendikularno u odnosu na površinu korena zuba. Alveolo-gingivalna, cirkularna, dentoperiostalna i transeptalna vlakna formiraju ostale grupe vlakana (Cate & Nanci, 2008).

2.4. Periimplantna tkiva

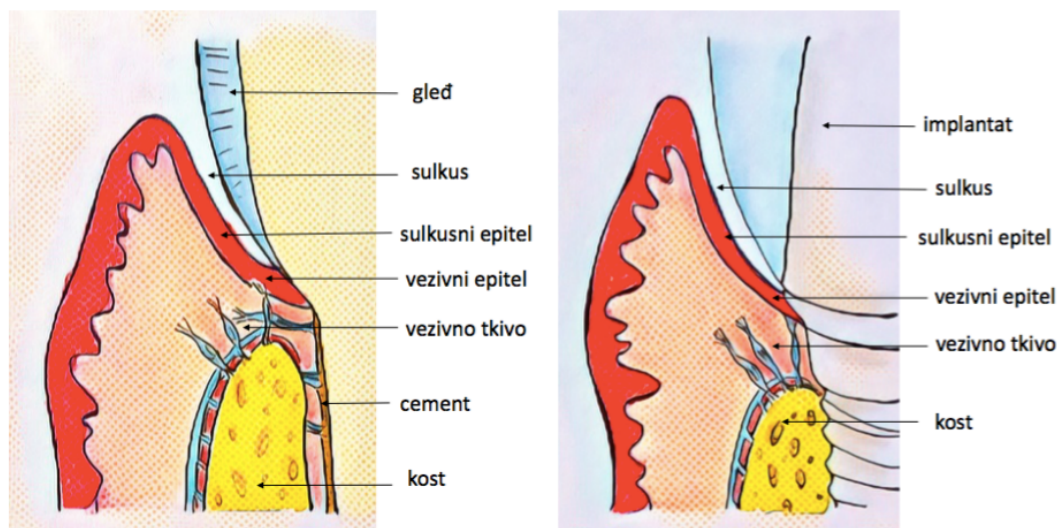
Osim na koštano tkivo, ugradnja endosealnih implantata utiče i na meka tkiva oko samih implantata. Periimplantatna tkiva su tkiva koja okružuju dentalne implantate ugrađene u alveolarni greben gornje i donje vilice. Osnovna uloga ovih tkiva je da obezbeđuju potporu ugrađenom implantatu. Iz toga proističe jasna važnost klinički zdravog periimplantatnog tkiva, kako bi se izbegle komplikacije koje se mogu javiti u ranoj fazi nakon ugradnje implantata i kasnije, kada je implantat u funkciji. Periimplantatna tkiva obuhvataju tvrda (rezidualni alveolarni koštani greben gornje i donje vilice) i meka tkiva (pokretna i nepokretna meka tkiva koja pokrivaju rezidualni alveolarni koštani greben donje i gornje vilice (Perović, 2004).

Danas je opšte prihvaćeno da odnos mekih tkiva sa površinom dentalnih implantata pokazuje mnoge sličnosti sa prirodnim zubom (Myshin & Wiens, 2005). Epitelno tkivo lokalizovano oko kompleksa dentalnog implantata i protetske nadogradnje je histološki slično epitelu koji prekriva mukogingivalni kompleks oko prirodnog zuba. *Schupbach* i *Glauser* su pokazali da strukturalne karakteristike veživnog epitela kod implantata odgovaraju karakteristikama veživnog epitela kod prirodnog zuba (Schupbach i Glauser, 2007).

Za opstanak dentalnog implantata, od velikog značaja je i stanje periimplantatnog mekog i koštanog tkiva. Funkcija koštanog tkiva je da prihvati, fiksira implantat, amortizuje i

raspoređuje sile koje se razvijaju tokom žvakanja. Meka tkiva oko implantata zatvaraju komunikaciju između usne duplje i periimplantnog koštanog tkiva, sprečavajući prodor pljuvačke i antigena iz usne duplje prema ležištu implantata u kosti. Oko vrata implantata formira se prsten mekog tkiva kao dobra barijera koja zavisi od stanja gingive. Morfološki i funkcionalno veza između mekog tkiva i implantata se razlikuje od tkiva oko prirodnog zuba.

Iako je vezivni epitel strukturalno sličan, mnogi autori sugerišu postojanje fundamentalne razlike između periimplantnog vezivnog tkiva i onog koje okružuje prirodan zub. Oko implantata čija površina nije prekrivena cementom, kao što je to slučaj sa krenom prirodnog zuba, kolagena vlakana se pružaju manje ili više paralelno u odnosu na površinu implantata, i nisu uopšte prisutna perpendikularno orijentisana vlakna (slika 9) (Berglundh i sar., 1991; Buser i sar., 1992; Rugeri, Franchi, Marini, Trisi & Piatelli, 1992).



Slika 9. Razlika u odnosu mukogingivalnog kompleksa prema implantatu i prirodnom zubu

Vezivno tkivo oko vrata implantata i protetske nadogradnje dugo je opisivano kao ožiljno tkivo, sa kvantitativnom predominantnošću kolagena, fibroblasta i vaskularnih struktura. Stoga je smatrano da se preobražaj periimplantne sluzokože dešava sporije nego što je to slučaj sa mukogingivalnim kompleksom oko prirodnog zuba, te stoga pokazuje slabiji regenerativni i reparatorni potencijal (Lindhe i Berglundh, 1998).

2.4.1. Periimplantni sulkus i tečnost

Meka tkiva oko implantata zatvaraju komunikaciju između usne duplje i periimplantnog koštanog tkiva, sprečavajući prodor pljuvačke i antigena iz usne duplje prema

ležištu implantata u kosti. Oko vrata implantata formira se prsten mekog tkiva bez urastanja, kao dobra barijera koja zavisi od stanja gingive. U inflamaciji prostor između epitelnih ćelija pripojnog epitela postaje širi i redukuju se zaštitni efekti bazalne lamine.

Sulkusni prostor je nastao adheriranjem epitela slobodne gingive uz površinu vrata implantata, stalno se spira periimplantatnom tečnošću. Periimplantatna tečnost (PICF) koja ispunjava periimplantatni sulkus je transudat vaskularne mreže mukoze kroz tanak sulkusni epitel. To je inflamatorni eksudat koji se nalazi i u fiziološkim i patološkim uslovima i predstavlja protok tečnosti kroz pripojni epitel u periimplantatni sulkus. Komponente ove tečnosti potiču iz seruma, epitela i vezivnog tkiva gingive, kao i iz inflamatornih ćelija i bakterija koje se nalaze u periimplantatnom sulkusu i okolnim tkivima. Važni sastojci su pokazatelji zapaljenja i uključuju enzime i citokine, kao i produkte razgradnje tkiva (Armitage, 2004).

2.4.2. Mikroorganizmi periimplantnih tkiva

Nakon ugradnje implantata, dešava se fenomen poznat kao „trka za površinu” između proteina, ćelija domaćina i bakterija (Gristina, 2004). Mikroorganizmi usne duplje, prvenstveno bakterije, se smatraju inicijatorom lokalnog upalnog procesa. Prilikom bakterijske infekcije, ako se dentalni plak akumulira na površini implantata, subepitelno vezivno tkivo postaje infiltrirano velikim brojem inflamatornih ćelija. Epitel je slabo pričvršćen, a može doći i do supuracija. Pojavljuju se klinički i radiografski znaci tkivne destrukcije. Odnos bakterija u dentalnom plaku određuje u kojem će se pravcu razvijati patološki mehanizam (Lindhe i sar., 2008). Ako se plak akumulira na implantatnoj površini, subepitelno vezivno tkivo postaje infiltrirano inflamatornim ćelijama.

Sastav biofilma u zdravim tkivima oko implantata (preovladavaju gram pozitivni bacili i koke) se razlikuje u odnosu na periimplantatne lezije. Dominantni mikroorganizmi izolovani iz subgingivalnog plaka u slučaju periimplantitisa su gram-negativni bacili i spirohete. Broj spiroheta je u pozitivnoj korelaciji sa količinom plaka, dubinom džepa oko implantata i resorpcijom kosti. Mikroflora periimplantatnih lezija uključuje i vrlo agresivne patogene kao što su: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* i dr. (Van Winkelhoff i sar., 2007; Renvert i sar., 2007; Shibli i sar., 2008).

Prve podatke vezane za mikrobiološku floru i neuspeh implantata prezentovali su *Mombeli i Lang*. Mikrobiološki uzorci sa implantata koji su smatrani uspešno prihvaćenim od strane tkiva, dominantno su sadržavali mikroorganizme oblika koka, dok je kod neuspehlikih implantata zabeležen značajan porast broja spiroheta. Periimplantitis se ne razvija uvek u svim periimplantatnim prostorima posle perimukozitisa, kao što se parodontopatija ne razvija kod svih gingivitisa. Detektovana je i razlika između bakterijskih morfotipova kod totalno bezubih i parcijalno bezubih vilica (*Mombeli i Lang 1994*).

Mikrobiološka istraživanja su pokazala da je subgingivalna bakterijska flora, koja je izolovana kod periimplantitisa, potpuno različita od mikrobiološkog nalaza oko implantata gde nema znakova zapaljenja. Uočena je velika sličnost između mikrobiološke flore oko prirodnih zuba u slučaju parodontopatije kao i kod implantata u slučaju periimplantitisa, kao i isti mehanizmi delovanja kod ispitanika sa inflamacijom.

Patogenost mikroorganizma zavisi od:

- interakcije sa drugim mikroorganizmima;
- sposobnosti da reaguju sa provociranim odgovorom domaćina;
- oslobađanja lipopolisaharida (LPS) i drugih bakterijskih modulatora;
- sinteze enzima koji uništavaju tkiva domaćina.

Da bi patogen uzrokovao periimplantitis važno je da može:

- kolonizovati subgingivalni prostor;
- stvarati agense koji ili direktno oštećuju tkiva domaćina ili dovode do autodestrukcije tkiva domaćina.

Bakterijska vrsta mora biti sposobna da:

- adherira na neku od ponuđenih površina;
- da se množi;
- da se uspešno nadmeće protiv drugih bakterijskih vrsta na području;
- da se brani od mehanizama odbrane domaćina.

Stvaranje biofilma na implantatu rezultira upalnim reakcijama, koje se zbivaju u mekim tkivima, ali mogu napredovati i dovesti do gubitka potporne kosti. Destrukcija tkiva započinje u području vrata implantata. Razvija se defekt oblika kratera koji se može videti na rtg snimku. Veliki broj neutrofila u lezijama periimplantitisa i odsutnost epitelnog sloja između lezije i

biofilma upućuje na to da lezije periimplantitisa imaju sliku koja je različita od one u lezijama kod parodontopatije. Lezije periimplantitisa su loše kapsulirane, protežu se u marginalnu kost i mogu, ako napreduju, da dovedu do gubitka implantata. Simptomi periimplantitisa se odnose na infekcijsku, tj. upalnu prirodu lezije. Stoga postoji radiološki dokaz o gubitku kosti i taj gubitak se stalno širi u obliku kratera. Prisutni su oticanje i crvenilo sluzokože, kao i krvarenje pri laganom sondiranju i gnojenje. Implantat i u toj fazi može dugo ostati stabilan. Patogeneza koštane i tkivne destrukcije podrazumeva aktivaciju različitih komponenata odgovora domaćina i inflamatornog odgovora sa ciljem prve odbrane u zaštiti tkiva kod bakterijske agresije, reflektujući protektivnu ulogu odgovora.

U periimplantitisu, mikroorganizami mogu da uzrokuju tkivnu destrukciju na dva načina:

- Direktno, kroz invaziju tkiva i produkciju korisnih supstanci koje indukuju ćelijsku smrt i nekrozu tkiva;
- Indirektno, kroz aktivaciju inflamatornih ćelija koje mogu da produkuju i oslobađaju medijatore koji deluju kao efektori sa potentnom inflamatornom i kataboličkom aktivnošću. Ovo dejstvo ima ključnu ulogu u destrukciji parodontalnog tkiva, dok neke bakterije takođe interferiraju sa mehanizmima normalne odbrane domaćina deaktiviranjem specifičnih antitela ili inhibicijom dejstva fagocitnih ćelija (Birkedal-Hansen i sar., 1993).

3. UTICAJ VRSTE MATERIJALA I NJEGOVE POVRŠINE NA PONAŠANJE MUKOGINGIVALNOG KOMPLEKSA

Svaki stomatološki materijal koji se primenjuje u usnoj duplji pripada grupi biomaterijala, i, kao takvi, predstavljaju predmet specifičnih zakonskih regulativa. Većina zemalja širom sveta dozvoljava upotrebu samo onih materijala koji su uspešno prošli posebne procese provere bezbednosti materijala odnosno, mogu se upotrebiti samo sertifikovani materijali (Schmalz i Arenholt-Bindslev, 2009; Balać i sar., 2010; Schmalz i sar., 2014). Svojstvo materijala da prilikom kontakta sa biološkim tkivima izaziva željeni odgovor naziva se biokompatibilnost materijala (Watacha, 2012; Marković i sar., 2012; Kocak i sar., 2014; Kostić i sar., 2010; Moharamzadeh, 2009). Adekvatan odgovor domaćina u većini slučajeva znači da je reakcija živog sistema na prisustvo biomaterijala podnošljiva ili da izostaje. Reakcija živog organizma na prisustvo stomatoloških materijala može biti i odsutna s obzirom na to da je osnovna aktivnost mnogih dentalnih materijala postignuta fizičkim ili mehaničkim delovanjem, a ne farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim (Kostić i sar., 2010; Moharamzadeh, 2009).

Stomatološki materijali, kao i implantati namenjeni za upotrebu u medicini i stomatologiji bi trebalo da budu biokompatibilni, netoksični, nealergeni, nekancerogeni - što sve podrazumeva hemijski i fizički stabilne materijale (Bhola i sar., 2010; Schmalz i Arenholt-Bindslev, 2009; Kocak i sar., 2014). Biokompatibilnost materijala koji se koriste za dentalne implantate je većinom određena njihovim hemijskim sastavom (otpuštanjem supstanci kroz rastvorljivost ili koroziju), kao i hrapavošću površine materijala koji je u kontaktu sa oralnim tkivima. Različiti materijali se mogu upotrebiti za izradu transmukoznih komponenti implantata. Takođe, mogući su različiti načini obrade površine transmukoznih komponenti.

Nažalost, zahtevi u pogledu materijala, kao i njihovih karakteristika kada je u pitanju postizanje sveukupnog uspeha implantološke terapije često su kontradiktorni. Modifikacije materijala i njihove površine primenjuju se u cilju povećanja broja ćelijskih adhezija, u slučaju kada su u pitanju epitelne ćelije i ćelije vezivnog tkiva. Međutim, kada su u pitanju bakterijske ćelije zahtevi su oprečni. Ćelijske adhezije koje se odnose na epitelne ćelije i ćelije vezivnog tkiva doprinose stabilnosti mukogingivalnog kompleksa oko vrata implantata i protetske

nadogradnje, te na taj način doprinose uspešnosti implantološke terapije (Sitbon, 2009). Čvrst i stabilan mukogingivalni kompleks oko vrata implantata predstavlja protetktivnu barijeru i sprečava prodor mikroorganizama u periimplantna tkiva. Favorizovana adherencija bakterijskih ćelija na površinu transmukozne komponente otvara karakterističan kompeticijski odnos sa epitelnim ćelijama i fibroblastima. U zavisnosti od ishoda ovakve kompeticije zavisice i rezultat primenjene implantološke terapije. Imajući u vidu ove činjenice nameće se zaključak, da materijal i njegova površina treba da promovišu adheziju epitelnih ćelija i fibroblasta, a da spreče kolonizaciju mikroorganizama (Welander i sar., 2008).

U materijal-tkivo međuspoju ipak može doći do hemijskih interakcija ili delovanja tkivnih enzima, što može dovesti do oslobađanja pojedinih supstanci i aditiva iz materijala u tkivo (Bhola i sar., 2010; Schmalz i Arenholt-Bindslev, 2009). Hemijske supstance mogu oštetiti ćelije, ili stimulacijom određenih proteina izazvati zapaljenske reakcije. Površinska adhezija i akumulacija proteina ili interakcija materijala sa ekstracelularnim matriksom, sa druge strane, važna je za biološko ponašanje materijala, a pod uticajem je i hemijskih i fizičkih karakteristika materijala (Marković i sar., 2010).

Faktori koji mogu doprineti unapređenju veze mukogingivalnog kompleksa sa površinom transmukozne komponente su: vrsta materijala i njegova priroda, kao i topografija površine materijala, a na koju se utiče različitim načinima obrade.

3.1. Materijal-tkivo interakcija

Materijal u kontaktu sa tkivom izaziva reakciju domaćina, ali isto tako i tkivo uzrokuje promene u materijalu, pa se iz tog razloga materijal-tkivo međuspoj smatra jednim dinamičnim spojem (Watacha, 2012). Kakav međuspoj će biti kreiran, zavisi prvenstveno od tkiva sa kojim materijal dolazi u kontakt. Na primer, međuspoj materijal-dentin biće različit u odnosu na onaj kreiran u kosti ili mekom tkivu. Efekat tkiva na materijal i obrnuto će biti bitno različit u svakom okruženju. Zbog toga, materijal koji je biokompatibilan u kontaktu sa jednom vrstom tkiva, ne znači da će biti biokompatibilan i na nekom drugom mestu u telu (Watacha, 2012).

Biomaterijali su strana tela, pa su i biološki odgovori na ove materijale okarakterisani kao odgovori na strana tela (Watacha, 2012). Reakcija tipa oko stranog tela započinje neposredno nakon implantacije materijala u tkivo (Schmalz i sar., 2014). Većina teorija govori u prilog tome da materijali promovišu nespecifičnu adsorpciju proteina po svojoj površini, koja

zatim stimuliše formiranje džinovskih ćelija tipa oko stranog tela od monocita i makrofaga, a koje dalje utiču na stvaranje kolageno fibrozne avaskularne barijere između materijala i tkiva (Schmalz i sar., 2014; Watacha, 2012). Površinska adsorpcija ili akumulacija proteina, kao i interakcija materijala sa ekstracelularnim matriksom važna je za biološko ponašanje materijala. Adhezija proteina je pod uticajem kako hemijskih, tako i fizičkih osobina materijala (Schmalz & Arenholt-Bindslev, 2012; Schmalz i sar., 2014). I oslobađanje supstanci iz materijala kroz rastvorljivost ili koroziju određuje biokompatibilnost. Ove supstance mogu oštetiti ćelije, ili stimulisanjem ćelijske sinteze ili izvesnih proteina (proinflamatornih medijatora, interleukina 1 i interleukina 6) indukovati zapaljenje (Schmalz & Arenholt-Bindslev, 2012). Promene u materijalu, koji je uveden u biološku sredinu, mogu nastati bilo zbog korozije, hemijske modifikacije, depozicije supstance, degradacije ili nekog drugog mehanizma (Schmalz & Arenholt-Bindslev, 2012).

Biomaterijali se smatraju zapravo bioaktivnim materijalima usled stvaranja aktivnog odnosa materijal-tkivo (Schmalz & Arenholt-Bindslev, 2012; Watacha, 2012).

3.1.1. Tkivni odgovor na materijale

Odgovor domaćina na strano telo nastupa neposredno nakon kontakta tkiva i materijala. Materijal u kontaktu sa tkivom domaćina može izazvati lokalne i sistemske reakcije. Reakcije tkiva mogu biti:

- inflamacija;
- alergijske reakcije;
- lokalne reakcije;
- sistemska toksičnost;
- kancerogena, mutagena i teratogena dejstva (Schmalz i Arenholt-Bindslev, 2012).

Po novijoj klasifikaciji, interakcije tkiva i materijala mogu biti:

- lokalne interakcije;
- sistemske interakcije i
- pridružene komplikacije (Schmalz i sar., 2014).

Lokalno delovanje materijala na tkivo domaćina mogu biti: krv-materijal interakcije, zapaljenje i/ili infekcije, toksičnost materijala, promene u zarastanju rane, karcinogeneza (Schmalz i sar., 2014).

Efekti tkiva na materijale su adsorpcija proteina na implantat, enzimsko delovanje, degradacija materijala kao i fizičko-mehanički efekti habanje, korozija, lomljenje. U stomatologiji, lokalne reakcije se primarno dešavaju na pulpi, periapikalnom periodoncijumu, na gingivi, odnosno oralnoj mukozi (Schmalz i Arenholt-Bindslev, 2012). Međutim, hemijske supstance oslobođene iz materijala mogu proći epitelnu barijeru i krvnim ili limfnim sudovima dospeti do udaljenih tkiva i organa. Sistemski efekti prisustva biomaterijala, iako retki nakon primene stomatoloških materijala, podrazumevaju opšte reakcije organizma na prisustvo stranog tela, a uključuju sistemsku toksičnost, tromboebolijske i alergijske reakcije (Schmalz i sar., 2014).

3.1.2. Mehanizam uspostavljanja kontakta na ćelijskom nivou

3.1.2.1. Ćelijski citoskelet

Uzimajući u obzir prirodu eksperimenata izvedenih u sklopu ove doktorske disertacije, nameće se neophodnost razmatranja veoma složenih korelacijskih odnosa između biologije ćelije i njenog citoskeleta. Kratki, ali sadržajni opis citoskeleta omogućava nam bolje razumevanje složenih procesa ćelijskih adhezija, koje su fundamentalna komponenta laboratorijskih eksperimenata koji će u daljem tekstu biti opisani (Pollard & Earnshaw, 2008).

Ćelijski citoskelet predstavlja svojevrsnu armaturu sadržanu u citoplazmi svake eukariotske ćelije. Ova dinamična struktura učestvuje u raznim ćelijskim funkcijama, kao što su zaštita ćelije, pokreti ćelije, održavanje oblika, intraćelijski transport i deobe. Tri tipa ćelijskih filamenata, kategorisanih prema svojoj veličini, grade citoskelet. Kategorije filamenata su: mikrofilamenti, intermedijarni filament i mikrotubuli (Cate i Nanci, 2008).

Mikrofilamente grade aktinski monomeri, grupisani u polimere, kao glavni konstituent ovih filamenata. Monomeri su globularni aktin, poznatiji kao G-aktin. Ovi monomeri organizovani su u linearne polimere, poznatiji kao F-aktin, koji su opet organizovani u parove, formirajući dupli heliks i obrazujući mikrofilament 7 nm širine, a sa krivinom heliksa koja se ponavlja na svakih 37 nm. Aktin igra važnu ulogu u mišićnim kontrakcijama kao i u intracelularnom transportu materija, ali te funkcije nisu od značaja za prirodu eksperimenata sadržanog u doktorskoj disertaciji. Aktinski mikrofilamenti su organizovani neposredno ispod

ćelijske membrane i predstavljaju najdinamičniju kategoriju ćelijskih filamenata (Niessen i sar., 2008).

Filamenti aktivno učestvuju u ćelijskom motilitetu i mehaničkoj potpori ćelije. Takođe, signifikantna je i njihova uloga u formiranju specifičnih veza kako između ćelija, tako i između ćelija i ekstracelularnog matriksa. Pored svih navedenih, ne može se izbeći i njihova uloga u transdukciji ćelijskih signala (Cate i Nanci, 2008).

3.1.2.2. Ćelijske veze

U poslednjih nekoliko godina, veštačkim materijalima se pridaje sve veći značaj u medicini i biologiji. Moderna naučna interdisciplinarna oblast, poznata kao tkivni inženjering, razvijena je kako bi se dizajnirali biokompatibilni veštački materijali koji bi trebalo da zamene oštećena tkiva i organe. Pored toga, biomaterijali mogu poslužiti kao dobar model za ispitivanje kontrole adhezije ćelijskih linija, njihovog rasta, širenja, diferencijacije, održivosti i degradacije ekstracelularnog matriksa (Park i sar., 1998; Banerjee i sar., 2000; Irvine i sar., 2001).

Specijalizovane strukture omogućavaju ostvarivanje međućelijskih veza, kao i veza između ćelija i ekstracelularnog matriksa. Postoje tri tipa ćelijskih veza: okluzijske, adhezivne i komunikacijske veze (Pollard & Earnshaw, 2008).

S aspekta prirode eksperimenta i tematike doktorske disertacije, treba se fokusirati isključivo na adhezivnom tipu veze. Osnovna distinkcija se bazira na mogućnosti povezivanja ćelije sa drugom ćelijom, ili ćelije sa ekstracelularnim matriksom. Veza između dve ćelije se sastoji iz zonule adherens i makule adherens, takođe poznate kao dezmozomi (Thomason i sar., 2010). Osnovna razlika između ovih veza je u njihovoj ekstendiranosti, tj. zonula uokviruje gotovo čitavu ćeliju, dok je makula više ograničena. Veza između ćelija i ekstracelularnog matriksa ostvaruje se preko fokalnih adhezija i hemidezmozoma. Adhezivni tip veze drži ćelije na okupu i omogućava svojevrsno sidrenje ćelija u ekstracelularnom matriksu (Cate i Nanci, 2008).

Posmatrano na molekularnom nivou tri komponente su uključene u ovaj složeni histološki fenomen: transmembranski proteini, citoplazmatski adapter i citoskeletni filamenti, koji se razlikuju u odnosu na tip uspostavljene veze. Kod međućelijskih veza, transmembranski proteini su kaderini, koji su po svojoj hemijskoj prirodi kalcijum zavisni i interaguju sa svojim analogima u ćeliji sa kojom se povezivanje vrši. Citoplazmatski adapter je katenin, koji stupa u interakciju sa citoplazmatskim delom transmembranskog kadherina. Katenini i aktinski

filamenti su skoncentrisani na citoplazmatskoj strani ćelijske membrane i formiraju strukturu mreže. Za dezmozome, transmembranski proteini su dezoglein i dezokolin, katenini su dezoplakin i plakoglobin, a citoskeltni elementi su intermedijarni filamenti. Dezoplakin i plakoglobin formiraju gustu kolekciju unutar ćelijske citoplazme, omogućavajući intermedijarnim filamentima ostvarenje veze (Cate i Nanci, 2008; Thomason i sar., 2010).

Veza između ćelije i ekstracelularnog matriksa ima sličnu strukturu, ali je predstavljen drugim proteinskim molekulima. U fokalnim adhezijama transmembranski protein je integrin. Integrini su heterodimeri sastavljeni iz dve subjedinice, alfa i beta, sa afinitetom povezivanja koji zavisi od prirode ekstracelularnog matriksa. Postoji više od 20 kombinacija različitih alfa i beta podjedinica (Thomason i sar., 2010).

Citoplazmatski adapteri su aktinini, vinkulini i talin, a koji povezuju integrine sa aktinskim filamentima. Povezivanje integrina sa ekstracelularnim proteinima, omogućava povezivanje ćelije, i takođe dva načina stvaranja intracelularnih signala (Cate i Nanci, 2008). U hemidezmozomima transmembranski protein je alfa-6-beta-4 integrin, koji se specifično vezuje za laminin i kolagen XVII. Kompleks alfa-6-beta-4 integrina i laminin-5 smatra se da predstavlja glavni pokretač stvaranja ćelijskih signala uz hemidezmozome kao medijatore (Jones i sar., 1998). Citoplazmatski adapteri su BP230 i plektin, koji formiraju gustu ploču ili kolekciju u citoplazmi ćelije, a za koju se sidre intermedijarni filamenti. Veza ćelije i opisanih hemidezmozoma može biti na nivou bazalne lamine ili sa molekulima ekstracelularnog matriksa preko drugih proteina (Cate i Nanci, 2008).

Ispoljavanje i organizacija fokalnih kontakata može biti indikator efikasnosti ćelijskih adhezija (Lodish i sar., 2000). U kulturi, većina ćelija se vezuje za postavljeni supstrat preko fokalnih adhezijskih kontakata. Fokalni kontakti su zapravo mesta mehaničke veze sa ekstracelularnim matriksom. To su tačke na kojima se vrši generacija transdukcije signala odgovornih za adheziju (Burrige i sar., 1988; Burrige i Fath, 1989). Dokazano je da broj fokalnih adhezija u okviru veza između ćelija i površine supstrata zavisi upravo od topografije samog substrata.

Prilikom dizajniranja biokompatibilnih dentalnih implantata i njihovih elemenata postoje dve osnovne strategije za moduliranje materijal-ćelija interakcije. Jedan je da se stvori inertna površina, ne dozvoljavajući adsorpcije proteina i adhezije ćelija i na taj način sprečava aktivaciju imunog sistema, koagulaciju krvi, trombozu, depoziciju ekstracelularnog matriksa i drugih interakcija materijala i okolnog tkiva. Ova vrsta biomaterijala se koristi za izradu elemenata zglobova (Cook i sar. 1997), intraokularnih sočiva (Smetana i Vacík 1997; Han i sar.

2003) ili implantata koji su u kontaktu sa elementima krvi kao što su srčani zalisci, vaskularne proteze, kateteri za hemodijalizu i sl. (Bačakova i sar., 2004). Druga, više generalna i napredna strategija ima za cilj stvaranje materijala koji potenciraju spajanje, migraciju, proliferaciju, diferencijaciju, dugotrajno preživljavanje i ćelijske funkcije (kakve su kontrakcija ili sekrecija ekstracelularnog matriksa) na kontrolisan način, ukoliko je moguće. Ovi materijali mogu biti konstruisani "dvodimenzionalno", odnosno kao površine kolonizovane ćelijama, kakve su srčane valvule ili vaskularne proteze obložene zrelim, prirodno rezistentnim endotelnim slojem, koji je tromboresistentan, polupropustljiv i nije imunogen (Bordenave i sar. 1999; Kim i sar. 1999; Bačakova i sar. 2000b; Heitz i sar. 2003), ili koštani implantati koji indukuju formiranje mineralizovanog koštanog tkiva samo na površini prirodnog tkiva i veštačkog materijala (Bačaková i sar. 2001b, c; 2003b), ili kožni analozi koji sadrže polimerne površine sa perotankim slojem fibroblasta prekrivenih keratinocitima (Dvořánková i sar. 2003). Međutim, najnapredniji novi trend u tkivnom inženjeringu ima za cilj stvaranje takozvanih "hibridnih bioarteficijalnih organa". Ova strategija se koristi za proizvodnju veštačkih krvnih sudova, kostiju, hrstavnice i parenhimatoznih organa kao što su pankreas i jetra. Veštačka komponenta ovih materijala je dizajnirana kao trodimenzionalni skelet, odnosno osnova, koji obezbeđuje kontrolisan rast i sazrevanje ćelija. Može se "naseliti" u in vitro uslovima sopstvenim ćelijama pacijenta, dobijenih biopsijom pre planirane operacije ili se mogu koristiti matične ćelije. U idealnim uslovima, ovaj skelet bi posle nekog vremena trebalo da se resorbuje i da kompletno bude zamenjen novim diferenciranim ćelijama i ekstracelularnim matriksom, odnosno potpuno funkcionalnim tkivom u organu (Cook i sar. 1997; Park i sar. 2003; Kim i sar. 1999; Banerjee i sar. 2000; Irvine i sar. 2001; Tassiopoulos i Greisler 2000; Liu i sar. 2002; Mann i West 2002; Noth i sar. 2002; Wang i sar. 2002; Lutolf i sar. 2003; VandeVondele i sar. 2003).

Sa ove tačke gledišta, bioarteficijalni organe se ne može smatrati trajnom zamenom oštećenog ili nedostajućeg organa već kao privremena struktura koja podstiče njihovu regeneraciju.

3.1.2.2.1. Molekularni mehanizmi ćelijske adhezije na veštački materijal

Direktna adhezija ćelija za materijal bez posredstva receptora

Ovaj mehanizam predstavlja nespecifičnu ćelija-materijal interakciju pomoću takozvanih slabih hemijskih veza kao što su vodonične veze, elektrostatičke veze, polarne ili

jonske interakcije između različitih molekula na ćelijskoj membrani i funkcionalne hemijske grupe na polimeru, ili u odsustvu proteina ekstracelularnog matriksa ili funkcionalnih delova. Kod ovog tipa interakcije, ne može se osigurati prenos odgovarajućih signala iz ekstracelularne sredine u ćeliju. Ako ćelije nisu u mogućnosti da sintetišu i deponuju molekule ekstracelularnog matriksa (ECM) u relativno kratkom vremenu (obično 24 do 48 h od zasejavanja) biće podložne apoptozi (Huang i sar. 1998; Garcia i sar. 1999; Groth i sar. 1999; Moiseeva 2001).

Adhezija ćelija za materijal posredstvom receptora preko ECM molekula ili njegovih delova

Funkcionalna adhezija ćelija za biomaterijale posredstvom receptora je posredovana molekulima ECM, kao što su fibronektin, vitronektin, kolagen ili laminin (Tang i sar. 1998; Garcia et al. 1999, Groth et al. 1999, Moiseeva 2001). Ovi molekuli mogu biti adsorbovani na površini materijala iz okruženja, tj. medijuma za kultivisanje ćelija u in vitro uslovima ili telesnih tečnosti u in vivo uslovima.

3.1.2.2.1.1. Stvaranje bioinertnih, neadhezivnih površina za ćelije

Površine koje sprečavaju adheziju ćelija su stvorene korišćenjem raznih prirodnih i veštačkih molekula, kao što je npr. antiadhezivni protein albumin (Wang i sar. 2002), hidrogelovi na bazi hijaluronske kiseline (Park i sar. 2003) ili poli hidrosil etil metakrilat (Smetana i Vacík 1997; Han i sar. 2003), polivinil alcohol, poliakril amid, dekstran (VandeVondele i sar. 2003) i naročito polietilen glikol (Banerjee et al. 2000) ili polietilen oksid (Irvine i sar. 2000; Kim i Kim 2002; Wang i sar. 2002). Zbog svojih slabih mehaničkih osobina, poslednje dve komponente često se aplikuju u formi visećih bočnih lanaca prikačenih na osnovu, kakvi su na primer lateksi (Banerjee i sar. 2000), poli metil metakrilat (Irvine i sar. 2000), poliuretan (Wang i sar. 2002), poli L-lizin (VandeVondele i sar. 2003) i posebno polilaktidi (Kubies i sar. 2000; Proks et al. 2003). Viseći bočni lanci opiru se adsorpciji proteina i ćelijskoj adheziji posredovanoj receptorom svojom izrazitom hidrofilnošću, tj. velikom mobilnošću molekula u vodi (Wang i sar. 2002; Kim i Kim 2002). Sa druge strane, izrazito hidrofobne površine takođe poseduju antiadhezivne osobine. Iako ove površine omogućavaju adsorpciju proteina posrednika ćelijske adhezije, čak i u relativno velikim količinama, ovi protein ostaju veoma rigidni i rezistentni na reorganizaciju, tako da njihove specifične aminokiselinske sekvence ostaju nedostupne za receptore integrina na ćelijama (Garcia i sar. 1999; Groth i sar. 1999).

3.1.2.2.1.2. Stvaranje ćelija-interaktivne površine

Adsorpcija celih molekula ekstracelularnog matriksa

Adsorpcija molekula ECM u odgovarajućoj količini, spektrumu, konformaciji, fleksibilnosti i prijemčivosti za integrinske receptore veoma je zavisna od fizičkih i hemijskih karakteristika površinskog sloja materijala. U najvažnije karakteristike površinskog sloja materijala spadaju: mogućnost vlaženja, električni naboj, hrapavost i topografija površine, mehaničke osobine (rigiditet ili fleksibilnost), kristalna faza, poroznost, rastvorljivost, pH ili prisustvo određenih atoma ili hemijskih funkcionalnih grupa, npr. karbonske, amino ili oksidne grupe (Cook i sar. 1997; Smetana i Vacík 1997; Garcia i sar. 1999; Walachova i sar. 2002; Heitz i sar. 2003). Optimalna adsorpcija proteina i ćelijska adhezija obično se mogu očekivati u rasponu srednjih vrednosti kvašenja površine. Ipak, neki materijali korišćeni u tkivnom inženjeringu, prevashodno sintetski polimeri, kao što su polietilen, poliuretan, poliprolilen ili polistiren, previše su hidrofobni u svojoj nemodifikovanoj formi. Relativno sigurne, efikasne i jeftine metode prilagođavanja kvašenja mogu se naći u okviru fizičkih metoda, kao što su bombardovanje jonima, iradijacija sa UV svetlošću ili izlaganje pražnjenju plazme. Ove procedure dovode do cepanja hemijskih veza između atoma ugljenika i ostalih atoma. Nezasićene veze između ugljenikovih atoma i radikali na krajevima ugljenikovih lanaca reaguju sa kiseonikom, i novoformirane grupe, koje sadrže kiseonik (npr. karbonil, karboksi, ester, hidroksi) povećavaju hidrofilitnost površine polimera. Dodatno, modifikacija zrakom polimernih lanaca proizvodi konjugovane dvostruke veze koje omogućavaju veću električnu provodljivost površine polimera. Materijal je relativno obogaćen ugljenikom, koji je poznat po pozitivnom uticaju na ćelijsku adheziju (Bačákova i sar. 2000a, b; Švorčik i sar. 2001, 2002, 2004; Walachova i sar. 2002, Heitz i sar. 2003).

Veoma glatke površine ne mogu obezbediti čvrstu adheziju ćelija, formaciju dovoljnog broja kontakata između implanta i kosti i fiksaciju implanta u kost. Sve u svemu, slično polaritetu površine i vlaženju, parametri hrapavosti površine imaju optimalni raspon vrednosti, s tim da oni mogu varirati u zavisnosti od tipa materijala (npr. karbonski kompoziti, metali, keramika, sintetski polimeri itd.), kao i za svaku vrstu ćelija. Dodatno, nisu važni samo visina i dubina površinskih nepravilnosti i udaljenost između njih, nego i njihov oblik, posebno njihova oštrina, koja može mehanički oštetiti ćelije (Wang i sar. 2001).

Ćelije su u stanju da veoma precizno detektuju mehaničke osobine adhezionog supstrata i regulišu integrinsko vezivanje, grupiranje fokalnih adhezionih plaka, kao i citoskelet (Ingber i sar. 1995; Huang i sar. 1998; Wang i sar. 2001). Ukoliko je supstrat za adheziju veoma čvrst, rigidan i nedeformabilan, na primer ECM molekuli adsorbirani na veoma hidrofobnu površinu, ćelije nisu u mogućnosti da reorganizuju ove molekule u cilju pristupa ligandima za integrinske receptore i regrutuju ove receptore u fokalne adhezione plake, što je uslov za dostavljanje signala koji obezbeđuju vijabilnost ćelija zavisnih od prijanjanja. S druge strane, ukoliko je materijal previše elastičan, fleksibilan ili ireverzibilno deformabilan, on ne dozvoljava prijanjanje ćelija, čak iako su ligandi za integrinske receptore prisutni u dovoljnoj količini i dostupnosti, i oni su vezani ovim receptorima. Ovakav tip supstrata ne može se odupreti silama vuče, nastalim spajanjem citoskeleta. Kada je kolagen adsorbiran ili kovalentno vezan na staklo ili tvrdi poliakrilamidni gel (PAG), vaskularne glatke mišićne ćelije normalno se distribuiraju sa multiplim prugastim mestima fokalne adhezije i bogate su citoskeletom, te su bile viabilne. Ipak, ukoliko je korišćen meki PAG ili kolagen, ćelije ostaju okrugle (bez znakova širenja i sastavljanja adhezionog aparata), i potom podležu apoptozi (Engler i sar. 2004). Kako je već napomenuto, slično ponašanje ćelija primećeno je na ekstremno hidrofilnim, tj. veoma slabim, površinama koje liče na vodu, npr. hidrogelovima, PEG ili PEO (Banerjee i sar. 2000; Irvine i sar. 2001; Liu i sar. 2002; Kim i Kim 2002; Wang i sar. 2002; Park i sar. 2003; VandeVondele *et al.* 2003).

Inkorporacija specifičnih bioaktivnih molekula

Kako je već napomenuto, kod naprednijih biomaterijala, relativno jednostavni, hemijski dobro definisani ligandi za integrinske ili receptore bazirane na proteoglikanskim receptorima i njihove sekvence mogu se vezati nasuprot neadhezivnoj pozadini ćelije u definisanim količinama i distribucijama u cilju postizanja specifičnog ćelijskog odgovora na kontrolisan način. Ove konstrukcije, često nazvane bioaktivnim, biospecifičnim ili biomimetskim površinama ili veštačkim šablonima ECM, omogućavaju sledeće prednosti: 1) celi molekuli proteina, često adsorbirani u manje definisanom spektrumu, količini i konformaciji, i podstaknuti inflamatorni odgovori, tromboza ili infekcije zavisne od uređaja mogu da budu izbegnuti (Tang i sar. 1998; VandeVondele i sar. 2003), 2) određeni tip ćelija može preferencijalno biti zasejan na određenu regiju biomaterijala (Mann i West 2002; Suh i sar. 2002; Heilshorn i sar. 2003), 3) dalje ponašanje ćelija, kakvo je migracija, proliferacija,

diferencijacija, adekvatno funkcionisanje ili dugotrajna vijabilnost, mogu da budu regulisane obimom inicijalne ćelijske adhezije.

Dobro je poznato, da su veličina i oblik površine, na koju se ćelije šire, kao i broj, veličina, oblik i distribucija fokalnih adhezionih plaka presudni za dalje migracijsko, proliferacijsko i diferencijacijsko ponašanje ćelija zavisnih od prijanjanja. Ukoliko je ovaj obim veoma mali (tj. pripoj oblikih ćelija bez formiranja fokalnih kontakata i širenja), ćelije uglavnom ne prežive. Na srednjem nivou jačine adhezije, ćelije su najaktivnije u migraciji i proliferaciji, i ukoliko je kontakt ćelija – materijal veoma velik sa višestrukim dobro razvijenim mestima fokalne adhezije u kombinaciji sa dobrim citoskeletom, ćelije imaju tendenciju da preskoče fazu proliferacije i pre uđu u program diferencijacije. Stvaranje takozvanih površina sa obrascem sa adhezivnim mikrodomenima definisane veličine i oblika kao i grupiranje liganada za integrinske receptore u strukture koje liče mestima fokalne adhezije na ćelijama mogu omogućiti izvanrednu fiziološku alatku za smanjenje ekcesivne proliferacije vaskularnih glatkih mišića na veštačkim vaskularnim protezama, često vodeći ponovnoj stenozu ili čak potpunoj obliteraciji ovih naprava (Filova i sar. 2003).

Još jedna mogućnost kontrole proliferacije i drugih ćelijskih karakteristika na naprednim biospecifičnim materijalima je inkorporirano i kontrolisano oslobađanje funkcionalnih delova prirodnih faktora rasta, hormona, enzima ili sintetskih regulatora ćelijskog ciklusa (Vella i sar. 1999, Lutolf i sar. 2003). Poslednji su reprezentovani, na primer, inhibitorima ciklin-zavisne kinaze (CDK), posebno sastojak CVT 313.

3.1.2.2.2. Uticaj fenomena međućelijskog povezivanja na biologiju ćelije

Kod implanto-protetskog kompleksa, ćelijska adhezija je fundamentalni fenomen od koga zavisi kako koštana, tako i mekotkivna integracija implantata. Nasuprot ovome drugi vid ćelijskih adhezija, kao što je npr. adhezija mikroorganizama za površine dentalnih implantata, mogu dovesti do kompromitacije uspešnosti implantološke terapije (Miyamoto i sar., 1995).

Funkcionalna aktivnost ćelija koje su u kontaktu sa površinom supstrata pretpostavlja se da je uslovljena upravo karakteristikama njegove površine (Balasubramanian i sar., 1998; Boyan i sar., 1996). Ćelijska adhezija, koja uslovljava eksterno-interne i interno-eksterne

signalne fenomene, neophodna je za generaciju mnogobrojnih ćelijskih aktivnosti, kao što su diferencijacija, proliferacija i ćelijska ekspresija (Jones i sar., 1998; Miyamoto i sar., 1995).

Ćelijske adhezije na površinu supstrata direktno mogu uticati na njihovu dalju sudbinu (Damsky i Ilic, 2002; Schaller, 2001). Upravo taj celularni kontakt može dovesti do promene oblika ćelije što za posledicu ima, uslovljenu regulaciju ćelijskog rasta, genske ekspresije, sekrecije proteinaza i metabolizam ekstracelularnog matriksa. U osnovi, promena ćelijskog oblika determiniše činjenicu, da li će ćelija nastaviti da živi ili će podleći apoptozi, bez obzira na tip proteinskog molekula koji je učestvovao u procesu ćelijske adhezije (Chou i sar., 1995; Folkman i Moscona, 1978; Hong i Brunette, 1987; Werb i sar., 1986).

3.1.2.2.3. Uloga stečene egzogene pelikle na adheziju ćelija

Adhezija fibroblasta ili bakterijskih ćelija na površinu dentalnog implantata ne dešava se neposredno, već preko proteinskog sloja adsorbovanog na njegovoj površini. Proces adsorpcije ovog sloja počinje u trenutku kontakta površine implantata sa fluidima domaćina, a rezultat tog kontakta je obrazovanje tankog sloja proteina i proteoglikana na njegovoj površini. Proteini i proteoglikani se vezuju elektrostatičkim tipom veze, *Van der Waalsovom* silama privlačenja i zahvaljujući vodoničnom tipu veze. Upravo taj sloj, definisan je kao egzogena pelikla. Ona omogućava kolonizaciju kako bakterijskih ćelija, tako i ćelija fibroblasta i epitelnih ćelija. Biohemijska priroda stečene pelikle opredeljuje je kao deo ekstracelularnog matriksa i nedvosmisleno utiče na vrstu ćelija koja će se adherisati na površinu supstrata tj. dentalnog implantata. Pokrivanje površine implantata specifičnim proteinskim molekulima može uvećati ili umanjiti broj formiranih ćelijskih veza. Tako na primer, prekrivanje titanijumske površine sa kolagenom tipa IV, promoviše ćelijske adhezije fibroblasta i epitelnih ćelija, dok vibronektin ima antagonistički uticaj (Park i sar., 1998).

Adhezija ćelija domaćina na površinu implantata za medijatore ima integrinske receptorske mehanizme, koji omogućavaju vezu između proteina ekstracelularnog matriksa i receptora u području fokalnih adhezija ćelija. Područja pomenutih fokalnih adhezija sadrže integrine i prepoznatljive su specifične peptidne sekvence, kao što je Arginin²⁴-Glicin-Aspartamska kiselina, a koja je glavni konstituent proteina ekstracelularnog matriksa, fibronektina i vitronektina. Proteini ekstracelularnog matriksa takođe predstavljaju i medijatore u ćelijskim adhezijama mikroorganizama i to posredstvom adhezina, kao receptora

inkorporiranih u strukturu ćelijskog zida bakterija (Baier i sar., 1984; Ruoslahti & Pierschbacher, 1987).

3.2. In vitro testovi

Uobičajeni pristup u ispitivanju biokompatibilnosti je da se počne sa jednostavnim in vitro testovima baziranim na ćelijskim kulturama, kao što se rutinski radi u toksikologiji. Ukoliko ovi eksperimenti daju dobre rezultate, onda se rade složeniji eksperimenti na životinjama i testovi kliničke provere na ljudima (Watacha, 2012). Kliničke studije su poslednji korak u procesu evaluacije biokompatibilnosti (Schmalz & Arenholt-Bindslev, 2012). Treba napomenuti da se u ovom procesu, prvo moraju analizirati dostupni podaci o fizičkim i hemijskim karakteristikama materijala, a potom se donosi odluka o potrebi i vrsti daljih ispitivanja.

Ne samo materijal čiji je hemijski sastav izmenjen, već i svaki materijal koji se proizvodi drugačijim tehnološkim postupkom od do tada korišćenog i testiranog (sertifikovanog) mora se proveriti i testirati. Postoji mogućnost da tehnološki postupak obrade, u ovom slučaju različite metode obrade uzoraka, utiče na svojstva materijala (Ivković i sar., 2013).

3.2.1. Ćelijske linije

In vitro testovi su najmlađa strategija u određivanju biološkog odgovora na materijal i koriste se kao inicijalni testovi u ispitivanjima biokompatibilnosti (ISO 10993, 1994).

Trenutno se in vitro testovi definišu kao testovi koji se izvode izvan živog organizma, u laboratorijskom posuđu, uz korišćenje kultura ćelija ili ćelijskih organela (Stamenković i sar., 2007; Dee i sar., 2002). In vitro testovi osmišljavaju se tako da simuliraju biološku reakciju ćelija i tkiva koje dolazi u kontakt sa ispitivanim materijalom.

In vitro testovi su brži, jednostavniji, jeftiniji, lakši za ponavljanje i lakši za ocenjivanje od drugih vrsta testova (Dahl i sar., 2006; Jorge i sar., 2007). U uslovima in vitro mogu se ispitivati i međusobni uticaji biomaterijala i mikroorganizama sa kojima su isti materijali u kontaktu u ustima pacijenta (Stamenković i sar., 2007; Dee i sar., 2002). Uprkos nedostacima, mogućnost da kontrolišemo i posmatramo odnos ćelija–materijal u in vitro okruženju daju

dobar uvid u to kako materijali utiču na biološke sisteme (Watacha, 2012). Komponente *in vitro* testova su biološki sistem (kulture tkiva ili organa, ćelijske kulture), vrsta kontakta materijala i ćelija i konačna biološka reakcija na prisustvo materijala (Moharamzadeh i sar., 2009).

Za *in vitro* ispitivanja stomatoloških materijala koriste se jednoslojne kulture ćelija ili trodimenzionalni (3D) modeli oralne mukoze (dobijeni tkivnim inženjeringom), čiji izbor i raspored simuliraju *in vivo* uslove.

U *in vitro* testovima koristi se veliki broj različitih ćelijskih linija. Pri odabiru ćelijske linije, neophodno je uzeti u obzir njene karakteristike, kao i optimalne uslove rasta.

Ćelije koje se mogu koristiti za *in vitro* ispitivanja dele se na:

- permanentne;
- primarne ćelijske linije.

Izbor ćelija (permanentne ili primarne ćelijske linije) zavisi i od biološkog cilja predviđenog u testu citotoksičnosti.

Permanentne (kontinuirane, immortalne) ćelijske linije su jasno morfološki i funkcionalno definisane, relativno se lako kultivišu i komercijalno su dostupne. Njihova upotreba omogućava dobru korelaciju rezultata različitih laboratorija. S druge strane, one su jednostavniji replikacioni sistemi, bez specifičnog metaboličkog potencijala normalno prisutnog u organizmu (Kostić i sar., 2010). U cilju ispitivanja potencijalne toksičnosti stomatoloških materijala, najčešće se koriste fibroblastne, epitelne, osteoblastne, osteoklastne, odontoblastne i tumorske ćelije (Huang i Chang, 2002) (tabela 1). Tumorske ili transformisane ćelijske linije, zbog promena u genomu, mogu dati u izvesnoj meri promenjen odgovor ćelijske kulture na prisustvo ispitivanog materijala u odnosu na netransformisane, diploidne ćelije (Huang i Chang, 2002; Jurisic i Bumbasirevic, 2008).

Primarne ćelijske linije dobijene su biopsijom oralne sluzokože, pulpe, parodontalnog tkiva ili iz periferne krvi (tabela 2) i ustanovljene su u samoj laboratoriji. Njima se postiže bolja simulacija *in vivo* uslova, jer poseduju sve osobine tkiva iz koga su uzete. Izbor primarnih ćelija zavisi od vrste ispitivanog materijala, kao i od vrste tkiva sa kojim je ispitivani materijal u neposrednom kontaktu. Dostupne su samo u specijalizovanim laboratorijama, a koriste za specifična naučna istraživanja (Sipahi i sar., 2006).

Tabela 1. Tipovi kontinuiranih ćelijskih linija za ispitivanje biokompatibilnosti materijala
 (Pizzofferato i sar., 1994).

Izvor	Ćelije
miš	L ćelije, subkutanog masnog tkiva
	L929 fibroblasti
	P1534, ćelije leukemije
	3T3, vezivni fibroblasti
pacov	Walker 245, ćelije karcinoma
majmun	VERO, fibroblasti bubrega
čovjek	HeLa, ćelije karcinoma grlića materice
	KB, ćelije oralnog karcinoma
	WI-38, plućni fibroblasti embriona
	IMR-90, plućni fibroblasti embriona
	MRC-5, plućni fibroblasti embriona
	Girardi ćelije pluća

Tabela 2. Vrste primarnih ćelijskih linija koje se koriste za ispitivanje biokompatibilnosti
 (Pizzofferato i sar., 1994).

Izvor	Ćelije
miš	sinovijalni fibroblasti
	peritonealni makrofagi
pile	embrion
	fibroblasti srca embriona
	osteoblasti kalvarije
zec	peritonealni i alveolarni makrofagi
	monociti periferne krvi
	kornealne ćelije
čovjek	sinovijalni fibroblasti
	limfociti i granulociti periferne krvi
	endotelne ćelije
	kornealne ćelije
	osteoblasti

Fibroblasti su ćelije koje se najčešće koriste u *in vitro* testovima. Oni se smatraju pogodnima, zbog toga što nastaju među prvim ćelijama oko rane koja zarasta, a često su i osnovne ćelije u sastavu tkiva u kojima se ugrađuju medicinski uređaji (Pizzofferato i sar., 1994). Pored njih, najčešće se koriste embrionalne ćelije i maligne ćelije (Tabela 4.4.) (Pizzofferato i sar., 1994). Od svih fibroblasta, vlakna L-929 mišjih fibroblasta najduže se koriste za testiranje materijala (ISO 7405, 1997). Ćelije L-929 su prevashodno izabrane zbog toga što su lake za održavanje u kulturi i što daju rezultate koji su slični s rezultatima dobijenim *in vivo* testovima na životinjama. Pored L929 ćelijske linije, danas se najviše koristi MRC-5 ćelijska linija, koja je humanog porekla.

MRC-5 ćelijska linija izolovana je od normalnog tkiva pluća 14 nedelja starog muškog fetusa od strane *J. P. Jacobs-a*, septembra 1966. Godine (Watacha, 2001). Ćelije imaju mogućnost da se dele 42 do 46 puta pre nego što dođe do pada proliferacije. MRC-5 ćelijske linije najčešće se koriste za virološke studije (Adenovirusi, Coxsacki A, Cytomegalovirus, Echovirus, Herpes simplex Virus, Poliovirus, Rhinovirus, Varicella Zoster Virus). Takođe se koriste i za *in vitro* ispitivanje citotoksičnosti.

Biološka reakcija ćelija može da se opiše morfološki ili kvantitativnom analizom. Tretiranje ćelija citotoksičnim materijama može dovesti do različitih oštećenja ćelija. One mogu podleći nekrozi, kada gube integritet membrane i brzo umiru kao rezultat lize ćelije. Zatim, normalni rast i deoba ćelija mogu prestati (opadanje ćelijske proliferacije), ili se može aktivirati genetski program kontrolisane ćelijske smrti (apoptoza). Za jednostavnija istraživanja potencijalne toksičnosti stomatoloških materijala koriste se metode koje se baziraju na oštećenju ćelijske membrane i ispitivanju stepena ćelijske vijabilnosti i proliferacije (agar i filter difuzioni test, almar plavo, tripan plavo, MTT, propidijum jodid test, testovi inkorporacije radioizotopa i dr.). Citotoksičnost i citostatičnost materijala se mogu odrediti preko testova vijabilnosti.

Ćelijska vijabilnost se definiše kao broj živih ćelija u ukupnom ćelijskom uzorku. Procena ćelijske vijabilnosti može se vršiti na dva načina: direktno i indirektno. Direktna metoda je najjednostavnija i zasnovana je na očuvanju integriteta membrane zdrave ćelije i osobini da ne propušta boje kao što je tripan plavo. U ovom slučaju mrtve ćelije se oboje, a zdrave ćelije ne primaju boju pa se mogu direktno izbrojati u hemocitometarskoj komori.

Pojedine boje imaju sposobnost da prođu kroz membranu vijabilnih ćelija, da uđu u unutrašnjost ćelija i da ih oboje vezujući se za određene ćelijske strukture (Kostoryz i sar.,

1999). Boja neutralno crveno transportovana kroz plazmalemu u unutrašnjost ćelije vezuje se za lizosome i proliferativnu DNK (Kostoryz i sar., 1999). Na taj način neutralno crveno boji žive ćelije intenzivno crveno. Na ovom fenomenu zasniva se test agar difuzije.

Indirektna metoda se zasniva na proceni metaboličke aktivnosti, koja predstavlja indikator ćelijske vijabilnosti. Metabolička aktivnost se određuje tako što se ćelije inkubiraju sa tetrazolijumskim solima (MTT, HTT, WST-1) i na taj način se dobijaju formazanski produkti. Količina obojenih formazanskih produkata je direktno srazmerna metaboličkoj aktivnosti ćelija (Schmalz, 2009).

3.3. Karakteristike materijala za protetske nadogradnje

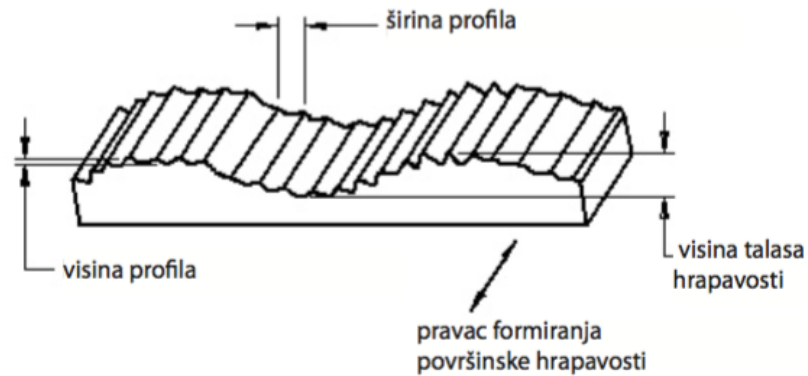
Priroda materijala i topografija njegove površine utiču na tip egzogene pelikle koja će se formirati na njegovoj površini, a to dalje utiče na celularne adhezije i ponašanje ćelija. Protetske nadogradnje se mogu izraditi od titanijuma, legure zlata, aluminijum trioksida i cirkonijum dioksida, a nazavisno od materijala od koga su napravljene, mogu biti prekrivene dentalnom keramikom, koja se proteže manje ili više ispod nivoa mekih tkiva.

Obzirom na prirodu eksperimenta sadržanog u doktorskoj disertaciji, materijal koji je zaokuplja pažnju je cirkonijum dioksid polikristal stabilizovan itrijum oksidom. Titanijum je tradicionalni materijal izbora kada su implantati i njihove komponente u pitanju, a cirkonijum, svakako, kao moderan materijal predstavlja izvor sve brojnijih studija i naučnih istraživanja.

3.3.1. Hrapavost materijala

Hrapavost je pojam koji definiše odstupanje površine od idealnog oblika, posmatran kao nepravilnost površine, odnosno kao kratke talasne dužine.

Na slici 1. su predstavljene osnovne veličine kojima se može opisati hrapavost predmeta. Stvarna površina predmeta ograničava predmet od okoline i na osnovu posmatranja stvarne površine predmeta, prikazane na slici, definisani su određeni profili i površine.



Slika 1. Osnovne veličine za opis hrapavosti predmeta

Pod pojmom hrapavosti podrazumijevaju se sve nepravilnosti na površini materijala koje su posledica specifične obrade materijala, ali koje ne uključuju talasavost, odstupanje od oblika i površinske greške. Da bi se pojam hrapavosti lakše razumeo, neophodno ga je pojednostaviti, tako da se hrapavost površina ocenjuje preko jednodimenzionalnih parametara na osnovu dvodimenzionalnog profila površine. Za istraživanje različitih površinskih struktura prvo se određuje profil površine, odnosno presek istraživane površine ravninom obično vertikalnom na smer tragova obrade površine. Izbor metoda profilisanja i parametara hrapavosti definisan je međunarodnim standardima (ISO 11562, DIN 4777). Profil svake površine može biti sastavljen od niza komponenti frekvencija. Komponente visoke frekvencije (kratki talas) odgovaraju onima koje su primećene kao hrapave i zbog toga su nazvane „hrapavost“. Komponente niske frekvencije (dugi talas) odgovaraju postupnim promenama u profilu i povezuju se s pojmom „valovitost“. Ako je potrebno izdvojiti određene komponente frekvencija profila površine treba provesti tzv. filtriranje. Postupak filtriranja za izdvajanje profila hrapavosti podrazumeva propuštanje komponenti kratkih talasnih dužina (visoke frekvencije) i primenu profilnog filtera λ_c (ISO 11562).

Radi lakšeg razumevanja i pojašnjenja parametara hrapavosti definisani su relevantni nazivi geometrijskih parametara (preporuka norme ISO 4287-1997):

- Parametar R – parametar izračunat iz profila hrapavosti;
- Profilni filter (*cut off*), λ_c – određuje presek između komponenti hrapavosti i valovitosti (ISO 11562);
- Srednja linija – referentna linija u odnosu na koju se određuju parametri hrapavosti, a ima oblik geometrijskog (idealnog) profila;

- Dužina ocenjivanja, l_m – dužina u smeru X ose korišćena za određivanje profila pod procenom (ISO 4288);
- Referentna dužina, l_e – dužina u smeru X ose korišćena za otkrivanje odstupanja karakterizirajući profil pod procenom. Jedna dužina ocenjivanja kod merenja hrapavosti sadrži nekoliko (najčešće pet) referentnih dužina;
- Vrh profila – deo profila usmeren prema spoljašnjoj strani materijala (od ispitivane površine prema okolnom medijumu) koji povezuje dve susedne tačke preseka profila sa X osom (referentnom linijom);
- Donji deo profila – deo profila usmeren prema unutrašnjoj strani materijala (od okolnog medijuma prema ispitivanoj površini) koji povezuje dve susedne tačke preseka profila sa X osom (referentnom linijom);
- Visina i/ili izbor razmaka – minimalna visina i minimalni razmak vrhova i donjih delova ispitivanog profila koje treba uzeti u obzir;
- Element profila – vrh profila i susedni donji deo profila;
- Visina vrha profila, Z_p – udaljenost između X ose i najviše tačke vrha profila;
- Dubina donjeg dela profila, Z_v – udaljenost između X ose i najniže tačke dnjeg dela profila;
- Širina elementa profila, X_s – dužina segmenta X ose koja se preseca s elementom profila.

3.3.1.1. Parametri hrapavosti s obzirom na funkciju površine

Hrapavost bilo koje površine određuje njene promene u kontaktu s nekom drugom površinom, reakciju u kontaktu s rastvorom, adsorpciju rastvora, definiše osetljivost površine, izgled, trošenje i podnošenje opterećenja. Da bi se topografski prikazi površina mogli i brojačano izraziti i međusobno uporediti, definisani su 2D i 3D parametri hrapavosti koji omogućavaju pojašnjenje strukture površina. Merenje površinske teksture pomoću parametara hrapavosti danas je internacionalno standardizovano (ISO13565:1996), iako su često razvoj i primena pojedinih parametara vezani isključivo uz namenu istraživanja. Takav pristup je uzrokovao razvoj velikog broja parametara, koji ne znače neminovno i njihovu zajedničku primenu pri ocenjivanju teksture površine (Adams, 1999). Koji će se parametar određivati i meriti zavisi isključivo od toga koja se karakteristika i funkcionalno svojstvo želi opisati ili numerički

izraziti. U literaturi se navodi čak i više od trideset parametara hrapavosti (Baker, 1997), a njihov izbor i broj zavisi od funkcije površine i procesa primene. Neki parametri se retko sreću u praksi, upravo stoga što jednostavno nisu našli općstu primenu. Zavisno od karakteristika profila merene površine, parametri hrapavosti se mogu podeliti u tri osnovne grupe:

Amplitudni parametri hrapavosti su mere vertikalnih karakteristika odstupanja površine, odnosno, parametri koji su u potpunosti određeni visinama vrhova ili dubinama donjih delova ili oboje, nezavisno od horizontalnih razmaka hrapavih nepravilnosti površine (Adams, 1999).

Uzdužni parametri hrapavosti su parametri koji su potpuno određeni uzdužnim razmacima hrapavih nepravilnosti površine, nezavisno o amplitudama vrhova i dolova.

Hibridni parametri hrapavosti su parametri koji zavise od amplituda vrhova i dna profila, te o horizontalnim razmacima, a zavise od oblika profila. Izdvojeni su parametri koji se najčešće koriste za specifičnu kontrolu trošenja određene površine.

3.3.1.2. Hrapavost površine dentalnih implantata

U literaturi, postoje brojne studije koje pokazuju da hrapavost površine implanta od titanijuma utiče na stopu oseointegracije i biomehaničke fiksacije (Cochran, 1998; Wennerberg i sar., 1998). Hrapavost površine može biti podeljena u tri nivoa u zavisnosti od osobina topografije: makro, mikro i nano nivo.

Makro nivo je definisan na osnovu topografskih svojstava i zahvata opsega od nekoliko milimetara do desetine mikrona. Ova skala je direktno povezana sa geometrijom implantata, navojem zavrtnja i makroporoznim tretiranjem površine, što daje hrapavost površini veću od 10 μm . Mnogi autori su pokazali da se i rana fiksacija i dugoročna stabilnost proteze mogu poboljšati profilom visoke hrapavosti u odnosu na glatke površine (Buser i sar., 1991; Gotfredsen i sar., 1995, Wennerberg i sar., 1996).

Visoka hrapavost rezultira mehaničkim blokiranjem između površine implanta i daljeg rasta kosti. Veliki rizik koji visoko hrapava površina nosi sa sobom je nastanak periimplantitisa kao i povećanje jonskog propuštanja (curenja) (Becker i sar., 2000). Umerena hrapavost od 1-2 μm može ograničiti ova dva parametra (Albrektsson & Wennerberg, 2005).

Mikrotopografski profil dentalnog implantata je po hrapavosti površine definisan tako da pripada opsegu od 1 do 10 μm . Ovoliki opseg hrapavosti povećava blokiranje između mineralizovane kosti i površine implanta (Wennerberg i sar., 1996; Wennerberg i sar., 1998). Idealna površina bi trebalo da bude pokrivena hemisferičnim udubljenjima od oko 1,5 μm dubine i prečnika 4 μm (Hansson & Norton, 1999).

U savremenoj implantologiji implantati su kategorizovani i na osnovu procene hrapavosti (Sa). U odnosu na hrapavost delimo ih u četiri grupe (Albrektsson i Wennerberg 2004a): glatka ($Sa < 0,5 \mu\text{m}$), minimalno hrapava ($Sa = 0,5 - 1,0 \mu\text{m}$), umereno hrapava ($Sa = 1,0 - 2,0 \mu\text{m}$) i hrapava ($Sa > 2\mu\text{m}$). (Sa) vrednost predstavlja visinu šiljaka i udubljenja na površini, dok parametar (Sdr), predstavlja razvoj površine u poređenju sa savršeno glatkom površinom. Sa većom ukupnom površinom implantata može se dobiti i veća površina kontakta između implantata i tkiva. Postoji oko 50 direktnih ili kombinovanih parametara za hrapavost površine (Gadelmawla i sar., 2002). Međutim, još uvek nije poznato u kom obimu su ovi parametri značajni (Ahmed i sar., 2011).

Glavna klinička indikacija za korišćenje implantata hrapave površine je loš kvalitet ili smanjen obim kosti u koju se ugrađuje implantat. U ovakvim nepovoljnim kliničkim uslovima rani i jak kontakt kost-implant bi mogao biti koristan za omogućavanje većeg opterećenja. U slučajevima nedovoljne količine kosti ili anatomskih ograničenja, implantati kratkog dizajna sa hrapavom površinom su pokazali bolje kliničke rezultate od implantata sa glatkim površinom (Conner i sar., 2003; Testori i sar., 2001). Veliki broj studija je pokazao da hrapava površina opsega od 2- 20 μm daje mnogo bolji kontakt između kosti i implanta, kao i veći otpor od otklona momenta sile za razliku od drugih tipova topografija površine (Wennerberg i sar., 1996; Wennerberg i sar., 1998). Međutim, Cochrane i sar. (Cochrane i sar., 1998) nisu našli kliničke dokaze, kojima bi se pokazala superiornost neke posebne površine implanta.

Profili površine u nanometarskom opsegu ($>10 \mu\text{m}$) imaju važnu ulogu u adsorpciji proteina, adheziji osteoblastnih ćelija pa samim tim i u oseointegraciji (Brett i sar., 2004). Ipak, teško je proizvesti hrapavu površinu u nanometarskom opsegu uz pomoć hemijskih tretmana. Štaviše, optimalna površina nanotopografije za selektivnu adsorpciju proteina vodi do adhezije osteoblastnih ćelija i brza apozicija kosti je nepoznata.

U novije vreme razvijene su razne metode, kako bi se stvorila hrapava površina i poboljšala oseointegracija dentalnih implantata (Le Gu'ehennec i sar., 2006). Ove metode podrazumevaju: plazmiranje (titanijum plasma-spraying), bombardovanje česticama keramike, nagrivanje kiselinom i anodizaciju.

3.3.1.2.1. Hrapavljenje implantata plazmiranjem (titanium plasma-spraying)

Ovaj metod, "titanium plasma-spraying" (TPS) je korišćen za stvaranje hrapave površine implanta (Masaki i sar., 2005). Ovaj metod se sastoji od ubrizgavanja titanijumskog praha u „plasma torch“ na visokoj temperaturi. Čestice titanijuma se projektuju na površinu implanta gde se zgušnjavaju i spajaju i tako formiraju sloj debljine od oko 30 μm . Debljina mora dostignuti opseg od 40-50 μm da bi sloj postao ravnomeran. Krajnji TPS sloj ima prosečnu hrapavost od oko 7 μm što povećava površinu implanta (polje površine implantata).

3.3.1.2.2. Hrapavljenje implantata peskiranjem

Kod ove metode hrapavljenja površine titanijuma sastoji se od peskiranja implantata jakim česticama keramike koje se propuštaju velikom brzinom kroz rasprskivač uz pomoć vazduha pod pritiskom. Različita hrapavost površine se može postići u zavisnosti od veličine keramičkih čestica. Materijal za peskiranje mora biti hemijski stabilan, biokompatibilan i ne bi trebalo da ometa oseintegraciju titanijumskih implanata. Kod ove metode se koriste razne keramičke čestice kao što su: aluminijumske (Al_2O_3), titanijum oksid i čestice kalcijum fosfata koje stvaraju umereno hrapavu površinu u opsegu od 1-2 μm na površini mplantata.

3.3.1.2.3. Hrapavljenje implanata nagrivanjem kiselinom

Nagrivanje jakim kiselinama kao što su HCl, H_2SO_4 , HNO_3 i HF stvara mikro neravnine na titanijumskim površinama veličine u opsegu od 0,5 do 2 μm u prečniku (Massaro i sar., 2002; Zinger i sar., 2004). Potapanjem titanijumskih implantata u mešavinu koncentrovanih HCl i H_2SO_4 , zagrejanih na temperaturi višoj od 1000 °C (dvostruko nagrivanje kiselinom) tokom nekoliko minuta dobija se mikrohrapava površina. Ako se nagrivanje vrši fluorovodoničnom kiselinom anjoni iz kiseline mogu biti inkorporisani u sloj oksida (kao što su joni fluora) (Cooper i sar., 2006).

3.3.1.2.4. Peskirane i kiselinom nagrižene površine (SLA)

U savremenoj implantologiji dentalni implantati su obično peskirani česticama i nagriženi kiselinom. Ovo se primenjuje kako bi se dobila površina koja je dvostruko hrapava, a ovim postupkom se uklanjaju i utiskuju čestice kojima se površina peskira. Nagrizanje smanjuje visinu šiljaka (neravnina) i stvara manja udubljenja, tako da je prosečna hrapavost smanjena.

Ispiranjem implantata sa SLA površinom u prisustvu azota i čuvanjem u alkalnom rastvoru do upotrebe, količina kontaminacije ugljenikom može biti redukovana, a hidrofilnost površine implantata poboljšana (Rupp i sar., 2004). Na ovaj način stvorena je nova hidrofilna površina - SLActive.

SLActive površina je hemijski aktivna sa visokom slobodnom površinskom energijom, smanjenom kontaminacijom atmosferskim ugljovodonicima i jakom hidrofilnošću; ugao kontakta sa vodom je 0° za implantate sa SLActive, u poređenju sa 139.9° za implantate sa SLA površinom (Rupp i sar. 2004; Zhao i sar. 2005). SLActive površina je presvučena hidroskilatnim / hidriranim filmom titanijum oksida. Modifikacija površine se odvija pod N_2 uslovima i rezultujuća visoka slobodna površinska energija je sačuvana skladištenjem u izotoničnom fiziološkom rastvoru. OSC površina održava vrhunsku tehnologiju i moderan dizajn implantata. Mikrostruktura implantata nastaje izlaganjem njegove površine česticama peska, a zatim nagrizanjem kiselinom pri visokim temperaturama. Njena hidrofilnost obezbeđuje visok nivo krestalne kosti nakon implantacije i pojačan ćelijski odgovor po ugradnji.

Koštani odgovor na peskirane i kiselinom nagrižene površine poreden je na različitim implantnim površinama. Dokazano je da je potreban veći momenat sile za uklanjanje, odnosno za odvrtnje implantata sa dvostruko modifikovanim površinama u poredjenju sa implantatima sa površinama koje su samo nagrizane kiselinom (Szmukler-Moncler i sar., 2004). Takođe, značajno veći moment sile je potreban za uklanjanje implantata sa hrapavom površinom u poređenju sa mašinski obrađenim površinama, dok su slične vrednosti dobijene u poređenju sa implantatima koji imaju „titanijum plasma sprayed“ površinu. Nije primećena razlika u gustini kosti oko sva tri tipa implantata (Buser i sar., 1999).

Buser i sar. (Buser i sar., 2004). su pokazali da implantati sa SLActiv površinom postižu veći kontakt sa kosti i bolju stabilnost u ranijim vremenskim periodima (6 nedelja) u poređenju

sa implantatima sa SLA površinom, čime je moguće smanjenje vremena zarastanja sa 12 na 6 nedelja.

3.3.1.2.5. Hrapavljenje implantata anodizacijom

Mikro ili nano porozne površine se takođe mogu stvoriti potencijalno ili galvanostatičkom anodizacijom titanijuma u jakim kiselinama (H_2SO_4 , H_3PO_4 , HNO_3 , HF) pri velikoj gustini električne struje ($200A/m^2$) ili električnom potencijalu (naponu) (100V). Ishod anodizacije je zadebljanje sloja oksida na više od 1000 nm na površini titanijumskih implantata. Kada se u rastvoru elektrolita koriste jake kiseline, sloj oksida se duž linija prenošenja struje rastvara dok se u nekim drugim regijama zgušnjava (zadebljava). Rastvaranje sloja oksida duž linija prenošenja struje stvara mikro ili nano pore na površini titanijuma (Huang i sar., 2005; Sul i sar., 2001; Sul i sar., 2002; Sul i sar., 2005). Anodizacija stvara izmene u mikrostrukturi i stepenu kristalizacije sloja titanijum oksida (Sul i sar., 2002)

3.3.1.2.6. Hrapavljenje implantata slojem kalcijum fosfata

Implantati mogu biti obloženi slojevima kalcijum fosfata koji su sastavljeni od hidroksilapatita. Ugradnju implantata prati oslobađanje kalcijum fosfata u periimplantnoj regiji, povećavanje zasićenja telesnim tečnostima i taloženje biološkog apatita na površini implantata (Daculsi i sar., 2003; De Groot i sar., 1998).

3.3.1.3. Ispitivanje površinske hrapavosti biomaterijala

U proceni biokompatibilnosti dentalnih materijala bitni su i površina i oblik uzoraka materijala. Uzorci koji su napravljeni od istog materijala, ali različitog oblika, npr. trougao i diska, izazvaće različite reakcije nakon ugradnje u meka tkiva. Jaču reakciju će izazvati uzorci oblika trougla. Parametri koji opisuju površinu materijala a važni su za biološke reakcije su hrapavost, kvašenje, površinska pokretljivost, hemijski sastav, električni naboj, kristalna struktura i heterogenost. Za svaki pojedinačni slučaj, najznačajniji parametri se određuju posebno (Balać i sar., 2010).

Metode za merenje površinske hrapavosti uzoraka se mogu podeliti na dvodimenzionalne i trodimenzionalne, kao i na kontaktne i bezkontaktne metode (Paepegaey i sar., 2013; Radriguez i sar., 2009). Kontaktne metode hrapavost materijala mere pomoću merača: igla, pipak, sonda, fokusirani snop svetla. Bezkontaktne metode koriste skenirajuću sondu. Kontaktne metode koriste merni instrument kojim se meri visina svake tačke na ispitivanoj površini.

Osnovni instrumenti za merenje hrapavosti površine sastoje se od merača koji je u kontaktu sa površinom klizi po njoj, potom uređaja za prikupljanje i pojačavanje signala i konvertora - uređaja koji prikupljene signale pretvara u numeričke parametre (Pavlović, 2012). Metoda kontaktne profilometrije je često korišćena u različitim istraživanjima (Mendes i sar., 2012; Ghinea i sar., 2011; Ergücü i sar., 2007; Jevremović i sar., 2012; Heurich i sar., 2010; Bagis i sar., 2014).

Skenirajuća sondna mikroskopija (eng. *Scanning Probe Microscopy*) je naziv za grupu tehnika, čiji se rad zasniva na snimanju površine materijala upotrebom fizičke sonde koja vrši skeniranje. Tri glavne tehnike iz ove grupe, koje se koriste za karakterizaciju nanomaterijala, nanočestica, nanokomponenti, kao i za izgradnju nanosistema, su:

- skenirajuća tunelska mikroskopija (STM, eng. *Scanning Tunneling Microscopy*);
- mikroskopija atomskih (međuatomskih) sila (AFM, eng. *Atomic Force Microscopy*);
- mikroskopija magnetnih sila (MFM, eng. *Magnetic Force Microscopy*).

Skenirajuća sondna mikroskopija nastala je 1981. godine, izumom prvog SPM uređaja pod nazivom skenirajući tunelski mikroskop (STM). Zaslužni za ovaj izum su naučnici *Gerd Binnig* i *Hajnrh Rorer*, koji su za ovo svoje otkriće, 1986. godine, dobili Nobelovu nagradu za fiziku.

STM i MFM nemaju posebnog značaja za ovu doktorsku disertaciju, tako da će detaljno biti opisana samo AFM metoda. Uz pomoć mikroskopa atomskih sila (AFM) mogu se meriti parametri hrapavosti, 3D topografije i profili hrapavosti površina materijala, duž iste referentne dužine. AFM analizom se mogu dobiti kvalitativni i kvantitativni podaci o topografiji površina različitih materijala.

3.3.1.3.1. Mikroskop atomskih sila (AFM)

Mikroskop atomskih sila je još davne 1986. godine razvio Binnig kao prvu tehnologiju prikaza slika u realnom vremenu za obavljanje veoma preciznih merenja, pri silama manjim od $1 \mu\text{N}$ (Binnig, 1986; Binnig, 1987). AFM je prvobitno razvijen za prikaza 3D slika površina uzoraka veoma visokih rezolucija. Tek kasnije, AFM je modifikovan za tribološke studije i danas je u širokoj primeni upravo zbog činjenice da je i možda najviše doprineo razvoju oblasti nanotribologije (Bushan, 2004). AFM analizom moguće je vršiti istraživanja koja imaju naučni i inženjerski značaj u vidu detaljne karakterizacije kontaktnih površina materijala na atomskom nivou.

Generalno, AFM se koristi za izučavanje adhezije, tragova obrade, ispitivanja tragova habanja nastalih tokom skreć testa ili kontakta dva tela na tribometru, mehaničkih karakteristika, kao i graničnog podmazivanja dva čvrsta tela (Bushan, 1995; Bushan, 1999; Bushan, 2000; Bushan, 2001; Bushan, 2004). Poslednjih godina AFM je postao nezamenljiv uređaj za merenje parametara hrapavosti i vizualizaciju 3D topografije površina, na mikro i nano nivou. AFM ima neuporedivo bolju lateralnu rezoluciju u odnosu na običan profilometar, međutim maksimalni merni opseg površine je limitiran na $100 \times 100 \mu\text{m}$.

AFM se u suštini sastoji od tri sistema koji rade kao jedna celina kojom se upravlja pomoću računara koristeći princip povratne sprege:

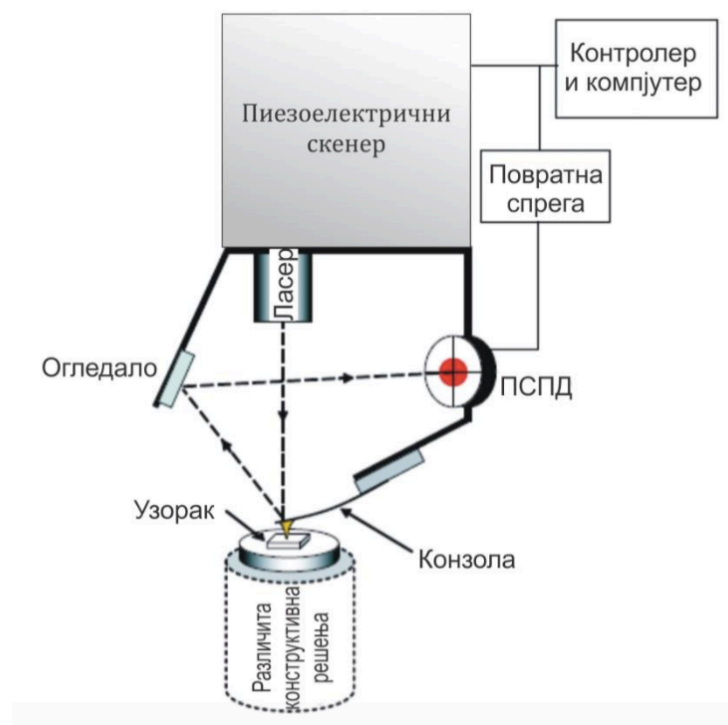
- sistem za detektovanje sile;
- sistem za detektovanje izvijanja konzole; i
- sistem za pozicioniranje.

Sistem za detektovanje sile je deo AFM-a koji ima direktnu interakciju sa površinom skeniranog uzorka, a sastoji se od fleksibilne konzole koja na svom slobodnom kraju ima senzor. Mere se ultra male sile (manje od 1 nN) koje se javljaju između površine senzora, koji se nalazi na slobodnom kraju fleksibilne konzole, i površine uzorka. Ove ultra male sile se određuju merenjem pomeranja (savijanja i/ili uvijanja) fleksibilne konzole ultra male mase korišćenjem različitih tehnika merenja. Pomeranja fleksibilne konzole su reda veličine stotog dela nm, a sile koje se tom prilikom mere su reda veličine desetog dela nN. Da bi bilo moguće vršiti tako precizna merenja, konzole koje se tom prilikom koristi imaju krutost reda veličine 1 N/m ili manje.

Konzole su komercijalno dostupne i mogu se pronaći u širokom opsegu dimenzija i krutosti u zavisnosti od prirode merenja. Konzola se karakteriše normalnom, longitudinalnom

i lateralnom (torzionom) krutošću. Materijal, geometrija i prevlaka konzole su takođe veoma bitni faktori prilikom merenja na AFM-u.

Na slici 2 je prikazan princip rada sistema za detektovanje izvijanja konzole. Laserski snop se odbija sa zadnje strane konzole i preko ogledala dolazi do PSPD foto senzora kretanja (eng. *Position Sensing Photo Detector*). Pomeranje vrha senzora na konzoli izaziva promene izlaznog napona u PSPD-u. Promena izlaznog napona PSPD-a, preko povratne sprege, uzrokuje pomeranje celog sistema za detektovanje izvijanja konzole koji čine laser, ogledalo i PSPD. Kod drugačijih koncepcija konstrukcije AFM-a se ne pomera ceo sistem za detektovanje izvijanja konzole (laser, ogledalo, PSPD), već samo testirani uzorak.



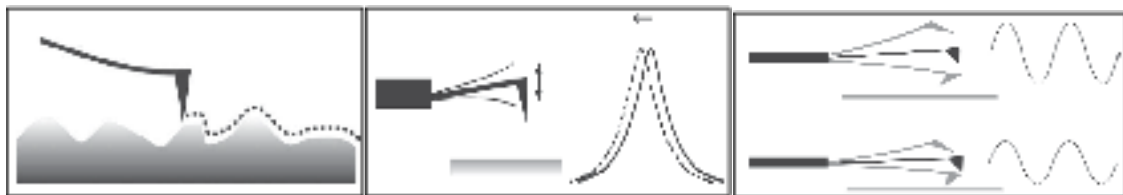
Slika 2. Šematski prikaz principa rada sistema za detektovanje izvijanja konzole [Palaci I. (2007)]

Pozicioniranje i fino podešavanje relativnog položaja senzora na slobodnom kraju konzole vrši se pomoću piezoelektričnog skenera dok se gruba podešavanja položaja vrše pomoću koračnog motora kada je to moguće. Softverskim putem sve vreme se meri i prati savijanje i/ili uvijanje konzole preko vrhova neravnina površinske hrapavosti i na taj način rekonstruiše topografija površine uzorka na veoma precizan način. AFM omogućava direktan 3D prikaz topografije površine gde slike mogu biti prikazane dvodimenzionalno ili trodimenzionalno.

AFM može raditi u različitim režimima u zavisnosti od tipa merenja (kontaktno ili bezkontaktno) ili u zavisnosti od površine uzorka koji se analizira. Na taj način može se dobiti široki spektar različitih informacija ispitivane površine uzorka. Takođe različiti kompjuterski programi se mogu pridružiti AFM-u, što omogućava statističku analizu dobijenih parametara hrapavosti ispitivane površine, ili preciznu analizu bilo kog preseka, te mnoga druga ispitivanja i analiziranja.

Najvažniji režimi su:

- režim merenja normalnih sila - vrh kantilevera je u direktnom kontaktu sa površinom uzorka;
- režim merenja tangencijalnih sila - vrh kantilevera se nalazi na određenoj udaljenosti od površine uzorka;
- modularni režim - vrh kantilevera pipka površinu uzorka u određenim tačkama (slika 3);



Slika 3. Šematski prikaz tipova režima rada AFM; (a) kontaktni mod, (b) bezkontaktni mod, (c) Tapping-polukontaktni mod

3.3.2. Cirkonijum dioksid

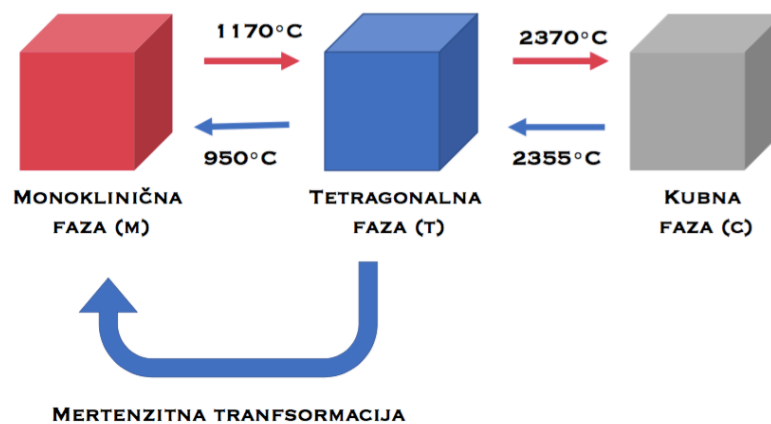
Cirkon je kao termin poznat još od davnina. Hijacint, odnosno crveni dragi kamen od cirkona, se spominje još u „Apokalipsi Svetog Jovana“ kao jedan od kamenja koji su bili deo zidova svetog Jerusalima. Ime cirkon je nastalo od stare persijske reči „zar gun“, što u prevodu znači boja zlata. Godine 1789. nemački hemičar *Martin Heinrich Klaproth* je otkrio cirkonijum dioksid, nakon što ga je izolovao termičkom obradom iz dragog kamena hijacinta, koji mu je donesen sa Dalekog istoka. Zahvaljujući njegovim izuzetnim svojstvima, nazvao ga je „čudesnim mineralom“ (Shen, 2014).

Atomski broj cirkonijuma je 40, a njegov simbol u periodnom sistemu elemenata je Zr. U poređenju sa titanijumom ima mnoge slične karakteristike. U prvom redu tu je otpornost na koroziju, mehanička otpornost, biokompatibilnost, itd.

Cirkonijum dioksid (ZrO_2) je hemijsko jedinjenje Zr^{4+} jona metala i O_2^- kiseoničnih ajona. Kao rezultat nastaje oksidno jedinjenje jonskog karaktera, koje uprkos Zr^{4+} jonu metala ne pripada metalima već grupi nemetalnih neorganskih jedinjenja. U suštini je pogrešno govoriti o metalu ili čeliku u ovom kontekstu, iz razloga što je očigledno da je cirkonijum oksidna keramika sačinjena finom, granulastom, polikristalnom strukturom (Völkel, 2006).

Cirkonijum dioksid se koristi više od 20 godina kao materijal koji svojim odličnim karakteristikama zadovoljava sve visoke standarde u različitim oblastima industrije i medicine. Njegove najpoznatije primene su u izradi noževa, kugličastih zglobova, delova satova, a u medicini za izradu veštačkog kuka. Razlog za to su odlične hemijske, kao i fizičko-mehaničke karakteristike cirkonijum dioksida. Zahvaljujući pomenutim karakteristikama, Garvie je opisao cirkonijum dioksid kao „keramički čelik“ (Garvie, 1975).

Karakteristike ZrO_2 se najbolje mogu opisati na osnovu minerala *badelita*. One se zasnivaju na mineralnoj strukturi i različitim kristalnim rešetkama koje ovaj materijal može da poseduje, poznate kao polimorfizam. To se ogleda kao postojanje tri različite kristalne faze, definisane kao: monoklinička (M), kubična (C), i tetragonalna (T). U prirodi postoji monoklinična faza (m) koja je prisutna u stabilnom obliku na sobnoj temperaturi pa sve do 1170 °C. Preko ove temperature dešava se rekonfiguracija kristalne faze u tetragonalnu, a od 2370 °C nastupa kubna modifikacija. Fazni prelazi su reverzibilni i u toku transformacije faza, zapreminsko širenje kristala (ΔV) se povećava za 3-5 %, u slučaju prelaza sa kubnog na tetragonalni (c→t) 0.5 %, i oko 4 % u slučaju prelaza sa tetragonalnog na monoklinični (t→m). Tokom hlađenja, proces se odvija spontano u obliku martenzitne transformacije kao što je to slučaj kod čelika, (slika 4) (Subbarao, 1974; Wolten, 1963; Bansal, 1972; Heuer, 1982; Deville, 2004; Shen, 2014).

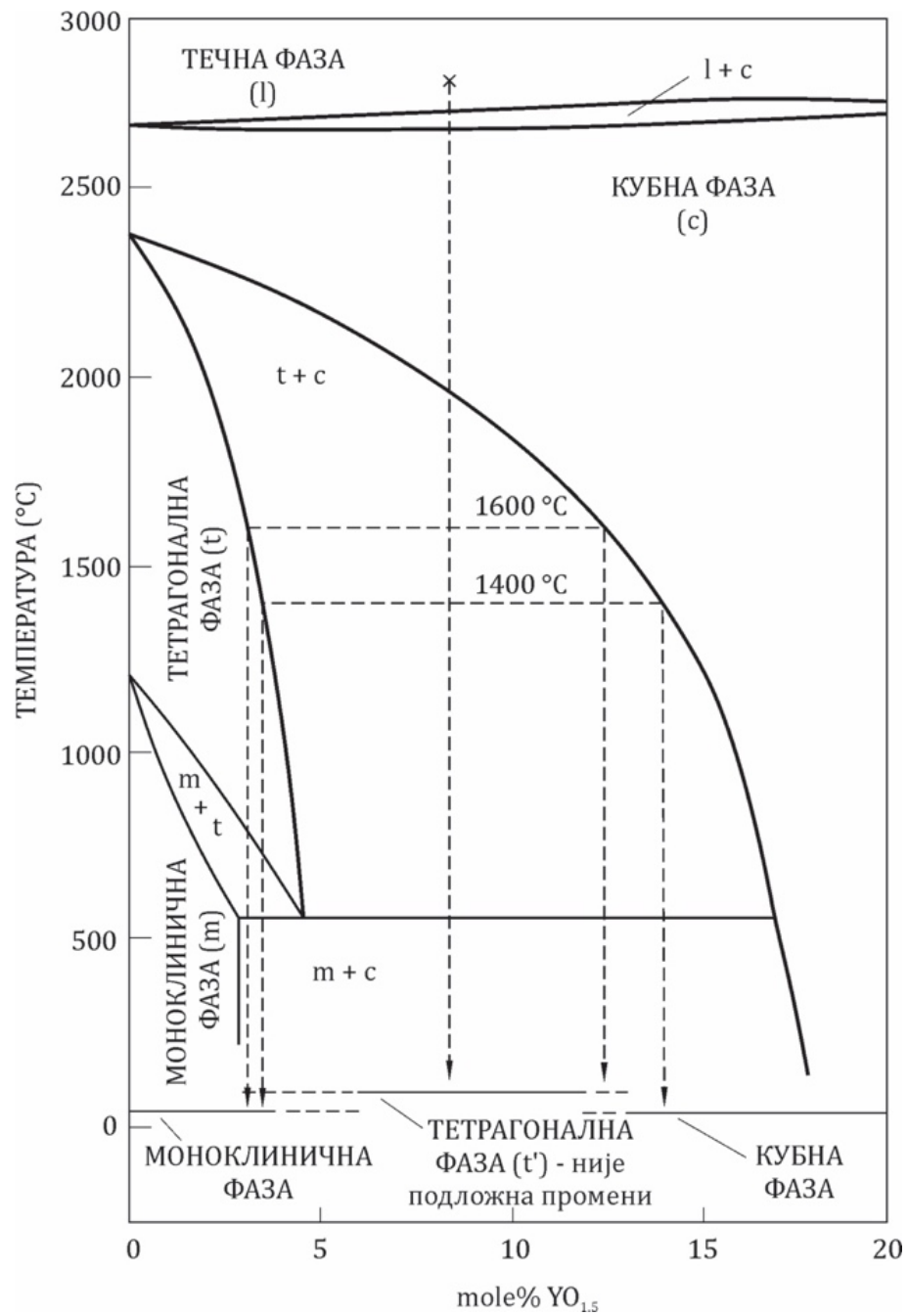


Slika 4. Transformacija ZrO₂ pri različitim temperaturnim fazama

Kubična i tetragonalna kristalna faza se mogu stabilizovati na sobnoj temperaturi adicijom oksida. Za cirkonijum se tada kaže da je metastabilan, što podrazumeva da ukoliko se izloži pritisku, dolazi do transformacije metastabilne kubične i tetragonalne faze u monokliničku, uz istovremenu zapreminsku ekspanziju. Ovaj proces dovodi do lokalizovane čvrstoće oko pukotine, koja se pod dejstvom pritiska može proširiti. Čvrstoća suštinski ograničava dalje širenje pukotine. Ovaj fizički fenomen je definisan kao transformacijsko očvršćavanje materijala, što direktno doprinosi superiornim mehaničkim karakteristikama cirkonijuma. Nažalost, transformacije materijala se mogu odigrati i u pasivnim uslovima, u domenu starenja materijala, što dovodi do hrapavljenja njegove površine i gubitka hemijskih partikula. Itrijum stabilizovani cirkonijum-dioksid je na sobnoj temperaturi u tetragonalnoj formi. Potpunu stabilnost pokazuje cirkonijum-dioksid sa većom koncentracijom Y₂O₃, ali za razliku od delimično stabilizovanog, pokazuje manju moć istežanja, a time i oblikovanja.

Na slici 5, predstavljen je fazni dijagram dobijanja Y-TZP keramike. Y-TZP keramika se uglavnom sinteruje na temperaturama u rasponu od 1400 °C do 1600 °C, u zavisnosti od početne veličine čestica granula. Na ovaj način se može postići veoma visoka relativna gustina materijala (do 99.5 %) i veoma fina i homogena veličina čestica (0.3-0.5 μm). Pošto se keramika zagreva u dvofaznoj oblasti (t+c), sinterovani Y-TZP cirkonijum se pretežno sastoji od 80-85 % tetragonalne faze, a manji deo (15-20 %) čini kubna faza. Čvrstoća i otpornost na lom sinterovanog materijala uveliko zavise od veličina i raspodele samih zrna. U poređenju sa ostalim monolitičkim keramikama, Y-TZP keramika ima najveću vrednost čvrstoće (preko 1.000 MPa) kada je materijal presovano sinterovan, kao i vrednost od 2400 MPa kada je materijal toplo izostatički presovan. Y-TZP keramika se danas uglavnom naziva cirkonijum

zbog široke upotrebe kao inženjerskog i biokeramičkog materijala visokih performansi (Piconi, 1999).



Slika 5. Prikaz faznog dijagrama Y-TZP ($ZrO_2-Y_2O_3$) (Kriegesmann, 1996)

Cirkonijum dioksid (ZrO_2) je keramički materijal, poznatiji kao cirkonija. Oksidi koji su zaduženi za poboljšanje mehaničkih karakteristika cirkonije su itrijum oksidi (Y_2O_3), kalcijum dioksid (CaO), magnezijum dioksid (MgO), koji omogućavaju stvaranje otpornih tetragonalnih cirkonijumskih polikristala. Termini kao što su: TZP ili itrijumom stabilizovani

cirkonijum dioksid polikristali, obogatili su stručnu stomatološku i medicinsku literaturu, a zapravo su bili retko jasno objašnjeni (Denry i Kelly, 2008).

Cirkonijum dioksid pokazuje visoku otpornost. Dodatak itrijuma višestruko povećava otpornost ZrO_2 u poređenju sa drugim keramičkim materijalima. Tako npr. aluminijumom ojačane keramike imaju dva puta manju otpornost, litijum-disilikatne keramike tri puta manju. Otpornost cirkonijum-dioksida je nešto veća i od metalo – keramičkih mostova (Jakovac, 2008).

Materijal ima nisku translucenciju, pa se stoga do sada nije koristio za pravljenje pune krune, već se tehnikom slojevitog modelovanja fasetnom keramikom postizao željeni efekat. Ipak, ovakvim postupkom se kompromituje otpornost usled smanjenja debljine, što kao posledicu ima pucanje. Danas postoje nove generacije cirkonijum-dioksida koje imaju povišenu translucenciju (Kollar i sar., 2008).

Otpornost opada sa starenjem, statistički to iznosi čak 50% u periodu od pola decenije. To se može prevazići izradom nadoknada pune forme (*eng. full anatomic*) od cirkonijuma, koji ima veću otpornost. Sa druge strane, manjak estetike se može korigovati u prednjoj zoni izradom krunica sa fasetnom keramikom (*eng. cut-back* tehnikom) (Jakovac, 2008).

Dugom obradom cirkonijum dioksida se stvara napon, stoga bi trebalo biti obazriv prilikom obrade. Preporučuje se brušenje uz malu silu i jako hlađenje, kao i kvalitetno sinterovanje i odabir fasetne keramike koja je od istog proizvođača, kako bi se uskladili termički koeficijenti, a time sprečilo kompromitovanje mehaničkih svojstava tokom obrade. Nastali napon se opušta u običnoj peći za pečenje keramike. Obična peć se, takođe, koristi i za bojenje nadoknada od cirkonijum dioksida (Denry i Kelly, 2008). Cirkonijum–dioksid se sinteruje u posebnim pećima koje postižu izrazito visoke temperature, preko 1100 °C. Regeneracijsko pečenje je neophodno nakon duge i ekscesivne obrade, kao i obrade neodgovarajućim ili grubim instrumentima. Sprovodi se posebnim programom u klasičnoj peći sa ciljem da spreči sve negativne efekte obrade nakon sinterovanja cirkonijum dioksida (Nelson i sar., 2010).

Nije pogodan za izradu delimičnih nadoknada, kao ni za izradu faseta, onleja i inleja, s obzirom da se ne može adhezivno vezati.

Cirkonija je široko primenjivana u medicini, naročito u ortopedskoj hirurgiji, a za izradu proteze kuka još od 1969. godine. Zahvaljujući ovoj širokoj primeni u medicinskoj praksi biokompatibilnost je detaljno ispitana i ustanovljena kao izvrsna. Niti jedan kancerogeni ili

mutageni efekat do sada nije ustanovljen (Covacci i sar., 1999; Lohmann i sar., 2002; Silva, Lameiras, & Lobato, 2002; Torricelli i sar., 2001).

Različit je stav autora po pitanju ispitivanja citotoksičnih efekata cirkonijum dioksida na ćelijske kulture. Dok je jedna grupa autora potvrdila slabiji ćelijski rast, kao i veće citoskične efekte keramike na bazi cirkonijum dioksida u poređenju sa aluminijum trioksidnom keramikom (Ito i sar., 1993), druga grupe autora nije dokazala citotoksične efekte cirkonijum dioksida (Dion i sar., 1994).

Cirkonijum dioksid stvara manje inflamacije u tkivu u poređenju sa drugim restaurativnim materijalima, kao što je titanijum. Ovakav rezultat je i studijski potvrđen. Zapaljenski infiltrat, mikrovaskularna gustina, kao i faktor ekspresije rasta vaskularnog endotela, viši je kod titanijumskih nadoknada (Degidi i sar., 2006). Takođe je veći nivo bakterijskih produkata. Cirkonijum dioksid može da reguliše i ekspresiju nekih gena, tako da se može smatrati i samoregulatornim materijalom koji modifikuje i promet ekstracelularnog matriksa (Carin i sar., 2004).

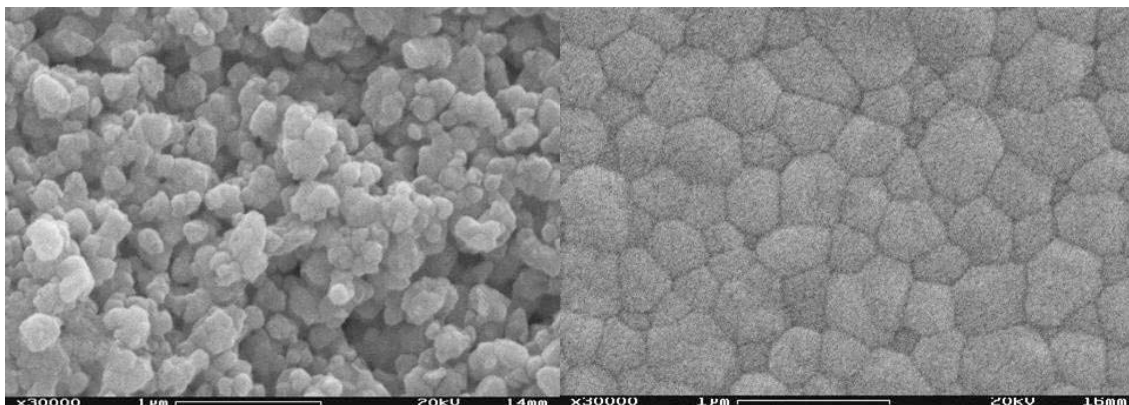
Iako cirkonijum dioksid dolazi iz prirode sa različitim primesama urana, torijuma ili radijuma, dokazano je da cirkonijum dioksid koji se koristi u svakodnevnoj praksi ima izuzetno male doze zračenja, koje nisu opasne i daleko su niže mereno u odnosu na one iz prirodne sredine (Covacci i sar., 1999). U istraživanju sa istim ciljem, upozorenje dolazi od autora kada je u pitanju biokompatibilnost, kao osobina koja je povezana sa tipom materijala. S tim u vezi je potvrđeno da je biokompatibilnost različita za različite tipove keramike, pa je tako većina keramika pokazala blagu, ali prihvatljivu citotoksičnost u poređenju sa kompozitnim materijalima i dentalnim legurama. Nešto veću citotoksičnost je pokazala litijum-disilikatna keramika (Regina i sar., 2003).

U polju stomatološke prakse upotreba cirkonijuma je kraća u poređenju sa titanijumom. Njena klinička upotreba počinje 1990. godine, a od tada se proširuju indikacijska polja za njenu upotrebu i radi se na njenoj komercijalizaciji. Prva cirkonijumska protetska nadogradnja kao transmukozna komponenta implantata predstavljena je 1997. godine (Zirabut®, Wohlwena Innovative, Zurich, Switzerland). Bela boja ovog materijala, promovisala ga je kao visko estetski biomaterijal, i radovi koji svedoče o boljim estetskim rezultatima u primeni implantološke i protetske terapije počinju da se objavljuju (Watkin i Kerestin, 2008). Određeni proizvođači u svrhu poboljšanja estetskog učinka primenjene terapije danas nude različite nijanse bele boje, jer osnovna bela boja keramike nekada daje neprirodan izgled, te lošiji

estetski učinak. Moderan cirkonijum–doksid ispunjava tri glavna zahteva moderne stomatologije: visoku otpornost, efikasnost i estetiku (Nelson i sar., 2010).

Za potrebe ove disertacije napravljeni su cirkonijum-dioksidni uzorci od IPS e.max ZirCAD blokova (Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein).

IPS e.max ZirCAD je presinterovan itrijum-stabilizovani tetragonalni cirkonijum polikristal (Y-TZP) u obliku bloka koji sadrži male količine itrijum oksida namenjen za obradu CAD/CAM tehnologijom. Postoje različite veličine blokova u zavisnosti od zone opterećenja i vrste restauracije koja se izvodi. Blok je bele boje, kredaste strukture i u presinterovanom stanju odlikuje ga porozna morfologija (50 %) (slika 6 a). Vrednost čvrstoće sirovog materijala je veoma mala, što omogućava brzu i laku obradu bloka na CAD/CAM sistemu u željeni oblik. Nakon oblikovanja, materijal se sinteruje u visokotemperaturnoj peći, koja je specijalno razvijena za oksidne keramike na temperaturi od 1500 °C. U toku procesa sinterovanja, koje traje 8 časova, kristali obrazuju finalnu tetragonalnu homogenu strukturu i dobijaju svoju konačnu čvrstoću od preko 900 MPa (slika 6 b). Ono što je veoma važno u toku procesa sinterovanja je, da gradijenti hlađenja i grejanja budu koordinisani sa parametrima procedure sinterovanja. Tokom procesa sinterovanja, zapremina materijala se srazmerno smanjuje (skuplja) za ~ 20 % u odnosu na prvobitnu veličinu. Ovo smanjenje zapremine je već uzeto u obzir tokom izrade nadoknade CAD/CAM tehnologijom. Hemijski sastav komercijalne keramike IPS e.max ZirCAD je dat u tabeli 1 (Völkel, 2006).



Slika 6. SEM prikaz mikrostrukture IPS e.max ZirCAD, a) morfologija površine loma sirovog materijala, pri uvećanju 30.000x; b) SEM prikaz sinterovane površine materijala (na 1420 °C, 20 min.) (Bühler, 2005 -2)

Tabela 1. Hemijski sastav komercijalne keramike IPS e.max ZirCAD (Bühler, 2005 -2)

Standardni sastav	maseni %
ZrO ₂	87 – 95
Y ₂ O ₃	4 – 6
HfO ₂	1 – 5
Al ₂ O ₃	0.1 – 1

Termički proces obrade materijala je presudan za obrazovanje mikrostrukture. Ako se proces zagrevanja precizno ne kontroliše, kao ishod će se javiti brojni neželjeni rezultati koji se često vizuelno ne mogu primetiti. Procesom sinterovanja, boja materijala se vidno menja i restauracija dobija blagu prozornost u odnosu na sirovi materijal. Nakon sinterovanja, poroznost materijala je svedena na minimum, što se može jasno videti na slici 6b. U potpunoj zgusnutoj strukturi jasno se mogu uočiti sinterovani tetragonalni kristali koji obrazuju homogenu strukturu IPS e.max ZirCAD materijala. Samim tim, i broj grešaka u strukturi je takođe sveden na minimum. Kombinacija visoke gustine, niske stope grešaka u strukturi i male veličine kristala (0.5 µm) rezultuju visoku čvrstoću materijala. Savojna čvrstoća Y-TZP (900 MPa) je superiorna u poređenju sa ostalim stomatološkim keramikama i daleko je veća od napona tečenja metalnih legura koje se koriste u stomatologiji. Ostale fizičko-mehaničke karakteristike materijala su prikazane u tabeli 2.

Tabela 2. Fizičko-mehaničke karakteristike komercijalne keramike IPS e.max ZirCAD (Bühler, 2005)

Fizičko-mehaničke karakteristike	IPS e.max ZirCAD
Koeficijent termičkog širenja (CTE)	10.75 ±0.25 10 ⁻⁶ K ⁻¹
Savojna čvrstoća	900 ±50 MPa
Tvrdoća HV	13050 MPa
Otpornost na lom	5.5 ±0.22 MPa·m ^{1/2}
Gustina	6.045 – 6.065 g/cm ³ ; 99.4 – 99.7 %
Srednja veličina kristala	0.52 ±0.05 µm
Hemijska rastvorljivost	< 10 µg/cm ²

Zahvaljujući svojoj velikoj čvrstoći, materijal je pogodan za primenu kod skoro svih indikacija koje su do sada bile rezervisane isključivo za protetske nadoknade ojačane metalnom osnovom. Materijal se koristi uglavnom za izradu zubne osnove koja se dalje fasetira

keramikom (IPS e.max Ceram, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein), kako bi se postigao odgovarajući prirodni estetski izgled nadoknade (slika 7).



Slika 7. Tročlani cirkonijum dioksidni most, a) sirov blok obrađen CAD-CAM sistemom, b) sinterovan most, presvučen fasetnom keramikom

U restaurativnoj stomatologiji, prirodni izgled zubnih nadoknada je od najveće važnosti. U tom pogledu, keramike na bazi silikata, posebno porcelani i staklo keramike, su mnogo bliže estetskom izgledu prirodnih zuba nego sinterovani Y-TZP materijali. Problem se može smanjiti upotrebom finijeg praha sa manjim procentom alumine (Al_2O_3) prilikom procesa sinterovanja. Zabeleženo je da se translucenost fiksnih proteza, izrađenih ovom vrstom praha, skoro poklapa sa onom kod prirodnih zuba (Heffernan, 2002; Mutone, 2008; Baldissara, 2010). Štaviše, dodavanjem gvožđa, titanijuma, cerijuma i nekih drugi oksida, u strukturu cirkonijuma, moguće je dobiti prirodnu nijansu zuba (Calés, 1998; Shah, 2008).

4. PREGLED LITERATURE

U ranim šezdesetim godinama prošloga veka *dr Brenemark* je, zahvaljujući temeljnim istraživanjima na polju interference titanijumskog implantata i koštanog tkiva, a kroz urastanje kosti u prostore između navoja i neravnina na površini implantata, uspostavio novi termin poznat kao oseointegracija. Ovaj termin izveo je iz latinske reči „os” (kost) i „integro” (obnavljanje), (Brenemark i sar., 1968). Njegov koncept na početku nije bio opšteprihvaćen, niti je tumačen kao klinički uspeh ili uopšte kao biloška mogućnost.

Definiciju oseointegracije dali su mnogi autori, među kojima su najznačajniji sledeći:

Albrektsson (1994) “Proces u kome je postignuta klinički asimptomatska rigidna fiksacija jednog aloplastičnog materijala i koja se održava u kosti u toku njegovog funkcionalnog opterećenja” (Albrektsson i Wennerberf, 2005).

Misch (1999) “Direktni kontakt živog koštanog tkiva sa površinom implantata koji je vidljiv na svetlosnom mikroskopu” (Misch i sar., 1999).

Nakon kliničke studije pod radnim nazivom „Toronto study” izvedene na pacijentima, od strane lekara sa Kanadskog Univerziteta, predvođenih dr Zarb-om i objavljenih rezultata, koncept oseointegracije postaje zvanično implementiran i prihvaćen od strane stručne javnosti u Severnoj Americi (Albrektsson i Wennerberf, 2005). U početku, široko prihvatanje koncepta oseointegracije titanijuma, dovodi i do implementacije novih terapijskih modaliteta u medicini, a koji su podrazumevali postavljanje titanijumskih struktura i šrafova sa ciljem sidrenja uglavnom facijalnih epiteza (Albrektsson & Wennerberf, 2005).

Naravno, koncept oseointegracije je trebalo i dalje da se raščlani i razjasni, te da se odgovori i na pitanje, da li oseointegracija podrazumeva apsolutni kontakt između čitave površine implantata i kosti, ili je interpozicija mekih tkiva prihvatljiva kao mogućnost? Tako je daljim razvojem ovog koncepta, ranih devedesetih godina prošlog veka uspostavljena nova definicija procesa oseointegracije, gde oseointegracija predstavlja ”proces u okviru koga se uspostavlja rigidna asimptomatska fiksacija aloplastičnog materijala u kosti i održava za vreme delovanja funkcijskog opterećenja” (Albrektsson i Wennerberg, 2005). Glavna prednost ove definicije ogleda se u njenoj kliničkoj prirodi.

Danas je opšte prihvaćeno da je oseointegracija neophodna za uspeh implantološke terapije, te je stoga predstavljala povod za izvođenje velikog broja kliničkih studija u proteklih 50 godina. Unapređenjem hirurških protokola kao i samih dentalnih implantata, u pogledu kompozicije materijala i dizajna, uspostavljen je predvidljiv tok i ishod implantološke terapije. Međutim, uspešnost i funkcionalnost dentalnih implantata su postali nedovoljan kriterijum za procenu kvaliteta terapije. Novi zahtevi počinju da uzburkavaju stručnu javnost, a oni se odnose upravo na estetski učinak primenjene terapije. On se u prvom redu odnosi na estetiku i zdravlje mekih tkiva koja okružuju područje postavljenog dentalnog implantata. Ovakav novi osvrt na područje implantološke terapije pokrenuo je beskonačni niz ispitivanja i kliničkih studija, koje se sprovode i danas.

U studiji Buser i saradnika. (Buser i sar., 2004) kao i sličnim ispitivanjima drugih autora (Schwarz i sar. 2007; Bornstein i sar., 2008), utvrđeno je da je ćelijska aktivnost i brzina koštane apozicije na površini hidro lnih *SLActive* implantata mnogo veća nego kod hidrofobnih *SLA* površina. Ove studije su pokazale da kontinuirano povećanje vrednosti stabilnosti implantata tokom perioda od šest nedelja nasuprot *SLA* implantatima kod kojih je uočen pad stabilnosti između druge i četvrte nedelje (Cochran i sar., 2002). Takođe, *SLActive* implantati prema sprovedenim studijama pružaju mogućnost ranog opterećenja nakon 3-4 nedelje (Ferguson i sar., 2006; Cochran i sar., 2002; Oates i sar., 2005)

Buser i saradnici su u studiji koja se bavila oseointegracijom *SLActive* implantata našli statistički značajno veći procenat koštane apozicije na površini hemijski modifikovanih implantata nakon druge, četvrte kao i osme nedelje od opterećenja (Buser i sar., 2004). Histološka i imunohistohemijska ispitivanja koja su na animalnom modelu sprovedli Schwarz i saradnici su pokazali da se već nakon dve nedelje od ugradnje implantata može uočiti pojave zrele adherirane novoformirane kosti na površini implantata (Schwarz i sar. 2007). Gotovo iste rezultate objavili su Bornstein i saradnici (Bornstein i sar. 2008). Srednja vrednost novoformirane kosti u kontaktu sa implantatom (*BIC%*) je bila statistički značajno veća kod *SLActive* implantata ($28.2\pm 7.9\%$) u poređenju sa *SLA* ($22.2\pm 7.3\%$) ($P<0.05$). Međutim ova razlika nije uočena nakon četvrte nedelje. Najveći porast apozicije kosti je registrovan između 2-4 nedelje (Bornstein i sar. 2008). Ovo potvrđuju Ferguson i sar. u svojoj studiji na životinjama (Ferguson i sar., 2006). Ovi autori su merili momenat sile potreban za odvrtnje implantata. Rezultati su pokazali da *SLActive* implantati imaju statistički značajno veći otpor na sile smicanja potrebne za odvrtnje implantata tokom ranih faza zarastanja. Vrednosti su 8–21% veće u odnosu na *SLA* implantate (Ferguson i sar., 2006).

Neki autori navode da se bolja mekotkivna integracija dešava u slučajevima primene dvofaznih hirurških protokola ugradnje implantata. Razlog za ovakav stav može se naći u činjenici da vezivno tkivo ima više vremena da se integriše na površinu implantata pre nego što uđe u kompetitivski odnos sa epitelnim ćelijama (Chehroudi, Gould, & Brunette, 1992). S druge strane, postojanje mikroprostora između protetske nadogradnje i tela implantata na nivou mekih tkiva može indukovati inflamaciju na tom mestu (Abrahamsson, i sar., 1998; Moon i sar., 1999). Ipak, danas je opšte prihvaćeno da ne postoji signifikantna razlika u integraciji mekih tkiva bez obzira na metodu primenjenog postupka hirurške ugradnje implantata. Tako, na primer, Abrahamsson i saradnici u eksperimentima na psima, postavljali su implant i protetsku nadogradnju upoređujući oba protokola ugradnje. Na svakom eksperimentalnom psu, postavljena su 3 implantata i prekrivena mukoperiostalnim režnjem, a protetska nadogradnja je postavljena 3 meseca kasnije (kontrolna grupa). U trenutku postavljanja protetske nadogradnje, na kontralateralnoj strani istih eksperimentalnih pasa ugradjena su po tri implantata, ali po principima jednofazne ugradnje, što je predstavljalo test grupu. Procena zdravlja mekih tkiva, kao i nivo koštanog tkiva, procenjivani su kliničkom i radiografskom analizom u narednih 6 meseci. Tokom ovog perioda akcenat je stavljen na sprovođenje striktno oralne higijene. Nakon 6 meseci, eksperimentalne životinje su žrtvovane i izvedena je histometrijska i morfometrijska analiza dobijenih uzoraka. Rezultati ovih eksperimenata su pokazali izostanak bilo kakve statistički značajne razlike u dve grupe ispitivanih uzoraka (Abrahamsson i sar., 1999).

U savremenoj implantologiji mikrodizajn površine implantata i njegova modifikacija ima značajnu ulogu. Implantatne površine su definisane i kao ključni element u reakciji čvrstog i mekog periimplantatnog tkiva sa implantatom (Newman i sar., 2007). Osnovni cilj modifikacije površine implantata je menjanje njegove prijemčivosti za koštano tkivo, odnosno njegove oseokoduktivnosti. Hrapava površina, kakva može da se dobije npr. plazma sprej nanošenjem titana, peskiranjem ili jetkanjem kiselinom, povećava dodirnu površinu kost - implantat i stimuliše prekursore osteoblasta što je dokazano porastom nivoa aktivnosti alkalne fosfataze i koncentracije osteokalcina. Tako, npr. kod implantata glatke površine, kontakt kosti i implantata iznosi prosečno 41.7%, kod TPS (titan plazma sprej) površine je to 48.95%, kod implatata obloženog hidroksiapatitom kontakt iznosi 57.9%, a kod SLA (sandblasted-low grip-acid etched) ili Ti-unite površine iznosi oko 68.5% (Newman i sar., 2007). Kako implantatna površina deluje na povećanje osteoinduktivnosti, ona neminovno utiče na proces oseointegracije, samim tim različite implantatne površine indukuju drugačiji obrazac koštanog metabolizma i time predstavljaju značajan faktor oseointegracije (Vlacić-Zischke i sar., 2011).

Uzimajući u obzir sve ove činjenice, sam proces formiranja periimplantatnih tkiva je osetljiv i zavisi od niza faktora. Kod starijih osoba smanjena je sklonost ka ćelijskoj deobi dok koštano tkivo gubi na svojoj elastičnosti i podložno je procesu atrofije i degeneracije.

U svojim eksperimentima Grossner i saradnici su otkrili da hrapavost površine obrnuto proporcionalno utiče na broj fokalnih adhezija (Grossner-Schreiber i sar., 2006). Ipak, efekat topografije površine na broj ćelijskih adhezija, zavisi i od vrste ćelija čija se adhezivna sposobnost ispituje (Hamilton, Chehroudi, i Brunette, 2007).

Brunette i Chehroudi, u svom istraživanju došli su do zaključka da topografija površine ispitivanog materijala, direktno utiče na promenu oblika ćelije što za posledicu ima modifikaciju genskih aktivnosti. Na žalost, uticaj površine na promenu ćelijskog oblika je vrlo složen proces, te je stoga malo poznato kako topografija suštinski utiče na procese genskih ekspresija. Tako, na primer, u kulturi humanih fibroblasta, kontakt ćelije sa mašinski obrađivanom površinom supstrata utiče na alteraciju oblika ćelije, regulaciju na nivou informacionog RNK molekula, kao i na stabilizaciju i sekreciju fibronektina (proteina ekstracelularnog matriksa).

Osim na koštano tkivo, ugradnja enosalnih implantata utiče i na meka tkiva oko implantata. Periimplantatna tkiva su tkiva koja okružuju dentalne implantate ugrađene u živa tkiva alveolarnog grebena gornje i donje vilice. Osnovna uloga ovih tkiva je da obezbeđuju potporu ugrađenom implantatu. Iz toga proističe jasna važnost klinički zdravog periimplantatnog tkiva kako bi se izbegle komplikacije koje se javljaju u ranoj fazi nakon ugradnje implantata i kasnije kada je implantat u funkciji. Periimplantatna tkiva obuhvataju tvrda (rezidualni alveolarni koštani greben gornje i donje vilice) i meka tkiva (pokretna i nepokretna meka tkiva koja pokrivaju rezidualni alveolarni koštani greben donje i gornje vilice (Perović, 2004).

Vezivno tkivo oko vrata implantata i protetske nadogradnje dugo je opisivano kao ožiljno tkivo, sa kvantitativnom predominantnošću kolagena, fibroblasta i vaskularnih struktura. Stoga je smatrano da se preobražaj periimplantne sluzokože dešava sporije nego što je to slučaj sa mukogingivalnim kompleksom oko prirodnog zuba, te stoga pokazuje slabiji regenerativni i reparatorni potencijal (Lindhe & Berlundh, 1998).

Moon i saradnici su detaljnije ispitivali periimplantno vezivno tkivo, analizirajući ćelijske deobe, transformacije i diferencijacije u okviru vezivnog tkiva u odnosu na njihovu udaljenost od površine dentalnog implantata. Oni su postavili 6 implantata kod svakog od 6 eksperimentalnih pasa. Nakon 3 meseca postavili su odgovarajuće protetske nadogradnje. U

narednih 6 meseci primenili su režim striktene oralne higijene i nakon toga su žrtvovali eksperimentalne pse u cilju detaljne histološke analize. Histološki preparati periimplantnog vezivnog tkiva su pokazali da njegove konstitutivne ćelijske jedinice u zoni širine od 200 μm variraju od površine implantata prema periferiji ispitivanog uzorka. Tako je ustanovljeno da se tkivo slično ožiljnom nalazi u eksternoj zoni ispitivanog uzorka, dok u zoni koja je bliža površini implantata ima više fibroblasta a manje kolagena. Iz toga su autori zaključili da taj segment vezivnog tkiva ima veći regeneratorni i reparatorni potencijal nego što se to nekada smatralo. Takođe su potvrdili da kolagena vlakna imaju paralelnu orijentaciju u odnosu na površinu implantata i nije ustanovljeno prisustvo perpendikularnih vlakana. Na osnovu prikupljenih činjenica izneli su i predlog da se periimplantno meko tkivo ne naziva gingivom (Moon i sar., 1999).

Schubach i Glauser su potvrdili većinu njihovih tvrdnji u naučnom radu publikovanom 2007. godine. Oni su uradili istraživanje na 5 pacijenata, kojima su postavili 12 titanijumskih mini-implantata, a odmah nakon postavljanja implantata postavili su cilindrične protetske nadogradnje dužine 4 mm. Sve protetske nadogradnje bile su izrađene od titanijuma, ali sa površinom koja je bila obrađena na tri različita načina. Tri ispitivane površine bile su: mašinski obrađivana površina implantata, kiselinom nagrizona i tretirana TiO_2 . Nakon 8 nedelja transmukoznog zarastanja, implantati su izvađeni sa slojem periimplantnog koštanog i mekog tkiva. Na dobijenim uzorcima izvršena je histološka analiza upotrebom svetlosne i skening elektronske mikroskopije. Nakon izvršene analize autori su prikazali histološku komplementarnost periimplantnog i peridentalnog mekog tkiva. Kod svih implantata periimplantna sluzokoža bila je sačinjena od epitelne i suprakrestalne vezivno tkivne „kragne”. Vezivno tkivo je bilo u direktnom kontaktu sa površinom implantata. Kolagena vlakna i fibroblasti su bili paralelno orijentisani u odnosu na površinu implantata i protetske nadogradnje. Takođe je ustanovljeno da kod sve tri ispitivane površine implantata, gusto upakovana vlakna u snopove imaju cirkumferencijalnu prostornu orijentaciju oko površine implantata, a posmatrano u horizontalnoj ravni, slično kao kod prirodnog zuba. Najupečatljivije otkriće iz izvedenog eksperimenta je činjenica postojanja funkcionalno orijentisanih vlakana, koja se pružaju manje ili više perpendikularno u odnosu na površinu kompleksa implant-protetska nadogradnja, ali samo kod površina koje su bile tretirane sa TiO_2 (Schubach & Glauser, 2007).

Takođe, postoje i drugi radovi koji ukazuju na prisustvo perpendikularno orijentisanih vlakana u odnosu na površinu implantata i protetskih nadogradnji. Tako su Steflik i saradnici opisali postojanje ne samo dvokomponentnog sistema veze (epitelno-vezivnog tkiva), već i

perpendikularnu orijentaciju vezivnih vlakana (Steflik i sar., 1990). U eksperimentu in vitro, Takata i saradnici su pokazali da površina bioaktivnih materijala, kao što su bio-staklo ili hidroksiapatit mogu dovesti do regeneracije periodontalnog ligamenta ukoliko ćelijske formacije porekla iz periodontalnog ligamenta mogu izvršiti repopulizaciju površine materijala. Takva ćelijska interakcija sa površinom materijala se ne može videti kod cirkonije i titanijuma (Takata i sar., 1994). Tako su Šreder i saradnici još 1981. godine objavili rezultate eksperimenta, gde su titanijumski implantati, plazmirane površine titanijumskim prahom, sa porama na površini u prečniku od 25 do 100 μm , pokazali prisustvo neinflamatornog vezivnog tkiva sa funkcionalno orijentisanim vezivnim vlaknima, pripojenim pod uglom od 90° u odnosu na plazmiranu površinu vrata implantata. Insercija vezivnih vlakana je bila toliko jaka da je pokušaj njihovog razdvajanja od površine implantata pre dovodio do odvajanja partikula plazmirane površine implantata nego li do odvajanja pripojenih vezivnih vlakana (Schroeder i sar., 1981). Ovakva otkrića su podstakla Deporeter-a i njegove saradnike da sprovedu istraživanje pripoja vezivnih vlakana na površinu protetske nadogradnje sa površinom koja je bila na dva načina obrađivana. Tako je apikalni deo površine protetske nadogradnje bio nahrapavljen, dok je koronarni deo bio visoko ispoliran. Hrapavost apikalnog dela je trebalo da pokaže bolji pripoj vezivnih vlakana u okviru vezivnog tkiva, dok je glatkoća koronarnog dela površine protetske nadogradnje trebalo da pokaže manji stepen plak prijemčljivosti, a samim tim i veći stepen pripoja epitelnih ćelija. Ovaj eksperiment je pokazao poražavajuće rezultate. Hrapava površina protetske nadogradnje je dovela do brze kolonicazije mikroorganizama što je za krajnju konsekvencu imalo inflamatorne procese u periimplantnom tkivu i, na kraju, gubitak implantata (Deporter i sar., 1986).

Ipak, pripoj vezivnih vlakana doprinosi snazi pripoja vezivnog tkiva u regiji vrata implantata. Mnogi autori sugerišu da taj vezivnotkivni deo oko vrata implantata sprečava urastanje epitela i značajno doprinosi boljoj stabilnosti i funkciji mekih tkiva oko implantata. Squier i Collins su još 1983. godine pokazali da hrapavost površine u iznosu od $3\mu\text{m}$ može biti idealna za penetraciju vezivnog tkiva u pore hrapave površine, te da ta penetracija sprečava urastanje epitela (Squier & Collins, 1981). Takođe je značajno napomenuti da su mnoga in vivo istraživanja veze mekih tkiva sa površinom dentalnog implantata sprovedena na implantatima postavljenim u zoni keratinizovane sluzokože. Ta keratinizovana sluzokoža svakako predstavlja pozitivan faktor u održavanju zdravlja mekih tkiva oko implantata (Myshin & Wiens, 2005). Sa druge strane nema mnogo radova na temu analize anatomo-histoloških karakteristika veze mekih tkiva sa površinom implantata kada su implantati postavljeni u zonu nekeratinizovane, mobilne sluzokože.

Za opstanak implantata, od velikog značaja je i stanje periimplantatnog mekog i koštanog tkiva. Funkcija koštanog tkiva je da prihvata, fiksira implantat, amortizuje i raspoređuje sile u aktu žvakanja. Meka tkiva oko implantata zatvaraju komunikaciju između usne duplje i periimplantatnog koštanog tkiva, sprečavajući prodor pljuvačke i antigena iz usne duplje prema ležištu implantata u kosti. Oko vrata implantata formira se prsten mekog tkiva kao dobra barijera koja zavisi od stanja gingive. Morfološki i funkcionalno veza između mekog tkiva i implantata se razlikuje od tkiva oko prirodnog zuba (periodoncijum) (Linkevicius i Apse, 2008).

Meka tkiva oko implantata zatvaraju komunikaciju između usne duplje i periimplantatnog koštanog tkiva, sprečavajući prodor pljuvačke i antigena iz usne duplje prema ležištu implantata u kosti. Oko vrata implantata formira se prsten mekog tkiva bez urastanja kao dobra barijera koja zavisi od stanja gingive. U inflamaciji, prostor između epitelnih ćelija pripojnog epitela postaje širi i redukuju se zaštitni efekti bazalne lamine.

Sulkusni prostor je nastao adheriranjem epitela slobodne gingive uz površinu vrata implantata, stalno se spira periimplantatnom tečnošću. Periimplantatna tečnost (PICF) koja ispunjava periimplantatni sulkus je transudat vaskularne mreže mukoze kroz tanak sulkusni epitel. To je inflamatorni eksudat koji se nalazi i u fiziološkim i patološkim uslovima i predstavlja protok tečnosti kroz pripojni epitel u periimplantatni sulkus. Komponente ove tečnosti potiču iz seruma, epitela i vezivnog tkiva gingive, kao i iz inflamatornih ćelija i bakterija koje se nalaze u periimplantatnom sulkusu i okolnim tkivima. Važni sastojci su pokazatelji zapaljenja, a uključuju enzime i citokine, kao i produkte razgradnje tkiva (Armitage, 2004).

Inflamatorni medijatori koji su prisutni u periimplantatnim tkivima mogu se dijagnostikovati merenjem njihove koncentracije u periimplantatnoj tečnosti (PICF) i predstavljaju odraz fiziološke interakcije epitela gingive i lokalnih leukocita na mikroorganizme dentalnog plaka i oralne flore. Uređaj kojim se precizno sakuplja i određuje volumen periimplantatne tečnosti je Periotron (HAR-6000). Za analizu ove tečnosti potrebno je na pogodan način izvršiti njeno sakupljanje. Potencijalna dijagnostička vrednost i njena dinamička priroda su opisivane još od druge polovine dvadesetog veka. Brill i Bjorn (1959) su u to vreme pokazali da filter papir postavljen u gingivalni sulkus eksperimentalnih životinja može da se oboji bojom koja je ubrizgana u sistemski krvotok. što je ukazivalo na protok tečnosti kroz tkiva i izlazak tečnosti kroz gingivalni sulkus (Brill i Bjorn, 1959). Analizom ove tečnosti može se pratiti intenzitet aktivnosti patološkog procesa uz mogućnost rane detekcije

oboljenja. Uloga PICF je prevashodno odbrambena u odnosu na tkiva oko zuba ili implantata. Periimplantatna tečnost spira periimplantatni sulkus "čisti" ga od potencijalno štetnih ćelija i molekula. Imunoglobulini i druge antibakterijske supstance prisutne u PICF imaju antibakterijsku zaštitnu ulogu oralne sredine, dok plazma proteini PICF ojačavaju adheziju epitela za periimplantatno tkivo. U cilju praćenja stanja parodontalnog i periimplantatnog tkiva, analizirana je pljuvačka i gingivalna tečnost i kod rezultata analize prioritet se ipak daje gingivalnoj tečnosti uzetoj u neposrednoj blizini implantata, jer ona direktno odražava stanje ispitivanog periimplantatnog tkiva a poreklom je iz seruma koji odgovara inflamatornom eksudatu. Ova tečnost sadrži delove i produkte lokalnog metabolizma. Biomolekuli koji se usvajaju kao markeri stanja parodontalnih/peri-implantnih tkiva su podeljeni u tri grupe (Armitage, 2004):

- enzimi poreklom od domaćina i njihovi inhibitori,
- zapaljenski medijatori i modifikatori imunološkog odgovora i
- produkti tkivne destrukcije.

Prepoznavanje enzima i drugih indikatora odgovora domaćina u gingivalnoj tečnosti je započeta u studijama sedamdesetih godina prošloga veka.

Loos i Tjoa su dali pregled potencijalnih dijagnostičkih pokazatelja parodontopatije u gingivalnoj tečnosti. Tu spadaju alkalna fosfataza (AF), beta- glukuronidaza (β G), katepsin B (KB), kolagenaza 2 (matriksna metaloproteinaza – MMP-8), gelatinaza (MMP-9), dipeptil-peptidaza (DPP) II i III i elastaza (Loos i Tjoa, 2005).

Poslednjih desetak godina ispituje se uloga citokina kao korisnih dijagnostičkih indikatora koji bi mogli predstavljati važnu dopunu kliničkim parametrima, a koji bi ukazivali na prisustvo ili odsustvo periimplantatnog oboljenja, bili indikator odgovora na terapiju i ukazivali na potrebu za dodatnim medicinskim tretmanom (Cajado i sar., 2010; Duarte i sar., 2009; Garlet i sar., 2006; Schierano i sar., 2000; Walschus i sar., 2012).

Bez obzira na superiornost fizičkih, mehaničkih i estetskih karakteristika cirkonije, ona ipak nije savršeni materijal. U nedavnom istraživanju Manicone i sardanici, navode da bez obzira na današnju frekventnu upotrebu cirkonije u svrhe izrade protetskih nadogradnji na implantatima i dalje nema dovoljno istraživačkih rezultata koji bi takvu primenu u potpunosti opravdali i bezrezervno prihvatili (Manicone i sar., 2007). Tako je 2001. godine registrovana velika serija propalih femoralnih cirkonijumskih implantata što je donekle kompromitovalo čvrsto uverenje u svetlu budućnost ovog materijala kada je u pitanju njegova bezrezervna

primena u stomatološkoj i medicinskoj praksi. Kao glavni uzročnik ovakvih negativnih ishoda u terapiji navodi se fenomen starenja materijala. Međutim, do danas nije precizno ustanovljeno na koji način se to starenje odigrava niti kada tačno dovodi do propadanja materijala. Takođe, ne postoje ni podaci o tome kako ga zaustaviti ili prevenirati (Clarke i sra., 2003). Chevalier je napravio detaljan pregled dosadašnjih saznanja o procesu starenja cirkonije i kao rezultat toga izrazio je apostrof na pravilan način obrade i rukovanja materijalom za vreme izrade odgovarajuće nadoknade. On je sačinio listu preporuka koje se odnose na kriterijume proizvodnje implantata i njima pripadajućih delova od cirkonije (Chevalier., 2006). U polju stomatologije svega nekoliko kliničkih studija je izvedeno na temu upotrebe cirkonije kao materijala za protetske nadogradnje na implantatima. Tako su Glauser i saradnici izveli takvu studiju, gde su postavili 57 titanijumskih implantata na 27 pacijenata. Nakon završenog perioda oseintegracije, izvršili su protetsku rehabilitaciju pacijenata postavljanjem cirkonijumskih protetskih nadogradnji i cirkonijumskih krunica. Pacijente su opservirali periodično u naredne 4 godine. Nakon isteka ovog perioda objavili su izveštaj sa rezultatima kliničke studije. U izveštaju su naveli da nije ustanovljena fraktura niti jedne protetske nadogradnje, niti krunice, ali je postojala fraktura dva šrafa koji su povezivali protetsku nadogradnju sa implantatom. Takođe, na dve krunice je ustanovljeno odlamanje incizalne ivice (Glausser i sar., 2004).

Istoimeni autori su u svojim eksperimentima dobili povoljan odgovor mekih tkiva na primenjenu terapiju kao i uobičajeni nesignifikantni gubitak koštanog tkiva oko implantata nakon isteka opservacijskog perioda od 4 godine. Ipak dobijeni rezultati se moraju prihvatiti sa izvesnom rezervom, obzirom na činjenicu da je 33,3 % pacijenata odustalo od učestvovanja u sprovedenoj studiji (Glausser i sar., 2004).

Kada je u pitanju formiranje dentalnog plaka na površinama protetskih nadogradnji, za istu hrapavost materijala, cirkonija pokazuje bolje rezultate nego titanijum (Scarano i sar., 2004). Degidi i saradnici su ispitivali stepen inflamatornog odgovora u periimplantnim mekim tkivima i upoređivali su cirkonijumske i titanijumske protetske nadogradnje. Nakon izvedenih in vivo eksperimenata, koji su podrazumevali uporedno postavljanje titanijumskih i cirkonijumskih protetskih nadogradnji, te njihovu kliničku opservaciju nakon 6 meseci od postavljanja i zarastanja mekog tkiva, ustanovili su da titanijum statistički značajno više indukuje infalamatorne odgovore u mekom tkivu u poređenju sa cirkonijumom. Rezultati su iskazani u vrednostima izmerenog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) i ekspresije sintaze azotnog oksida, kao i kvalitativnih karakteristika zapaljenskog infiltrata, izražajnosti proliferativnih aktivnosti celularnih komponenti i gustine mikro krvnih sudova (Degidi i sar., 2006).

Iako je kod ispitivanih parametara cirkonija pokazala bolje rezultate, materijal ipak ima izvesne nedostatke u domenima primene u oblasti dentalne implantologije. Proizvodnja cirkonijumskih suprastruktura je i dalje daleko skuplja u odnosu na titanijumske i cirkonijumske suprastrukture nisu dostupne kod svih implantoloških sistema (Chevalier, 2006).

Kada je upotreba cirkonijumskih protetskih nadogradnji u pitanju, još jedno pitanje dugo je otvoreno. Kako se dugoročno ponaša cirkonijum koji je permanentno izložen cirkulaciji i uticaju fluida u usnoj šupljini (Swab, 1991)? Takođe kada je cirkonija direktno prekrivena dentalnom keramikom, u literaturi je opisana česta fraktura dentalne keramike i ustanovljeno je da je taj nedostatak posledica slabe veze između cirkonijumskog kora i pokrovne dentalne keramike (Aboushelib i sar., 2007). Obzirom na čvrstoću cirkonije moguća su habanja materijala kao posledica trenja na nivou platforme za fiksiranje protetske nadogradnje u implantatu koja je najčešće heksagonalnog i oktagonalnog profila (Brodbeck, 2003). Ovo trošenje može dovesti do lagane rotacije protetske nadogradnje u kralnom modulu vrata implantata što za posledicu ima odvrtnje protetske nadogradnje ili gubitak šrafa (Binon i MvHugh, 1996; Binon, 1996). Zahvaljujući ovakvim saznanjima danas postoji protetska nadogradnja od cirkonije, specifičnog dizajna koji onemogućava nastanak ovakve pojave (ZiReal® post, Biomet 3i). Ovakva protetska nadogradnja podrazumeva postojanje titanijumske baze koja je fuzionisana za cirkonijumsku kapicu. Svrha ovakvog dizajna je postizanje neposrednog odnosa dva istorodna materijala, na mestu veze protetske nadogradnje i implantata, a u cilju anuliranja fenomena trošenja materijala zbog trenja koje se javlja u funkciji implantološkog kompleksa, a koji čine implant i protetska nadogradnja (Brodbeck, 2003). Dugoročnost spoja titanijumske baze i nadovezujućeg cirkonijumskog kora, predstavlja i dalje pitanje na koje treba dati odgovor daljim istraživanjima u toj oblasti.

Takođe iz ovog razloga dizajniran je još jedan konstrukcioni tip implantata, kod koga su telo implantata i transmukozna komponenta neodvojivo povezani. Implant je od titanijuma i na njemu postoji fuzionisana cirkonijumska transmukozna komponenta. Čitava konstrukcija implantološkog sistema je slična Štraumanovim ITI implantatima, sa tom razlikom što su titanijum i cirkonijum objedinjeni u kompleksu implantata i protetske nadogradnje (TBR Z1®, Sudimplant, Toulouse, France). Endosealni deo implantatnog kompleksa izrađen je od peskiranog titanijuma, dok je transmukozna komponenta izrađena od cirkonije. Ovakav dizajn omogućava eksploataciju najboljih karakteristika materijala na mestima gde je to poželjno (Masini, 2005). Na ovaj način sprečava se habanje titanijuma od strane odvojene cirkonijumske protetske nadogradnje na mestu njihovog spoja tj. kontakta. Takođe, važno je napomenuti da se ovakvim dizajnom izbegava i formiranje mikro-prostora na nivou mekih tkiva, između

implantata i protetske nadogradnje. Kada je u pitanju hiruška tehnika ugradnje, primenjuje se jednofazna ugradnja implantata, što sa svoje strane simplifikuje proceduru izrade definitivne protetske nadoknade zuba.

Imajući u vidu sve navedene činjenice vezane za cirkoniju, ona nedvosmisleno predstavlja atraktivan materijal u svakodnevnoj stomatološkoj i implantološkoj praksi. Naravno, pitanja trajnosti materijala i njegovog starenja u funkciji vremena, najpodesniji način obrade materijala, moguće habanje metalnih delova sa kojima je u aktivnom odnosu, veza sa fasetnom keramikom i dalje ostaju bez preciznog odgovora. Da bi se zaključila priča vezana za široko područje implementacije cirkonije u različitim oblastima stomatologije neophodna su brojna istraživanja. Kada su u pitanju integracije mekih tkiva na površine cirkonijumskih elemenata, takođe postoji deficit u pogledu broja izvedenih studija, eksperimenata, te dobijenih rezultata i preporuka.

Poslednjih nekoliko decenija cirkonijum se u velikoj meri koristi kao zamena za metal u različitim oblastima. Prvi proboj kliničke upotrebe Y-TZP keramike, je uvela francuska kompanija *Ceramiques Techniques Desmarquest* (St. Gobain) 1990. godine. Zahvaljujući radu tima, predvođenog *Calés-om* i *Christel-om* (Christel, 1989) Y-ZTP materijal je dodat u listu biokeramičkih materijala visokih performansi. Uglavnom se koristio za izradu pojedinih delova veštačkog kuka, što ujedno predstavlja i prvu primenu cirkonijuma kao biomaterijala u medicini. Naime njegova velika čvrstoća, otpornost na pritisak kao i visok modul elastičnosti doveli su dotle da može apsolutno da parira mehaničkim karakteristikama metala. Mimo toga, cirkonijum je biokompatibilan, što znači da ne izaziva nikakve iritacije niti alergijske reakcije u kontaktu sa tkivima, što mu omogućava kako primenu u medicini (veštački kukovi, slušni aparati i sl.), pa i u stomatologiji.

Prva upotreba cirkonijuma u stomatologiji je bila prisutna u izradi zubnih nosača (kočića), fiksnih proteza i dentalnih implanata, i vrlo često se u literaturi moglo naći na termin „beli čelik“ (Sandhaus, 1994, Garvie, 1975). Međutim, pravi proboj materijala u estetskoj stomatologiji je došao sa razvojem CAD/CAM tehnologije (Piconi, 2008). Upotreba cirkonijuma u kombinaciji sa CAD/CAM sistemima se sada sve više širi i razvija kako zbog odličnih karakteristika novih cirkonijumskih materijala tako i zbog preciznosti i brzine izrade koju donosi nova tehnologija izrade. Takav način izrade nadoknada, omogućava savršeno prijanjanje krunica i mostova uz gingivu te se tako pacijentima obezbeđuje odličan kvalitet, udobnost i dugotrajnost nadoknada, u svim zonama opterećenja. Međutim, treba napomenuti

da u pogledu njegove hidrotermalne izdržljivosti, materijal do nekog obima ima slabije odlike nego metali (Lange, 1986, Sato, 1985).

Različite studije su pokazale da čisti Y-TZP je više podložan t→m transformaciji u toku starenja materijala na temperaturnom opsegu od 70-250°C, u vlažnom okruženju. Rezultat je gubitak čvrstoće. Javlja se jedan vid korozije, koji je sličan onim koji se javlja kod metala. Posledično, cirkonijum takođe odlikuju metalna svojstva u ovom pogledu. Dodavanjem dopunskih agenasa, kao što su Al₂O₃ i CeO₂ u malim količinama, ova negativna svojstva Y-TZP su značajno poboljšana u toj meri, da postaju skoro zanemarljiva (Sato, 1986).

Kada je u pitanju hrapavost, ili uopšteno topografija površine implantata u literaturi nema istovetnih zaključaka. Logično je očekivati da ukoliko se poveća hrapavost površine implantata to će rezultirati i povećanjem kontaktne površine implantata na kojoj se očekuje formiranje novog koštanog tkiva. Dosadašnjim istraživanjima još nije utvrđena optimalna hrapavost površina za osteogenu reakciju. U literaturi optimalne vrednosti parametra srednjeg aritmetičkog odstupanja apsolutne vrednosti profila hrapavosti kreću se od Ra = 1-2 μm pa sve do Ra = 5-7 μm. Površinska hrapavost vrednosti Ra do čak 10 μm teoretski se može smatrati povoljnom u pogledu oseintegracije jer i same ćelije koje učestvuju u tom procesu se dimenzionalno uklapaju u taj raspon (Han i sar., 2010; Wennerberg i Albrektsson, 2000).

Nakon ugradnje implantata, dešava se fenomen u stručnoj literaturi definisan kao „trka za površinu” između proteina, ćelija domaćina i bakterija (Gristina, 2004). Da bi ćelija adherisala na površinu bilo kog supstrata mora da dođe do ispoljavanja fizičkog fenomena površinskog napona (Brunette & Cherorudi, 1999). Jedinica mere za površinski napon je N/m. Eksperimentalno je ustanovljeno da površinski napon od 0.02 do 0.03 N/m, predstavlja najmanju moguću vrednost koja uslovljava ispoljavanje biološke adhezivnosti. Stoga, materijali koji poseduju veće vrednosti za površinski napon, promovisu bolju biološku adheziju (Baier, 1988). Niske vrednosti energije površine, tj. površinskog napona su posledica fizičke i hemijske kompozicije površine materijala. Kada su dentalni implantati u pitanju, na osnovnu kompoziciju površine materijala mogu uticati procesi njegove fabrikacije, obrade, sterilizacije ili manipulacije u toku ugradnje (Brunette & Chehroudi, 1999). U prošlosti su predstavljeni različiti načini poboljšanja karakteristika površine dentalnih implantata, a u cilju promovisanja procesa oseintegracije. Prvo su uvedeni makro-retentivni elementi, kao što su navoji različite debljine, visine i nagiba, sinterovana perla tehnologija i pres-fit dizajn. Zatim je stabilnost implantata povećavana sa mikro i nano modifikacijama površine. Te modifikacije bile su mehaničke ili hemijsko-biološke, a sa ciljem promene ćelijskih aktivnosti na površini materijala

(C.M. Stanford, 2006). Nekada, implantati su imali ili blago ili ekstremno hrapavu površinu. Ekstremno hrapava površina je karakteristična za plazmirane implantate. Danas, većina modernih dentalnih implantata ima umereno hrapavu površinu sa vrednostima Ra između 1 i 2 μm (Albrektsson & Wennerberg, 2005). Peskiranje je uobičajena procedura za postizanje odgovarajuće hrapavosti površine dentalnog implantata. Na ovaj način se postiže vrednost prosečne hrapavosti materijala (Ra) od 2,4 μm . Komparacije radi, mašinski obrađivana površina titanijuma ima vrednost Ra od 0,8 μm (Di Carmine i sar., 2003). Drugi način modifikacije hrapavosti površine je nagrivanje kiselinom. Na ovaj način se menja hrapavost površine na nanometarkoj skali i omogućava se prezervacija makro i mikro-retentivnih područja površine implantata. Tako, kombinacijom specifičnih makro, mikro i nanotopografskih modifikacija optimizuje se površina dentalnih implantata u domenu celularnih aktivnosti. Isključivo osvrtnje na hrapavost površine dentalnog implantata ne daje dovoljno informacija u pogledu uspešnosti implantološke terapije, ali svakako na nju bitno utiče. Hrapavost materijala utiče kako na koštanu tako i na mekotkivnu integraciju dentalnih implantata (Leuer i sar., 2001).

Međutim, načini na koje parametri hrapavosti i morfologije i topografije površine utiču na mehanizme integracije su vrlo kompleksni i u daljem tekstu će kroz nekoliko primera to biti objašnjeno. U većem broju in vitro istraživanja pokazalo se kako se povećanjem hrapavosti može uticati na bolju diferencijaciju osteoblasta uz istovremeno smanjivanje osteoklastne aktivnosti (Lossdorfer i sar., 2004; Anselme i sar., 2000; Sader i sar., 2005). Doduše, prema tim istim, ali i drugim istraživanjima proliferacija ćelija je povećanjem hrapavosti u određenoj meri bila kompromitirana ili u najboljem slučaju bez značajne promene (Mustafa i sar., 2001). Kako su spomenuta istraživanja (zbog načela etike) rađena uglavnom in vitro, u obzir nije uzeta inicijalna reakcija trombocita, odnosno uticaj hrapavosti i topografije površine na njihovu aktivaciju u smeru procesa zarastanja – odnosno na otpuštanje adekvatnih faktora rasta. Najbližije što je u tom smeru ispitano je vezivanje odgovarajućih proteina na glatkim i hrapavijim površinama uzoraka legure Ti6Al4V (Deliggiani i sar., 2001; Sela i sar., 2007). U navedenim istraživanjima pokazalo se kako je i povećanjem površinske hrapavosti i povećanjem trodimenzionalnosti površinske topografije ostvarena veća adsorpcija proteina. Pri radu na modifikaciji površinske hrapavosti u obzir treba uzeti i metodu kojom se ona čini. Primenom hemijskih sredstava, kao to je npr. nagrivanje, ostvarena je čvršća veza s koštanim tkivom in vitro nego u slučaju mehaničke obrade (npr. peskarenje i sl.) (Wennergberg i Albrektsson, 2009).

Mehaničkim tretiranjem površina, a potom brušenjem, topografija je karakteristično

obeležena usmerenim paralelnim brazdama u koje će se smeštati ćelije. Od brazde do brazde ćelije ostaju fizički odvojene, bez mogućnosti međućelijske komunikacije te ih je posledično manje po jedinici površine (Chien i sar., 2008). Posebnu pažnju treba obratiti i na to da se sa svakim značajnijim povećanjem površine implantata (povećanjem hrapavosti iste) povećava i otpuštanje metalnih iona u okolna tkiva, a u tom smislu, po podacima iz literature, čak ni titan nije bezopasan (Han i sar., 2010).

U *in vivo* studiji, koju su izveli Wenneberg i saradnici, nije dokazan uticaj hrapavosti površine materijala na zdravlje mekih tkiva i histološku strukturu. U okviru eksperimenta odabrana je grupa pacijenata sa izrađenim fiksnim protetskim nadoknadama na implantatima. Protetske nadoknade su uklonjene i postavljene su protetske nadogradnje različite hrapavosti površine. Kod svakog ispitanika postavljeno je 5 protetskih nadogradnji: jedna kontrolna protetska nadogradnja, mašinski obrađena i 4 hrapavije protetske nadogradnje, nahrapavljenjem peskiranjem ili mašinskim putem. U toku sledeće posete, izmerena je količina akumuliranog plaka i evaluiran je stepen marginalnog krvarenja desni. Takođe uzet je i uzorak tkiva za histološku analizu. Nakon zvršetka eksperimentalnih radnji, protetske nadoknade su vraćene na implantate. Iako je profilometrijska analiza pokazala signifikatnu razliku u topografiji površine 5 različito obrađivanih protetskih nadogradnji, nije ustanovljena signifikatna razlika u pogledu stepena krvarenja desni i količine akumuliranog plaka, između 5 eksperimentalnih grupa ispitivanih protetskih nadogradnji na implantatima (Wennerberg, 2003). U sličnoj eksperimentalnoj studiji Bauhammers i saradnici su ispitivali pripoj epitelnih ćelija na materijalima različite hrapavosti površine i u rezultatima eksperimenta su izveli analogni zaključak (Baumhammers, 1978). *Di Carmine* i saradnici su u sličnom eksperimentalnom domenu pokazali da ne postoji statistički značajna razlika u kvantifikacijskom stepenu adhezije epitelnih ćelija na površinama mašinski obrađivanog I peskiranog titanijumskog uzorka. Međutim, epitelne ćelije su pokazale tendenciju ka adhezivnom prekrivanju veće površine materijala kada su bili u pitanju peskirani uzorci. Pored prekrivanja veće površine uzorka, ćelije su ispoljile duge razgranate filopodije koje su intimno nalegale na površinu materijala. Kada je u pitanju mašinski obrađivani titanijum, to nije bio slučaj. Ovi histološki fenomeni su odgovorni za stvaranje jačeg adhezivnog spoja ćelije i materijala. Zaključak je bio da hrapavost materijala možda ne utiče presudno na kvantifikacijski stepen adhezije epitelnih ćelija, ali svakako utiče na kvalitet ostvarenih ćelijskih veza (Carmine, 2003). Nausprot rezultatima ovih eksperimentalnih studija, Baharloo i saradnici su u svojim eksperimentima pokazali, da progresivno umanjeње hrapavosti površine ispitivanih uzoraka dovodi do progresivnog uvećanja broja celularnih adhezija epitelnih ćelija. U svojoj studiji su

koristili pet različitih substrata: plastiku za kulturu ćelija (TCP), TCP prekriven titanijumom (TCP-Ti), polirani titanijum (P), kiselinom nagrizan titanijum, peskiran titanium (B), i peskiran pa kiselinom nagrizan titanijum (SLA). Prosečna hrapavost površine ispitivanih materijala bila je: 0.58 μm za AE, 5.09 μm za B, 4.33 μm za SLA, u poređenju sa 0.06 μm za P. Ćelije su u kulturi uzgajane 5 dana. U intervalu između trećeg i petog dana, na glatkijim površinama materijala (TCP, TCP-Ti i P), ustanovljeno je naglo povećanje broja ćelijskih adhezija. Nausprot tome, na hrapavim površinama u istom vremenskom intervalu, nije ustanovljena razlika u pogledu broja ćelijskih adhezija, zaključno sa petim danom od početka trajanja eksperimenta (Baharloo, 2005). Imajući u vidu nekompletnost informacija vezanih za korelacijski odnos hrapavosti površine materijala i stepen ćelijskih adhezija epitelnih ćelija, fibroblasta i bakterijskih ćelija, nameće se potreba za daljim istraživanjima u budućnosti na ovu temu.

Prilikom pregleda literature, učeno je da veliki broj autora poklanja veliku pažnju različitim analizama površinske hrapavosti bezmetalnih keramičkih sistema, sa akcentom na promenu hrapavosti usled tretiranja površina različitim završnim obradama. Hrapavost ima i veliki uticaj na estetski izgled površine samog materijala kao i promeni boja na restauraciji, sekundarnog karijesa i gingivalne iritacije, i habanju susednih i suprotnih kontaktnih površina zuba. Poznato je da se pri većoj hrapavost od 0.2 mm stvaraju povoljniji uslovi za veću pojavu zubnog plaka i karijesa (Bollen, 1997). S druge strane, glatka površina zubne nadoknade osigurava udobnost pacijenta i olakšava oralnu higijenu (Ono, 2007; Jefferies 2007; Cavalcante 2009). Neadekvatno poliranje kontaktne površine restauracije može dovesti do zaostale površinske hrapavosti, što direktno narušava mehaničke i estetske karakteristike kontaktne površine samog materijala (Morgan, 2004; Lu, 2005; Kantorski 2009). Kod pojedinih keramičkih materijala, pri različitim završnim obradama, koncentracija kristala se znatno razlikuje u površinskom sloju u odnosu na unutrašnju strukturu materijala, čime se značajno utiče i na samu čvrstoću materijala (Yondem, 2011).

Mnoge studije su se do sada bavile poređenjem završnih obrada materijala poliranjem, glaziranjem ili brušenjem (Bottino, 2006; Sarac, 2006; Tholt de Vasconcellos, 2006; Yondem, 2011; Brentel, 2011; Boaventura, 2013; Rashid, 2014; Pantić, 2015a). Treba napomenuti da se u estetskoj stomatologiji uvek teži da završna obrada keramičkih materijala bude što finija. Štaviše, dobro ispolirana površina nadoknade može poboljšati ukupnu snagu keramičke restauracije (Chu, 2000). Procedurom poliranja moguće je ukloniti i određena površinska oštećenja, koja su nastala tokom procesa izrade zubne nadoknade. Mnogi autori su koristili različite procedure i sredstva za poliranje, kako bi postigli što bolje rezultate pri završnoj obradi

(Martínez-Gomis, 2003; Al-Shammery, 2007; Odatsu, 2013). Upotreba dijamantske paste za poliranje keramičkih nadoknada u estetskoj stomatologiji predstavlja uobičajenu praksu (Camacho, 2006; Haywood, 1988). Ove paste obezbeđuju efikasno poliranje, i njihova upotreba se preporučuje u brojnim situacijama. Gumice i četke za poliranje, u kombinaciji sa abrazivnim pastama različitih granulacija, najčešće su korišćene kliničke procedure za pomenutu završnu obradu (Sarıkaya, 2010).

Pored poliranja, kao završna obrada koristi se i postupak glaziranja, u vidu nanošenja prevlake na površinskom sloju keramičkih nadoknada. Njena osnovna namena je da smanji poroznost i površinsku hrapavost samog materijala i poboljša estetski izgled nadoknade u vidu visokog sjaja (Aksoy, 2006; Cheung, 2002; Mehulic, 2010; Haralur, 2012; Štefančić, 2013). Međutim, pojedine studije su potvrdile da glazura svojim prisustvom na površinskom sloju keramike ne poboljšava čvrstoću samog materijala (Asai, 2010; Fairhurst, 1992). Kawai je u svojoj studiji došao do zaključka da su glazirane površine mnogo podložnije formiranju zubnog plaka u poređenju sa poliranim zubnim restauracijama (Kawai, 2000). Do istog zaključka došao je i Rašid koji je takođe u svojoj studiji poredio polirane i glazirane površine (Rashid, 2012). Poznato je da proces glaziranja, zbog neravnomernog nanošenja sloja glazure, dovodi do pojave površinske nepravilnosti u vidu valovitih površina i pojave gasnih mehurova, što je ujedno i posledica stvaranja veće akumulacije bakterija i ostalih neželjenih supstanci na samoj površini. Gasni mehurovi nastaju kao posledica zarobljenog vazduha između površine osnovnog materijala i formiranog sloja glazure tokom procesa pečenja i jasno se mogu uočiti na slikama 3D topografija, kod svih ispitivanih glaziranih materijala. Iako su polirane površine sklone pojavi mikro-pukotina, potvrđeno je da one bitno ne utiču na prosečnu vrednost parametra hrapavosti (Ra) ili količinu akumulacije zubnog plaka (Patterson, 1992). Skot je u svom istraživanju predstavio formiranje zubnog plaka pri različitim završnim obradama materijala, na glaziranim i poliranim površinama keramičkih sistema, gde je došao do saznanja da glazirane površine pokazuju veći tendenciju formiranja debljeg sloja zubnog plaka u poređenju sa poliranim površinama (Scotti, 2007). Međutim, istraživanje autora Bremera je pokazalo da se formiranje zubnog plaka značajno razlikuje u zavisnosti od vrste keramičkog sistema, i prema njegovoj studiji, cirkonijum je najmanje podložan akumulaciji bakterijskog biofilma (Bremer, 2011).

Uopšteno govoreći, površinski nedostaci predstavljaju najslabiju tačku keramičkih materijala i samim tim mogu dovesti do neuspeha keramičkih restauracija posle određenog vremenskog perioda njihovog korišćenja (Alkhiary, 2003). Ukoliko su materijali podvrgnuti adekvatnim tretmanima završne obrade, njihove površine će ostati glatke i manje podložne

negativnim efektima, što ujedno produžava i vek trajanja samih zubnih restauracija (Rashid, 2014).

Svrha AFM analize je da se dobiju kvalitativni i kvantitativni podaci o topografiji na različite načine obrađivanih keramičkih uzoraka. Neophodnost AFM analize topografije površine, proističe iz činjenice da druge vrste mikroskopija, koje se mogu koristiti za analizu površine materijala, kao što su svetlosna mikroskopija (SM) i skening elektronska mikroskopija (SEM) ne daju dovoljno precizne podatke o kvalitativnim i kvantitativnim karakteristikama ispitivanih površina. I SEM i SM omogućavaju analizu površine u samo dve dimenzije. Iako je nedostatak SEM-a komplikovana priprema uzoraka, jer je za mikroskopsku analizu potreban vakuum, ipak je mnogo preciznija od optičke mikroskopije, jer znatno uvećava posmatranu površinu, te je moguće analizirati detalje na nanometrijskom nivou (Mendez-Vilas, 2006; Radmacher, 1992; Valois, 2004; Gleissibl, 2003). Sa druge strane razvojem AFM-a u proteklih 20 godina omogućeno je vizuelno softversko rekonstruisanje ispitivane površine u sve 3 dimenzije. To podrazumeva skeniranje topografije odabrane površine kao skup z , x i y vrednosti. Na taj način AFM-om se beleži stvarni trodimenzionalni profil ispitivane površine (Klaić, 2007). Takođe AFM ostvaruje bolju rezoluciju u odnosu na SEM, pa se mikroskopiranje može vršiti u različitim uslovima sredine. Ispitivanu površinu može prikazati i na subnanometrijskom nivou (Klaić, 2007).

Casucci i saradnici su vršili AFM i SEM analizu cirkonijumskih keramičkih diskova napravljenih od tri različita proizvođača i obrađenih na četiri različita načina (peskiranje, selektivno infiltrisanje nagrivanjem, nagrivanjem vrućim rastvorom i netretirani). Oni su dokazali da najveću hrapavost pokazuju uzorci koji su selektivno infiltrisani nagrivanjem bez obzira na proizvođača.

Simon i saradnici su uspeli da dokažu da humane ćelije gingive (fibroblasti i epitelne ćelije) mogu da se nastane na zlatu, zlatu i keramici, kao i na inertizovanom titanijumu i leguri titanijuma (Ti_6Al_4V). Oni su takođe eksperimentalno ustanovili da ukoliko postoji isti kvantifikacijski odnos ćelijskih adhezija na zlatu, zlatu i keramici i inertizovanim legurama titanijuma, ipak te veze nisu iste jačine. To podrazumeva da postoji različita sila koju je neophodno primeniti u cilju separacije adherisanih ćelija sa površine ispitivanog materijala (Simon i sar., 1991).

Tako su takođe Raisanen i saradnici ispitivali adhezije gingivalnih ćelija na 5 različitih materijala korišćenih za izradu implantata i pridruženih protetskih nadogradnji. Ispitivane površine bile su komercijalno čist titanijum (c.p. titanijum), legura titanijuma (Ti_6Al_4V),

dentalna legura zlata, aluminijum oksid i dentalna keramika. Površine su bile ispolirane do najvišeg mogućeg stepena glatkoće, upotrebom mehaničkih polišera i dijamantske paste za poliranje. Titanijum je poliran elektrolizom. Razlog za ovakvo ekstremno poliranje ispitivanih površina, proizilazi iz pretpostavke da fibroblasti i epitelne ćelije preferiraju glatku površinu. Pokrivenost materijala epitelnim ćelijama i fibroblastima bio je 2.5 puta veći na metalnim površinama (Ti, Ti₆Al₄V i zlatu) nego na keramičkim materijalima (aluminijum oksid i dentalna keramika). Zaključak je bio da veći broj ćelija kolonizuje površine metala. Na keramici, ćelije su bile ovalne strukture, a ivice su im bile labavo pripojene za površinu keramike (Raisanen i sar, 2000). Istraživači su dalje ispitivali adheziju gingivalnih ćelija na različitim površinama, upotrebom vankulina i $\alpha\beta$ 4 integrin imuno-bojenja. Na metalnim površinama vankulinom je otkriveno formiranje ovalnih ili elongiranih fokalnih adhezivnih kontakata na periferiji ćelija. Na keramici fokalni kontakti su se mogli ustanoviti samo na ćelijama koje su rasle u grupama formirajući ćelijska ostrva. Većina ćelija je bila usamljena, a vankulin se difuzno ispoljavao u njihovoj citoplazmi. Sličan rezultat dobijen je primenom $\alpha\beta$ 4 integrina gde su na metalnim površinama imuno-fluorescentne slike bile granularne, dok na keramičkim površinama, ovakav vizuelni utisak bio je prisutan samo u ostrvima ćelija. Na osnovu dobijenih eksperimentalnih rezultata autori su zaključili da in vitro epitelne ćelije i fibroblasti adherišu bolje na metalnim površinama nego na keramičkim. U njihovoj diskusiji, oni pretpostavljaju da je ključni faktor u postizanju ovakvih rezultata uloga oksidnog sloja na površini implantata. Predpostavlja se da ovaj oksidni pokrovni sloj favorizuje adsorpciju fizioloških fluida i proteina, te na taj način promoviše ćelijske adhezije. Međutim, u njihovoj diskusiji ne postoji osvrt na činjenicu da zlato nema takav oksidni sloj na svojoj površini, a ipak predstavlja dobar supstrat za adheziju ćelija. Drugo obrazloženje koje su izneli u svojoj diskusiji bila je hrapavost površine ispitivanih materijala. Oni su ustanovili da bez obzira na sve uložene napore u postizanju jednake ispoliranosti svih površina, različitost u pogledu njihove hrapavosti ipak postoji. SEM analiza je pokazala da aluminijum oksid i dentalna keramika imaju najveću hrapavost, dok je titanijum pokazao najviši stepen glatkoće. Tendencija ćelija da se adherišu na ispitivanu površinu, pokazalo se, bila je u direktnoj korelaciji sa hrapavošću površine, tako da je izveden zaključak da priroda materijala nije jedini opredeljujući faktor kada su ćelijske adhezije u pitanju. Ako prihvatimo pretpostvku značaja topografije površine na ćelijske adhezije, onda je jasno da glatka površina više pogoduje mekim tkivima nego hrapava (Raisanen i sar., 2000).

Sa druge strane Welander i saradnici su ispitivali formiranje mekotkivne barijere oko protetskih nadogradnji izrađenih na implantatima od različitih materijala. Ispitivanje je izvršeno na eksperimentalnim psima. Oni su postavili dve serije od po četiri implantata na svakome od

šest eksperimentalnih pasa. Dva meseca nakon obavljene implantacije izvršeno je postavljanje protetskih nadogradnji, i to: dve titanijumske protetske nadogradnje, jedna cirkonijumska (ZrO_2) i jedna nadogradnja od legure zlata i platine (Au-Pt) za svaku od dve serije postavljenih implantata. Eksperimentalni psi su u periodu od pet meseci bili podvrgnuti strogo režimu oralne higijene. Dva meseca nakon postavljanja poslednje serije protetskih nadogradnji, eksperimentalni psi su podvrgnuti eutanaziji, radi pripreme uzoraka za histološku analizu. Istraživači su procenjivali rastojanje između različitih područja periimplantnog tkiva (granice periimplantene mukoze, apikalnog kraja epitelne barijere, granice protetske nadogradnje i implantata i kontakata implantata i kosti). Takođe su procenjivali količinu kolagena, fibroblasta, krvnih sudova i leukocita u okviru vezinog tkiva oko implantata. Zahvaljujući postavljanju dve serije implantata i protetskih nadogradnji u različito vreme, bili su u mogućnosti da uporede dobijene rezultate za svaki ispitivani materijal, nakon dva i nakon pet meseci. Takođe imali su mogućnost evaluacije ponašanja mekih tkiva oko implantata i protetskih nadogradnji u funkciji vremena. Dobijeni rezultati su pokazali da keramičke i titanijumske suprastrukture obezbeđuju bolje uspostavljanje fiziološkog i estetskog integriteta mekih tkiva u ispitivanom periodu, nego što je to slučaj sa legurom zlata i platine (Au-Pt). Kod legure zlata i platine uočen je usporen proces mekotkivnog zarastanja i veći stepen gingivalnih recesija, koje su obično ekstenzirale ispod nivoa granice implantata i protetske nadogradnje. Takođe meka tkiva oko protetskih nadogradnji od legure zlata i platine (Au-Pt), pokazala su viši stepen kvantifikacijske zastupljenosti inflamatornih ćelija, te manje kolagena i fibroblasta, nego što je to bio slučaj sa keramičkim i titanijumskim protetskim nadogradnjama. U tom kontekstu ispitivanja, cirkonija je pokazala bolje rezultate nego titanijum. Autori su sugerisali da ZrO_2 obezbeđuje bolje uslove za ćelijske adhezije kada su u pitanju epitelne ćelije i fibroblasti. Takođe u svom radu su naveli podatak, da razlog za ovakav rezultat može da leži u činjenici drugačije bakterijske kolonizacije površina dva različita materijala: cirkonije i titanijuma (Welender i sar., 2008).

Abrahamsson i saradnici su sproveli sličnu studiju, ali deset godina ranije. Oni su postavljali po tri implantata sa svake strane mandibule kod svakog od ukupno pet eksperimentalnih pasa. Nakon tri meseca zarastanja, protetske nadogradnje su postavljene na implantate sa obe strane vilice i to: za svakog psa po jedna protetska nadogradnja izrađena od c.p. titanijuma i po jedna nadogradnja napravljena od visoko sinterovane keramike (Al_2O_3), jedna zlatna protetska nadogradnja i dve skraćene titanijumske protetske nadogradnje prekrivene dentalom keramikom. Nakon isteka perioda od šest meseci, uz primenu mera oralne higijene, eksperimentalni psi su žrtvovani u cilju izvođenja histometrijske i morfometrijske

analize, pri čemu su korišćeni isti parametri analize kao kod Welandera i saradnika u njihovom eksperimentu. Sve protetske nadogradnje izrađene od zlata, kao i one koje su bile izrađene od titanijuma ali prekrivene dentalnim porcelnaom, uslovile su signifikantnu gingivalnu recesiju. Vezivno tkivo je u svim slučajevima ostvarivalo direktan kontakt sa telom implantata, tj. titanijumom. Kod tri od ukupno pet ispitivanih zlatnih protetskih nadogradnji, ustanovljena je gingivalna recesija, zbog koje je spoj implantata i protetskih nadogradnji bio u potpunosti eksponiran, a epitelni pripoj lokalizovan na titanijumskoj površini tela implantata. Gubitak koštnog tkiva u zoni vrata, evidentiran je kod svih implantata sa zlatnim protetskim nadogradnjama i titanijumskim nadogradnjama prekrivenim dentalnom keramikom. Ovakav koštani gubitak, ostavio je prostor za prorastanje epitelnih i vezivno tkivnih celularnih komponenata, koje očigleno nisu mogle da uspostave vezu sa zlatom i dentalnom keramikom.

Nasuprot ovim rezultatima, cirkonijumske protetske nadogradnje, kao i nadogradnje izrađene od c.p. titanijuma uslovile su obrazovanje dve histološke zone tkiva (zona epitelnog pripoja i zona vezivnog tkiva) na svojoj površini, iznad spoja protetske nadogradnje i tela implantata. Takođe, u zoni kontakta tela implantata i protetske nadogradnje, istraživači su ispitivali prisustvo zapaljenskog celularnog infiltrata za sve materijale korišćene u svrhu izrade protetskih nadogradnji u eksperimentu. U rezultatima istraživanja, evidentirana je veća količina zapaljenskog infiltrata kod cirkonijumskih, nego kod titanijumskih protetskih nadogradnji. Pretpostavka je bila da ovakv rezultat uslovljava kvalitet veze protetske nadogradnje i tela implantata. U tom kontekstu dva istorodna materijala ostvaruju bolju vezu. Iz priloženih rezultata eksperimentalne studije autori su zaključili da integracija mekih tkiva na površine protetskih nadogradnji, upravo zavisi od materijala upotrebljenih za njihovu fabrikaciju.

Titanijumske protetske nadogradnje, kao i one izrađene od (Al_2O_3), pokazale su integraciju mekih tkiva na svojoj površini u sličnoj proporciji, sa identifikacijom dve odvojene histološke zone, epitelnog pripoja i vezivnog tkiva. S druge strane protetske nadogradnje izrađene od legure zlata i dentalne keramike u procesu zarastanja mekih tkiva, uslovile su formiranje njihovog pripoja u zoni vrata implantata, uz istovremenu koštanu resorpciju (Abrahamsson i sar., 1998). Thomsen i saradnici su u rezultatima svoje studije naveli da površine metala nedovoljno indukuju rast ćelija, kao i ćelijske adhezije i diferencijacije. Takođe, naveli su bolji induktivni potencijal u tom histološkom kontekstu, kada su u pitanju prelazni metali, koji imaju mogućnost obrazovanja oksidnog sloja na svojoj površini (Thomsen i sar., 1997).

Bez obzira na relevantnost dobijenih rezultata, ovakvi stavovi danas nisu opšteprihvaćeni. U novijem pregledu literature, Linkevicijus i Apse su doveli u pitanje

relevantnost rezultata dobijenih u eksperimentima na životinjama. Oni su ukazali na rezultate dobijene u okviru kliničkih studija izvedenih na humanim ispitanicima, gde su rezultati pokazali slično ponašanje titanijumskih i zlatnih protetskih nadogradnji na implantatima, kada je u pitanju proces mekotkivnih integracija na njihovoj površini. Svoj pregled rezultata su upotpunili i podacima da kada je u pitanju stabilnost i integritet periimplantnih mekih tkiva, nema signifikatno značajne razlike između protetskih nadogradnji fabrikovanih od: cirkonije, titanijuma ili aluminijum oksida (Linkevicius i Apse, 2008).

Kao prilog njihovim tvrdnjama, čak je i Abrahamsson u svojim nedavnim studijama demantovao svoje ranije rezultate, ali ponovo u eksperimentu na psima. Za ovaj eksperiment dizajnirana su četiri različita tipa jednodelnih implantata. Svaki od ova četiri tipa implantata posedovao je tri separatne zone sačinjene naizmenično od legure zlata i titanijuma, a koje su bile različito raspoređene. Te tri separatne zone su bile u fizičkom kontinuitetu koji je ostvaren procesom laserskog spajanja. Različitost u pogledu postojanja četiri tipa implantata je podrazumevala drugačiji raspored titanijumskih i zlatnih zona. U pogledu ćelijskih adhezija, diferencijacija i transformacija dobijeni su slični rezultati bez obzira na materijal i raspored ispitivanih zona u okviru jednodelne implantatne strukture. Oprečnost u dobijenim rezultatima u poređenju sa ranijim eksperimentima, autori su pravdali različitim dizajnom eksperimenta (Abrahamsson i Cardaropoli, 2007). Ipak imajući u vidu sva dosadašnja saznanja, izbor materijala za izradu protetskih nadogradnji na implantatima igra logu u mekotkivnim integrativnim procesima na njegovoj površini. Ipak, i dalje nije u potpunosti razjašnjeno kada zlato može da posluži kao adekvatna alternativa cirkoniji i titanijumu kao zlatnom standardu u području fabrikacije protetskih nadogradnji na implantatima.

Pored činjenice da titanijum predstavlja referentan i neprikosnoveni materijal za protetske nadogradnje na implantatima, verovatno su moguća i unapređenja na tom nivou. Shiraiwa i saradnici su upoređivali pripoje oralnih epitelnih ćelija pacova, i njihovo sledstveno ponašanje na površini titanijuma, kao i na plastičnoj polistirenskoj i staklenoj površini. Oni su procenjivali pripoj ćelija, njihovo prostiranje po površini materijala, kao i stepen celularnih diferencijacija. Takođe su ispitivali i prosečnu hrapavost eksperimentalnih površina materijala. Ra vrednosti za ispitivane površine nisu pokazale signifikantnu različitost kada su tri ispitivane površine materijala u pitanju. Vrednosti Ra su se kretale od 0.03 μm za staklo i polistiren, pa do 0.05 μm za titanijum.

Imajući u vidu rezultate dobijene za hrapavost površine materijala, autori su pretpostavili da priroda mekotkivnog odgovora neće zavisiti od ovog parametra već isključivo

od vrste materijala ispitivanog supstrata. U kulturi ćelija između 3 i 72 sata, više ćelija oralnog epitela bilo je pripojeno za površinu polistirenskog uzorka, nego za površinu titanijumskog, dok je staklo pokazalo srednje vrednosti. Zone pripojenih ćelija progresivno su se uvećavale od 3 do 72 sata kod sva tri supstrata, ali u proseku polistiren je pokazao najbolji rezultat. Ćelijske kolonije su klasifikovane u tri kategorije, u zavisnosti od broja ćelija koje obrazuju koloniju. Tako je kolonija od dve ćelije predstavljala prvu kategoriju, kolonija od tri do pet ćelija drugu kategoriju, a kolonija sa šest i više ćelija treću kategoriju. Od 12 do 72 sata u kulturi, polistiren je pokazao najviše prisustvo dvoćelijskih kolonija, dok je kod titanijuma ova kategorija bila najmanje prisutna. Broj kolonija sa tri do pet ćelija progresivno se uvećavao na površinama polistirena i stakla sve do 72 sata, dok je kod titanijuma ustanovljena tek nakon isteka od 72 sata. Prvo pojavljivanje kolonija od šest ćelija uočeno je tek nakon 96 sati, na svim površinama ispitivanih materijala. U periodu između 96 i 120 sata broj kolonija je bio veći na površini polistirena u poređenju sa površinom titanijuma (Shiraiwa i sar., 2002). Analogno ovim rezultatima, stopa celularnih proliferacija imala je svoj maksimum nakon isteka 48 sati u kulturi na površini polistirena i stakla, a kada je titanijum u pitanju tek nakon 72 sata. Autori su takođe merili količinu Laminin-5 (LN-5), ekstracelularnog proteina sekretovanog od strane epitelnih ćelija, a za koji se smatra da je ključan u procesima ćelijskih adhezija. U tom kontekstu nakon devedeset šest sati, ustanovljena je signifikantna razlika u pogledu količine sekretovanog LN-5 između polistirena i titanijuma. Iz priloženog rezultata autori su zaključili da su oralne epitelne ćelije bile u manjem broju aherisane na površini titanijuma nego što se to na početku eksperimenta očekivalo (Shiraiwa i sar., 2002). Slično ovoj studiji Baharloo je upoređivao ćelijske adhezije na površinama titanijuma koje su bile različite hrapavosti. U pogledu broja ćelijskih adhezija dobijene su značajne razlike kada su dve površine istog materijala u pitanju (Baharloo, Textor, & Brunette, 2005).

Ćelijske linije koje se koriste za *in vitro* testiranje dentalnih materijala mogu biti kontinuirane (L929, MRC-5, 3T3, WI-38, HeLa), ili primarne (fibroblasti pulpe, gingive ili sluzokože) (Pizzofferato, 1994; Schmaiz, 2004). Kontinuirane ćelijske linije obično se dobijaju izolovanjem od neoplazmi ili mogu biti transformisane pomoću virusa ili mutagena. One se najčešće koriste za rutinske test procedure novih dentalnih materijala, za razliku od primarnih, koje se obično koriste za specifične testove. Iako primarne ćelijske linije vode poreklo od oralnih tkiva, one se manje koriste od kontinuiranih ćelijskih linija zbog svoje manje osetljivosti (Schmaiz, 2004; Zhihong i sar., 2011). Prema ISO 10993-5:2009 standardu, ćelijske linije pogodne za ispitivanje citotoksičnih efekata su: L929, 3T3, MRC-5, Vero, WI-38 i BHK-21. Kada je u pitanju adhezija ćelija za materijale od kojih se izrađuju implantati, najčešće

kosrišćene ćelije su fibroblasti i epitelne ćelije (Elshahawya, 2014; Lee i sar., 2015; Nothdurft i sar., 2015; Cho i sar, 2015; Richards, 1996).

Imajući u vidu sve navedene činjenice vezane za dobijene rezultate iz različitih eksperimentalnih studija, nameće se zaključak da priroda materijala koji se koristi u svrhe izrade protetskih nadogradnji na implantatima, nedvosmisleno utiče na biologiju periimplantnih mekih tkiva. Takođe imajući u vidu kompleksnost histo-fizioloških mehanizama koji se dešavaju u okviru procesa ćelijskih adhezija na površine različitih supstrata, gotovo je nemoguće napraviti dizajn eksperimenta koji će obuhvatiti sve relevantne parametre. Takođe, još uvek nije razjašnjeno da li pored titanijuma postoji materijal koji je jednako dobra alternativa za izradu protetskih nadogradnji na implantatima. Ono što je sigurno jeste da različiti načini obrade površina materijala koji se koriste u ove svrhe, utiču na biologiju meko-tkivnog kompleksa oko implantata i protetske nadogradnje. U ovom polju neophodna su dodatna ispitivanja kako bi se unapredio odnos mekog tkiva sa površinama protetskih nadogradnji.

5. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Efekat različitih metoda laboratorijsko-tehničke obrade protetskih nadogradnji na implantatima, izrađenih od itrijumom stabilizovanog cirkonijum dioksid polikristala, do sada nije dovoljno istražen. S obzirom na nedovoljan broj podataka o tome kako se različiti načini obrade protetskih nadogradnji odražava na citološko ponašanje fibroblasta, a što se konsekutivno odražava na biološke procese mekotkivnih integracija implantata, a imajući u vidu savremene trendove razvoja bezmetalnih keramičkih materijala, istraživanja u ovom radu proistekla su iz sledeće nulte hipoteze:

„Različito obrađene površine keramičkih abatmenata ne utiču na adherenciju fibroblasta“.

Polazeći od hipoteze, postavljen je osnovni cilj istraživanja:

Ispitati uticaj različito obrađenih površina keramičkih abatmenata na adherenciju fibroblasta

Iz osnovnog cilja proizilaze bliži ciljevi istraživanja:

1. Ispitati hrapavost površine poliranih, glaziranih, poliranih pa glaziranih uzoraka izrađenih od Y-TZP keramike;
2. Ispitati adherenciju fibroblasta na poliranim, glaziranim, poliranim pa glaziranim sterilnim uzorcima izrađenim od Y-TZP keramike,
3. Ispitati adherenciju fibroblasta na poliranim, glaziranim, poliranim pa glaziranim uzorcima izrađenim od Y-TZP keramike koji su bili izloženi dejstvu faktora usne šupljine;
4. Uporediti dobijene rezultate za polirane, glazirane, polirane pa glazirane uzorake izrađene od Y-TZP kristala, shodno navedenim eksperimentalnim uslovima.

Dobijeni rezultati treba da daju odgovore na sledeća pitanja:

1. *Da li postoji razlika u hrapavosti površine između poliranih, glaziranih i poliranih pa glaziranih obrađivanih uzoraka?*
2. *Da li postoji razlika u adherenciji fibroblasta između poliranih, glaziranih i poliranih pa glaziranih obrađivanih uzoraka?*
3. *Da li postoji razlika u adheziji fibroblasta na sterilnim uzorcima i uzorcima koji su izloženi dejstvu faktora usne šupljine?*

6. MATERIJAL I METODE

Eksperimenti realizovani za potrebe ove doktorske disertacije je dele se na laboratorijski i klinički deo. Laboratorijski deo je obuhvatao analizu topografije površine uzoraka mikroskopom atomskih sila (AFM) i ispitivanje adhezije fibroblasta na sterilnim i uzorcima koji su bili 24 h u ustima, što je ujedno i činilo laboratorijski deo eksperimenta. Eksperimentalni uzorci su bili izrađeni od itrijum stabilizovanog cirkonijum dioksid polikristala i obrađivani su na 3 različita načina (polirani, polirani pa glazirani, glazirani), na osnovu čega su svrstani u 3 grupe (slika 1).

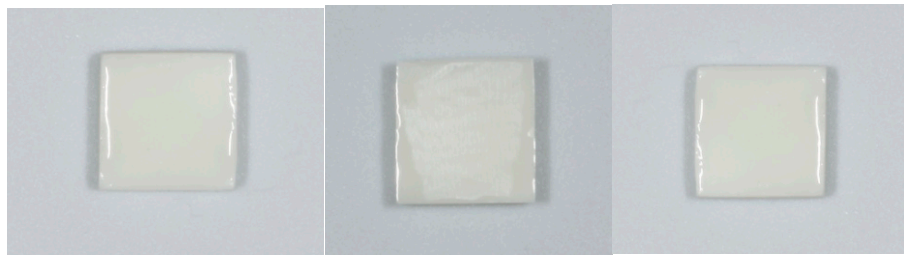


Slika 1. Šematski prikaz izrade eksperimentalnih uzoraka

6.1. Eksperimentalni uzorci

Za potrebe ovog istraživanja izrađene su pločice od itrijum stabilizovanog cirkonijum dioksid polikristala. Sve pločice su bile istih dimenzija, dijametra 5x5 mm i debljine 1 mm

(slika 2). Za potrebe eksperimenta, pripremljeno je ukupno 90 pločica. Pločice su razvrstane u 3 grupe; a) 30 poliranih pločica, b) 30 glaziranih pločica i c) 30 poliranih pa glaziranih pločica.



Slika 2. Eksperimentalne pločice (glazirani, polirani, glazirani i polirani)

6.1.1. Obrada uzoraka

Fabrički pripremljen blok od presinterovanog itrijum stabilizovanog cirkonijum dioksid polikristala (IPS e.max ZirCAD, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein, slika 3), isečen je primenom specijalnog mikrotoma namenjenog preciznom sečenju tvrdih materijala (IsoMet 4000, Buehler, Illinois, USA, slika 4) na uzorke dimenzija 6x6 mm i debljine 1.2 mm.



Slika 3. Materijal od od koga su napravljeni eksperimentalni uzorci



Slika 4. Aparat za sečenje eksperimentalnih uzoraka

Nakon preciznog sečenja uzoraka izvršeno je sinterovanje uzoraka u peći za sinterovanje keramike (Programat S1, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtestein, slika 5) na temperaturi od 1500°C.



Slika 5. Peć za sinterovanje oksidne keramike

Pre sinterovanja, vatrostalna posuda u kojoj su uzorci bili sinterovani, bila je ispunjena s 120 grama cirkonijum dioksidnih perli, prema uputstvu proizvođača materijala, kada je proces sinterovanja u pitanju. Prema unapred definisanom stepenu kontrakcije materijala od 20 %, nakon sinterovanja, dobijeni su uzorci jednakih dimenzija 5x5 mm i 1mm debljine.

Završna obrada eksperimentalnih uzoraka je obuhvatala poliranje, glaziranje ili poliranje pa glaziranje, zavisno od eksperimentalne grupe. Poliranje je izvršeno upotrebom specijalnog seta instrumenata za poliranje cirkonijuma (Zenostar polishing kit, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein, slika 6).



Slika 6. Set gumica za poliranje eksperimentalnih uzoraka

Uzorci kod kojih je izvršeno glaziranje, glazirani su pastom za glaziranje (IPS e.max CAD Glaze Paste, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) u peći Programat P300 (Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein, slika 7) na temperaturi od 406°C u trajanju od 6 minuta.



Slika 7. Keramička peć u kojoj su glazirani eksperimentalni uzorci

6.1.2. Klasifikacija eksperimentalnih uzoraka

Nakon tehničke pripreme uzoraka, uzorci su klasifikovani u 2 grupe. Prvu grupu uzoraka predstavljali su sterilni uzorci (**S grupa/I grupa**). Drugu grupu uzoraka predstavljali su nesterilni uzorci, odnosno uzorci koji su bili izloženi dejstvu faktora iz usne šupljine u trajanju od 24 h. Ova grupa uzoraka je bila obeležena kao **NS grupa/II grupa**.

6.1.2.1. Nesterilni uzorci

Kada su u pitanju nesterilni uzorci, za potrebe ovog dela eksperimenta, odabrano je 30 ispitanika, uzrasta od 25-35 godina, a koji su ispunjavali sve inkluzione kriterijume. Ispitanici kod kojih je postojao makar jedan ekskluzioni kriterijum su isključeni iz studije. Svi ispitanici koji su bili uključeni u eksperiment bili su obavešteni o detaljima istog, a za učestvovanje u njemu potpisali su Informisani pristanak (prilog 1).

U *Inkluzione kriterijume* spadalo je:

1. nepušači;
2. uzrast između 25 i 35 godina;
3. izostanak hroničnih internističkih oboljenja;
4. prisustvo >28 zdravih stalnih zuba bez postojanja protetskih nadoknada, karijesa ili upalnih procesa desni.

Ekskluzioni kriterijumi:

1. mlađi od 25 godina i stariji od 35 godina;
2. prisustvo dijabetes melitus-a i drugih internističkih oboljenja;
3. pušači;
4. postojanje karijesnih lezija, upalnih procesa desni ili protetske nadoknade.

Svaki ispitanik u skladu sa pisanom saglasnošću (prilog 1), nosio je pločice prethodno zalepljene na zubima, podesnim materijalom (Heliosit Orthodontic, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein, slika 8), u trajanju od 24h.



Slika 8. Materijal za fiksiranje uzoraka materijala na odabranim zubima ispitanika

Pre lepljenja pločica izvršena je priprema vestibularnih površina zuba za lepljenje uzoraka. Priprema je podrazumevala uklanjanje organske pelikle sa površine zuba, procesom poliranja, upotrebom kolenjaka na mikromotoru, pri malom broju obrtaja (<20000 obrtaja/min) korišćenjem četkice za poliranje gleđi (slika 9) i pastom bez fluorida u trajanju od 10 sekundi (Proxyl RDA 36 medium, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein).



Slika 9. Četkice i pasta za poliranje gleđne površine odabrahih zuba pre fiksiranja eksperimentalnih uzoraka

Pločice su lepljene na vestibularnu površinu prvog premolara, drugog premolara i prvog molara u gornjoj vilici sa desne strane, pri čemu na prvi premolar je zalepljena glazirana pločica, na drugi premolar polirana pa glazirana pločica, a na prvi molar polirana pločica (slika 10).



Slika 10. Lepljenje eksperimentalnih pločica u ustima pacijenta

Ispitanicima je naloženo da u regiji postavljenih pločica ne održavaju oralnu higijenu, kao i da ne menjaju uobičajene navike u ishrani. Nakon isteka perioda od 24h, pločice su uklonjene mehaničkim putem, razvrstane prema načinu obrade i postavljene u sterilnu petrijevu šolju, prethodno sterilisanu u autoklavu na temperaturi od 121°C u trajanju od 15 minuta i pod pritiskom od 1 bar. Na ovaj način dobijena je podgrupa nesterilnih eksperimentalnih uzoraka.

6.1.2.2. Sterilni uzorci

Sterilni uzorci su prethodno prvo tretirani etil alkoholom (99,8%) i očišćeni u ultrazvučnoj kadici (EASY CLEAN, Renfert GmbH, Germany) u trajanju od 2 minuta. Nakon toga su sterilisani u autoklavu (Bioclave 12 l, Gnatus, Brasil), na 121°C u trajanju od 15 minuta, pod pritiskom od 1 bar.

U svakoj grupi postojale su tri podgrupe, definisane različitim načinima mehaničke obrade materijala uzoraka. Prva podgrupa bila je predstavljena poliranim (**Ia/IIa grupa**), druga poliranim pa glaziranim uzorcima (**Ib/IIb grupa**), a treća samo glaziranim uzorcima (**Ic/IIc grupa**).

6.2. Analiza topografije površine uzoraka

Tomografska analiza površine uzoraka (samo poliranog, samo glaziranog, poliranog pa glaziranog) izvršena je mikroskopom atomskih sila (AFM, P47H-PRO, NT-MDT, Moscow, Russia) u Centru za tribologiju na Fakultetu inženjerskih nauka Univerziteta u Kragujevcu (slika 11).



Slika 11. AFM mikroskop P47H-PRO, NT-MDT

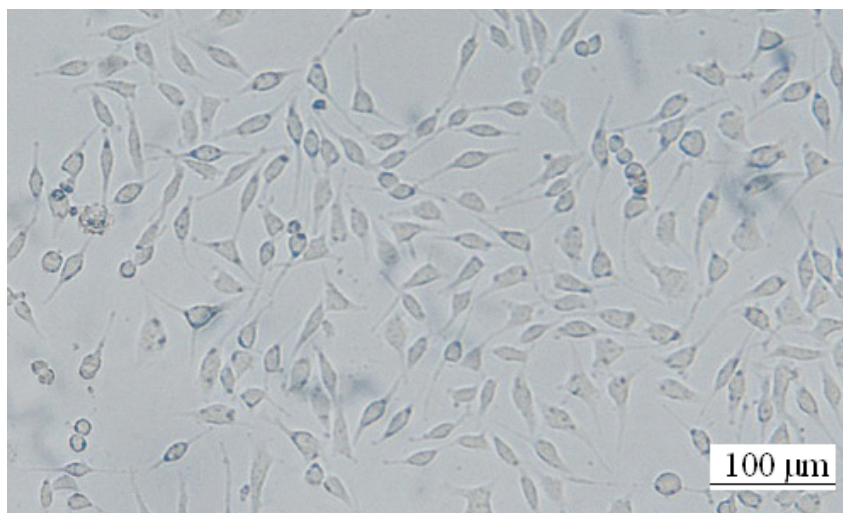
Eksperimenti su rađeni u kontaktnom modu na sobnoj temperaturi (23 ± 2 °C). Radijus vrha konzole, koji je u direktnom kontaktu sa ispitivanom površinom iznosi 10 nm. Merni opseg skenirane površine iznosio je 100×100 μm . Analiza dobijenih snimaka, tj. analiza 3D topografije ispitivanih površina 3 grupe različito obrađivanih keramičkih uzoraka, vršena je u kompjuterskom programu (AFM IA-P9). Rezultati AFM analize su predstavljeni u vidu:

1. 3D topografija površina;
2. Profila hrapavosti; i
3. Odabranih parametara hrapavosti:
 - R_a - srednje aritmetičko odstupanje profila hrapavosti od srednje linije profila na dužini ocenjivanja,
 - R_z - srednja visina profila na dužini ocenjivanja,
 - R_{max} - maksimalna visina profila na dužini ocenjivanja,
 - R_q - srednje kvadratno odstupanje profila na dužini ocenjivanja.

Pre same AFM analize, svi uzorci su dobro očišćeni pomoću 70 % alkohola kako bi se uklonile moguće nečistoće na samim kontaktnim površinama. Nakon toga, uzorci su dodatno očišćeni u ultrazvučnoj kadici (oko 5 minuta) i ostavljeni da se osuše na sobnoj temperaturi. Površinska hrapavost na svim uzorcima je merena duž iste referentne dužine (uzdužno).

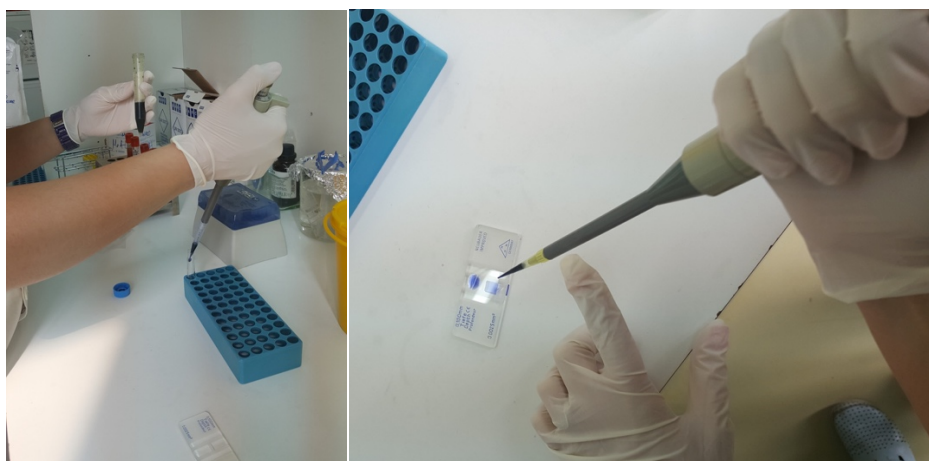
6.3. Ispitivanje adhezije fibroblasta

Za testiranje ćelijskih adhezija na keramičkim supstratima korišćena je MRC-5 (ATCC[®] CCL-171[™]) ćelijska linija fibroblasta (slika 12). Ove ćelije su odabrane zbog njihove pristupačnosti i jednostavnosti u izvođenju željenog eksperimenta, kao i zbog činjenice da predstavljaju dominantnu komponentu fibroznog vezivnog tkiva.



Slika 12. MRC-5 ćelijska linija

Ćelijske kulture su čuvane i održavane u Dulbecco Modified Eagle (DMEM, Gibco®, Waltham, USA) hranljivom medijumu. Za identifikaciju broja adherisanih fibroblasta korišćen je test bojenja triptan plavim, nakon odvajanja ćelija sa površine ispitivanih uzoraka procesom tripsinizacije. Nakon pripreme 0.4 % rastvora triptan plavog u ispuferovanom izotoničnom slanom rastvoru pri pH vrednosti od 7.2-7.3, dodato je 0.1 ml triptan plavog rastvora u 0.1 ml rastvora ćelijske kulture (slika 13).



Slika 13. Postupak bojenja ćelija triptan plavom

Posle bojenja ćelija triptan plavim omogućena je diferencijacija živih u odnosu na nežive ćelije. U obzir su uzete samo žive ćelije, zbog činjenice da kontakt površine sa ćelijom može izazvati njenu apoptozu. Inkubacija ćelija je izvršena u inkubatoru (Esco, CelCulture® CO₂ Incubator, Esco medical, Denmark, slika 14) na 37°C, uz prisustvo 5% CO₂ i u strogo

kontrolisanoj vlažnosti vazduha. Čelije su dodavane uz tripsinizaciju sa 0.05% tripsin-etilen-diamin-tetrasirćetna kiselina (EDTA).



Slika 14. Inkubator u kojem je vršeno zasejavanje ćelijske kulture

Za potrebe eksperimenta korišćeni su sterilni stakleni bunarčići, ukupno 6 za svaki eksperiment (slika 15).



Slika 15. Stakleni bunarčići

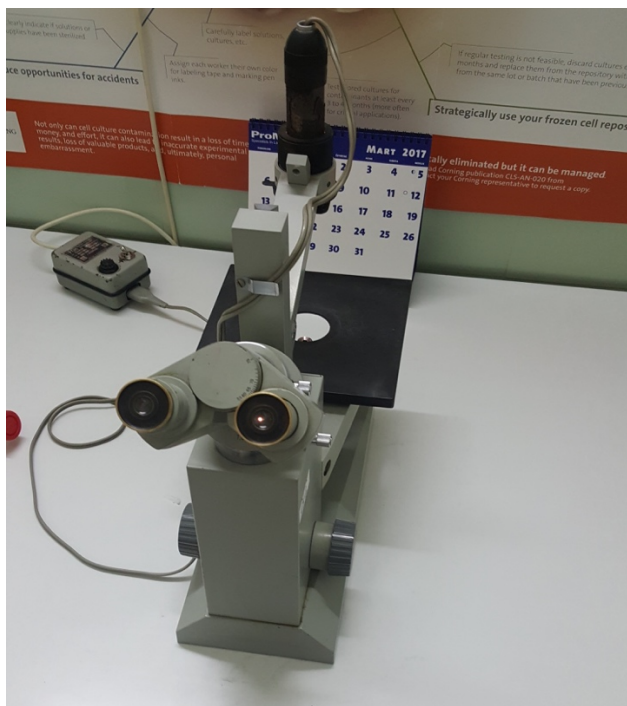
U svaki bunarčić postavljen je odgovarajući uzorak. Nakon brojanja MRC-5 ćelija hemocitometrom, izvršeno je dodavanje 400.000 MRC-5 ćelija u 2 ml rastvora DMEM u svaki stakleni bunarčić. Ispitivani uzorci (S i NS uzorci) su inkubirani na temperaturi od 37°C, u

prisustvu 5% CO₂ u trajanju od 24 h, u inkubatoru (Esco, CelCulture® CO₂ Incubator, Esco medical, Denmark), u cilju adherencije fibroblasta. Nakon tri sata inkubacije u DMEM-u sa 10% ratvora fosfatnog pufera (PBS), dodato je još 300µl DMEM, nakon čega je nastavljena inkubacija pod navedenim uslovima. Nakon završetka inkubacije u trajanju od 24h, kao što je prethodno opisano uzorci su isprani sa 10% PBS 3 puta. Uzorci su zatim postavljeni u tripsin-EDTA (Fisher SCientific, Waltham, MA, USA) i inkubirani u trajanju od 10 minuta, uz dodatak DMEM kako bi se stvorili uslovi za odvajanje ćelija sa površine uzoraka. Nakon 10 minuta dobijen je rastvor koji je sadržao pojedinačne ćelije. Izvršena je centrifuga (U-32, Boeco, Germany) rastvora na 1000 relativne centrifugalne sile (RCF), u cilju dobijanja sedimenta (slika 16).



Slika 16. Centrifuga

Sediment je zatim tretiran rastvorom Triptan plavog (Fisher SCientific, Waltham, MA, USA) u PBS, nakon čega je izvršeno prebrojavanje ćelija na hemocitometru pod svetlosnim mikroskopom (MC 50, Micros, Austria), pri uveličanju od 100 x (slika 17).



Slika 17. Svetlosni mikroskop pomoću koga je izvršeno brojanje ćelija

6.3.1. Brojanje MRC-5 ćelija hemocitometrom

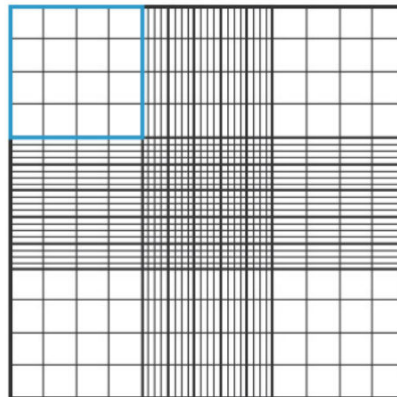
Za potrebe brojanja ćelija korišćen je hemocitometar za jednokratnu upotrebu (INCYTO DHC-N01, Korea) (Slika 18)



Slika 18. Hemocitometar

Rešetka hemocitometra sadrži 9 kvadratnih polja, od kojih je svako kvadratno polje površine 1 mm^2 (slika 19). Centralno polje za brojanje ćelija na hemocitometru ima 25 većih kvadrata, a u svakom od njih po 16 manjih kvadrata. Da bi se u toku brojanja izvršila

diferencijacija živih u odnosu na mrtve ćelije uzorka MRC-5 ćelija izvršeno je njegovo prebojavanje triptan plavim.



Slika 19. Šematski prikaz hemocitometra

Ovaj metod bojenja koristi diazo boju, koja penetrira kroz ćelijsku membranu mrtvih ćelija, bojeći ih u plavo. Sa druge strane boja ne prolazi kroz ćelijske membrane živih ćelija, tako da one ostaju nebojene. Posmatrano pod elektronskim mikroskopom mrtve ćelije se prikazuju kao tamno plave ovalne strukture. Kako je površina svakog velikog kvadrata na hemocitometru 1 mm^2 , a njegova dubina 0.1 mm , konačno zapremina svakog kvadrata je 100 ml . Kada se ustanovi ukupan broj ćelija, ćelijska koncentracija se određuje upotrebom formule:

$$\text{Ukupan br. ćelija/ml} = \frac{\text{Ukupan br. Izbrojanih ćelija} \times \text{dilucioni faktor} \times 10000 \text{ ćelija/ml}}{\text{Br. kvadrata}}$$

Na ovaj način dobijaju se precizne kvantifikacijske podatke adherisanih fibroblasta na keramičkim uzorcima svih ispitivanih grupa.

6.4. Statistička analiza

U cilju izvođenja neophodnih statističkih testiranja, korišćen je statistički programski paket SPSS for Windows (24.0).

Na početku istraživanja sve varijable opisane su klasičnim deskriptivnim metodama statistike. Sva obeležja bila su numerička i opisane su merama centralne tendencije (aritmetička sredina i medijana) i merama varijabiliteta (standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrednost). Prikaz dobijenih rezultata dat je tabelarno i grafički.

Izbor testova za analizu numeričkih obeležja posmatranja zavisio je od prirode njihove raspodele koja je ispitivana korišćenjem Koglomorov–Smirnov-og testa. U slučaju normalne raspodele podataka i testiranje razlike između dve grupe ispitanika korišćen je t-test, dok je kod neparametarskih podataka korišćene Mann-Whitney U test.

Jednofaktorskom analizom varijanse sa ponovljenim merenjima testirana je razlika u vrednostima numeričkih obeležja posmatranja koja su se ponašala po tipu normalne raspodele, između posmatrane tri načina mehaničke obrade površina. Za međugrupnu analizu korišćen je LSD test.

Linearnim regresionim modelom ispitivana je uticaj posmatranih faktora na broj fibroblasta.

Logističkom regresionom analizom izdvajani su faktori razlike između zdravih i obolelih ispitanika.

Granična vrednost za prihvatanje radne hipoteze postavljena je na $p < 0.05$.

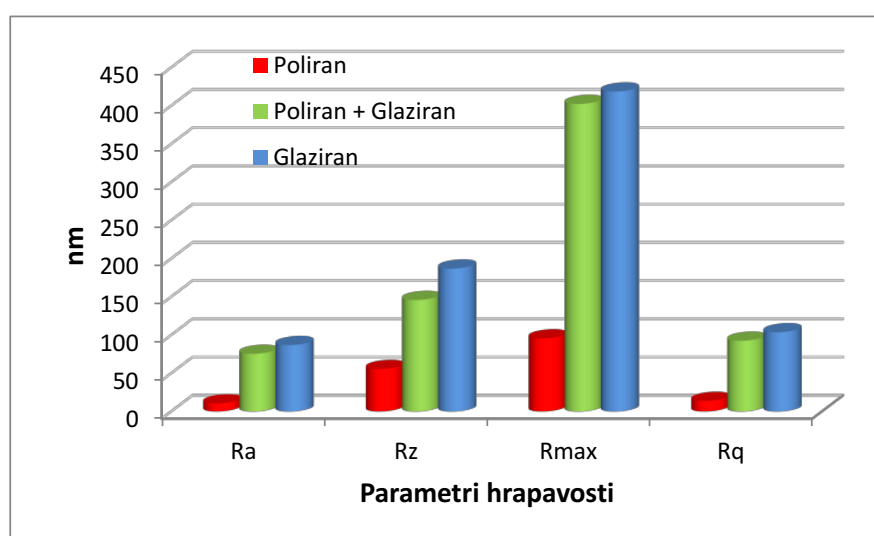
7. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

7.1. Rezultati analize topografije površine uzoraka

Dobijeni rezultati odabranih parametara hrapavosti su prikazani u tabeli 1 i na grafikonu 1, kao srednje vrednosti tri ponovljena merenja za svaku završnu obradu. Takođe, kao dobijeni rezultati prikazane su i slike visoke rezolucije koje se odnose na 3D topografiju i profile hrapavosti za sve ispitivane uzorake (slike 1-6).

Tabela 1. Izmerene vrednosti odabranih parametara hrapavosti za različite načine obrađivanih uzoraka materijala.

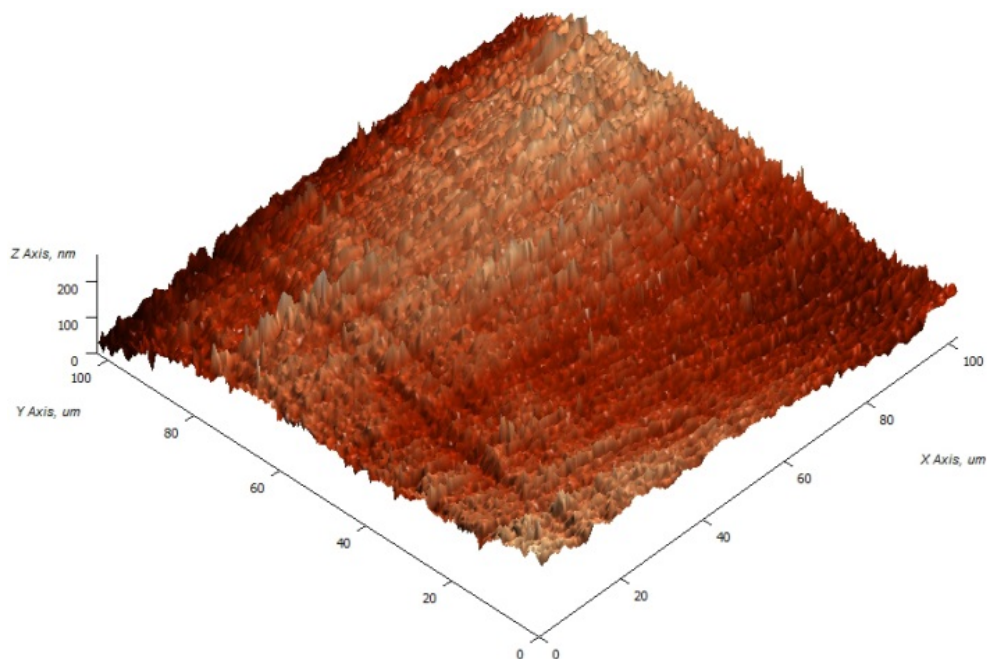
MERNI OPSEG MERENJA, 100x100 μm	PARAMETRI HRAPAVOSTI			
	R_a	R_z	R_{max}	R_q
Poliran	10.762 nm	55.729 nm	95.729 nm	13.964 nm
Poliran + glaziran	75.414 nm	145.894 nm	402.336 nm	92.557 nm
Glaziran	86.924 nm	186.969 μm	418.584 nm	103.663 nm



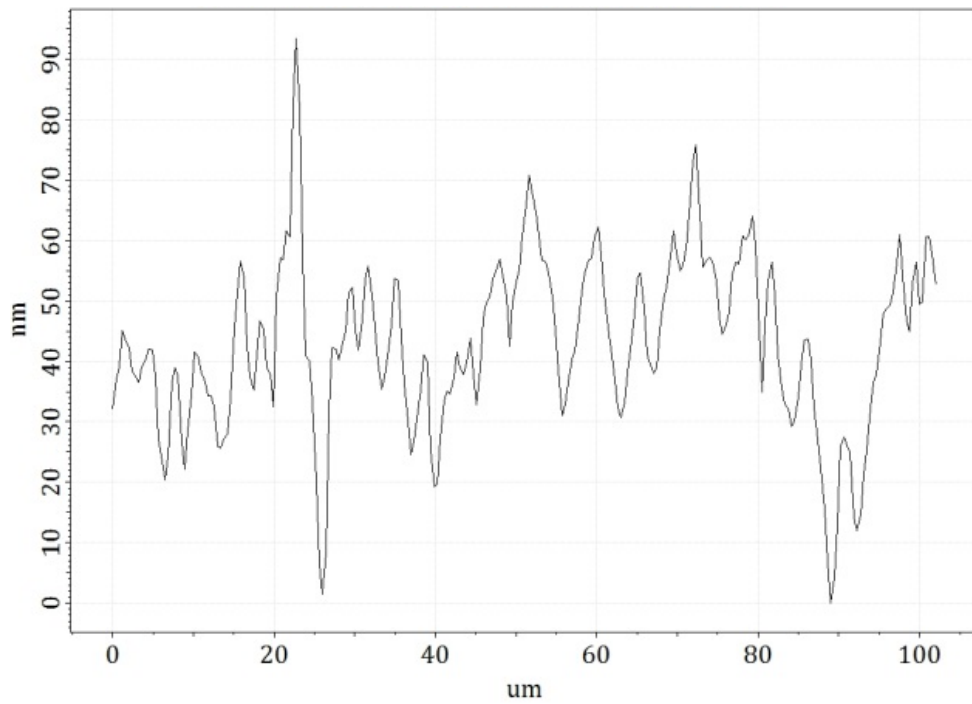
Grafikon 1. Uporedni prikaz dobijenih vrednosti parametara hrapavosti za sve završne obrade

Na osnovu izmerenih vrednosti parametara hrapavosti koji su prikazani u tabeli 1, lako se može uočiti da najmanju vrednost R_a ima završna obrada poliranjem, zatim poliran pa glaziran i, na kraju, kao najgrublju okarakterisanu površinu ima završna obrada glaziranjem. Kako bi se jasnije uočile razlike između dobijenih vrednosti parametara hrapavosti (R_a , R_z , R_{max} i R_q), na slici 3 je predstavljen uporedni prikaz izmerenih vrednosti parametara hrapavosti, koji u potpunosti potvrđuje prethodnu konstataciju.

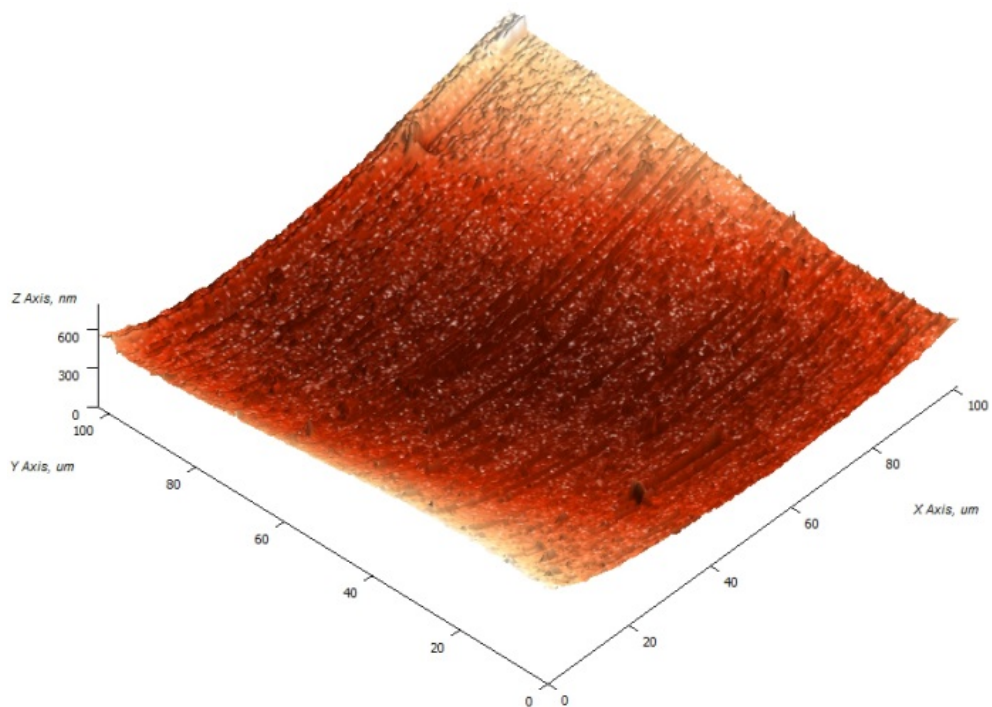
Vrednost R_a glazirane površine, u odnosu na dobijenu vrednost poliran pa glaziran osciluje za ~11 nm, dok je razlika u poređenju sa poliranom površinom drastično veća ~76 nm. Pomenute razlike su jasno izražene i na slikama 3D topografija, kao i na prikazanim profilima hrapavosti. Analizom kontaktne površine obe glazirane završne obrade, može se bez ikakvih problema uvideti značajno veća valovitost kontaktne površine u odnosu na polirani uzorak, koja je ujedno praćena uveliko većim vrednostima maksimalne visine neravnina (R_{max}), čak do 4 puta. Takođe, na kontaktnoj površini završne obrade poliran pa glaziran, uočena su dva gasna mehura, koji predstavljaju vid površinske nepravilnosti inače karakterističan za glazirane površine. Svi prikazani rezultati hrapavosti, različitih završnih obrada, prikazuju jasnu sliku stanja kontaktnih površina uzoraka kao polazne faktore za dalja eksperimentalna ispitivanja.



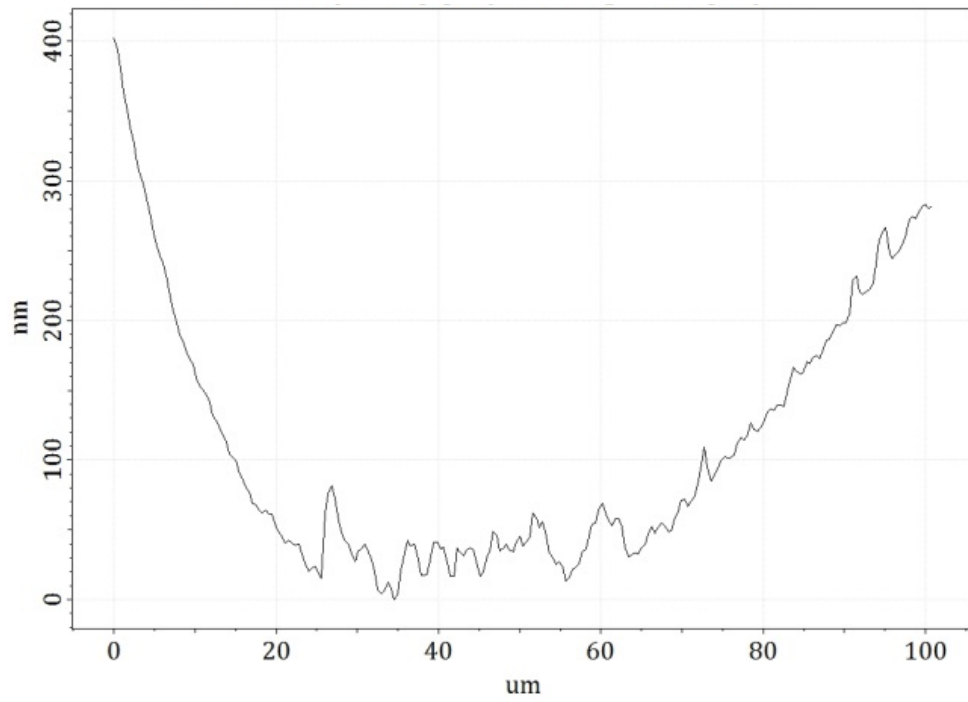
Slika 1. AFM analiza hrapavosti poliranog uzorka, 3D topografija polirane površin



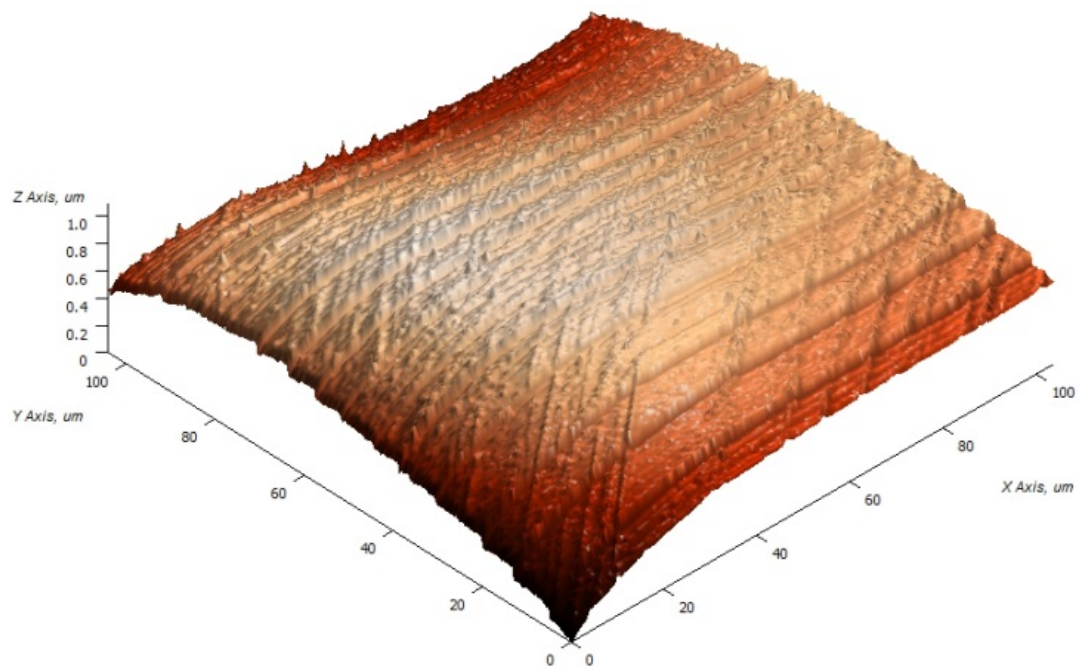
Slika 2. AFM analiza hrapavosti poliranog uzorka, profil hrapavosti



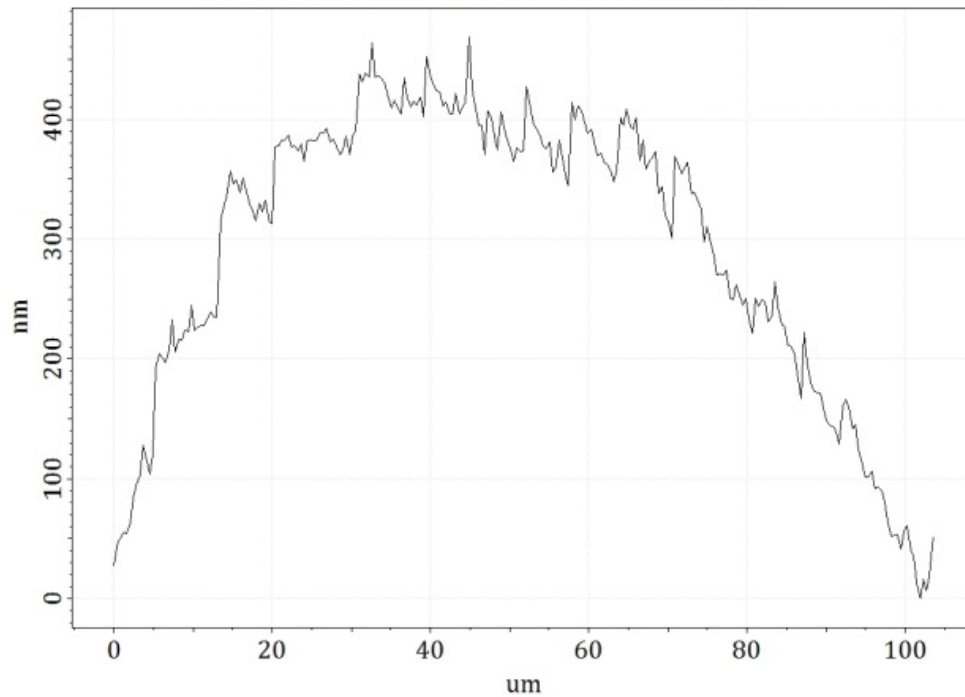
Slika 3. AFM analiza hrapavosti poliranog + glaziranog uzorka, 3D topografija polirane površine



Slika 4. AFM analiza hrapavosti poliranog + glaziranog uzorka, profil hrapavosti



Slika 5. AFM analiza hrapavosti glaziranog uzorka, 3D topografija polirane površine



Slika 6. AFM analiza hrapavosti glaziranog uzorka, profil hrapavosti

7.2. Rezultati ispitivanja adhezije ćelija

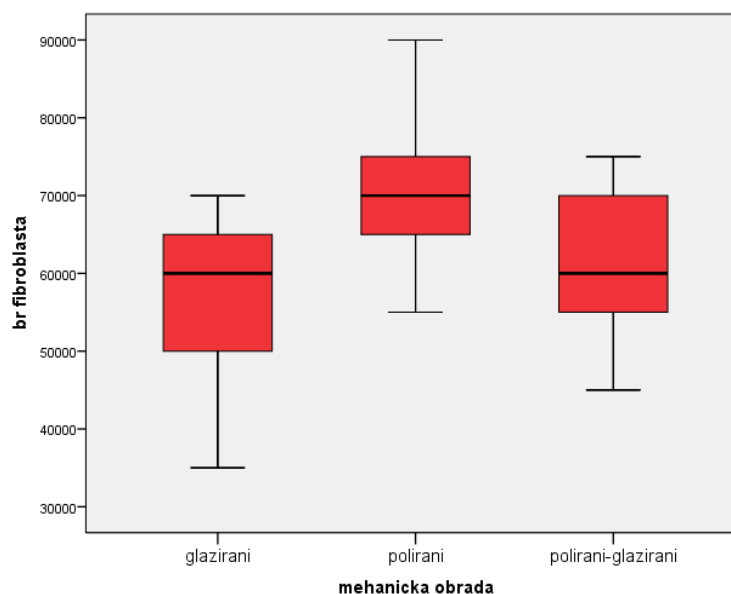
7.2.1. Uticaj vrste uzorka i načina obrade na broj fibroblasta

Analizom uticaja načina mehaničke obrade na broj fibroblasta, statistički značajna razlika u broju fibroblasta između različitih načina mehaničke obrade keramičke površine: samo polirane, polirane pa glazirane i samo glazirane, uočena je i u sterilnom (RM ANOVA; $p=0,000$) i u nesterilnom uzorku (RM ANOVA; $p=0,000$), tabela 1, grafikon 1 i 2.

Tabela 1. Broj fibroblasta

Način obrade	mehaničke	Uzorak X _± SD (Med, min-max)		Značajnost
		Nesterilan	Sterilan	
Glazirane površine		57166,67±9067,12 (60000; 35000-70000)	97500,00±6262,92 (95000; 85000-110000)	^a p=0,000*
Polirane površine		72166,67±7952,81 (70000; 55000-90000)	103000,00±8051,56 (105000; 80000-115000)	^b p=0,000*
Polirane pa glazirane površine		61666,67±7914,78 (60000; 45000-75000)	97166,67±7273,397 (95000; 80000-115000)	^a p=0,000*

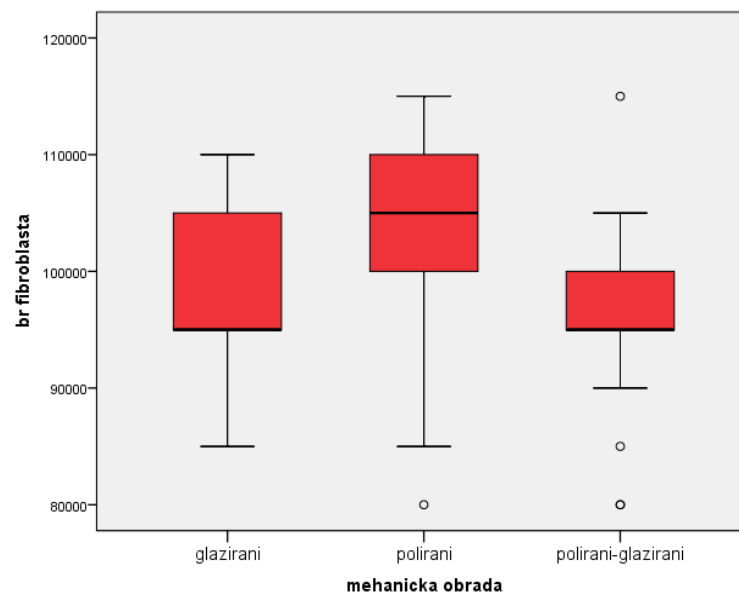
*statistički značajna razlika; ^aMann WhitneyU test; ^bt-test za nezavisne uzorke



Grafikon 1. Broj fibroblasta u grupi nesterilnih uzoraka sa različitim načinom mehaničke obrade

Analizom dobijene razlike unutar nesterilnog uzorka, statistički značajna razlika u broju fibroblasta, uočena je u poređenju između svake sa svakom od posmatranih grupa sa različitim načinom mehaničke obrade: između grupa samo sa poliranim površinama i grupa sa poliranim pa glaziranim površinama i grupa sa samo glaziranim površinama, između grupa sa samo glaziranim površinama i grupa sa poliranim pa glaziranim površinama (tabela 2).

Međugrupnim poređenjem unutar grupe sa sterilnim uzorcima, statistički značajna razlika u broju fibroblasta uočena je između poliranih i poliranih pa glaziranih površina i glaziranih i poliranih pa glaziranih uzoraka, dok nije bilo statistički značajne razlika između samo poliranih i samo glaziranih uzoraka (tabela 2). Statistički značajno najveći broj fibroblasta zabeležen je u grupi poliranih eksperimentalnih uzoraka (tabela 1).



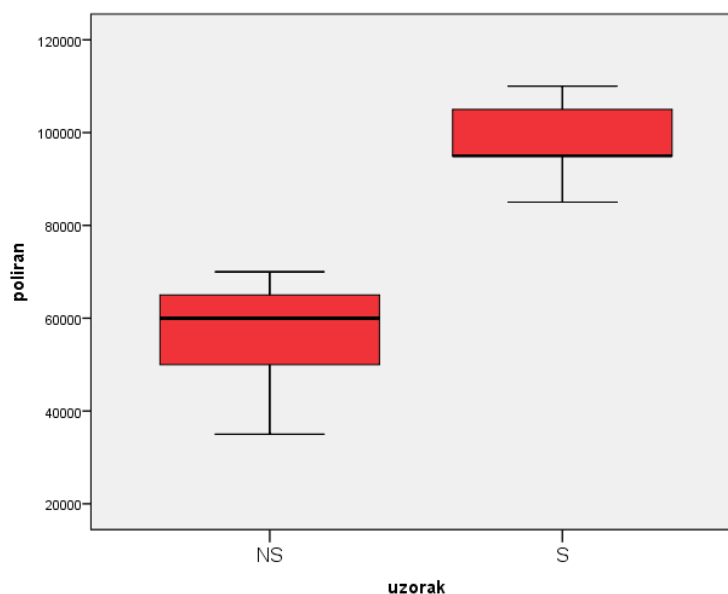
Grafikon 2. Broj fibroblasta u grupi sterilnih uzoraka sa različitim načinom mehaničke obrade

Tabela 2. Međugrupna poređenja: način mehaničke obrade i vrsta uzoraka

Posmatrani parametri	Mehanička obrada		
		Polirani	Polirani pa glazirani
Nesterilni uzorci	Polirani pa glazirani	p=0,000*	
	Glazirani	p=0,001*	p=0,000*
Sterilni uzorci	Polirani pa glazirani	p=0,000*	
	Glazirani	p=0,798*	p=0,000*

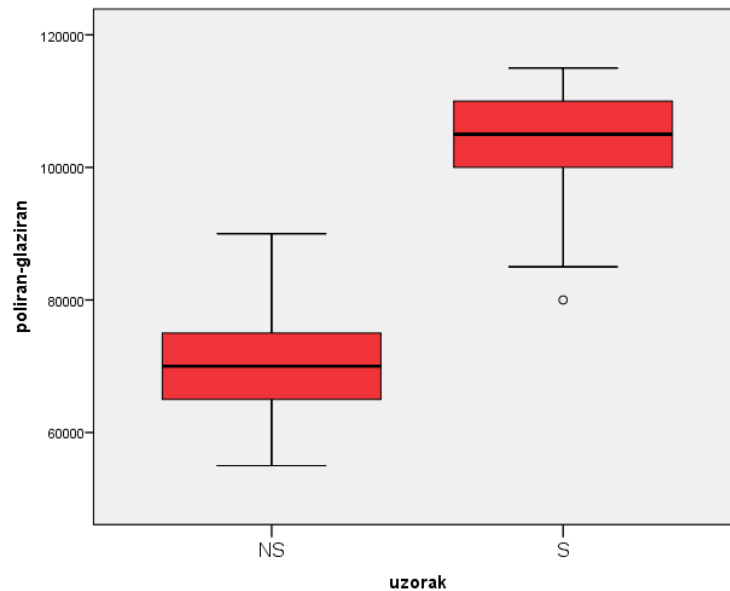
*statistički značajna razlika; LSD-test

Unutar grupe sa poliranim površinama statistički značajna razlika u broju fibroblasta uočena je između sterilnih i nesterilnih uzoraka (tabela 1), i to tako, da je broj fibroblasta bio veći u grupi sa sterilnim uzorcima (grafikon 3).



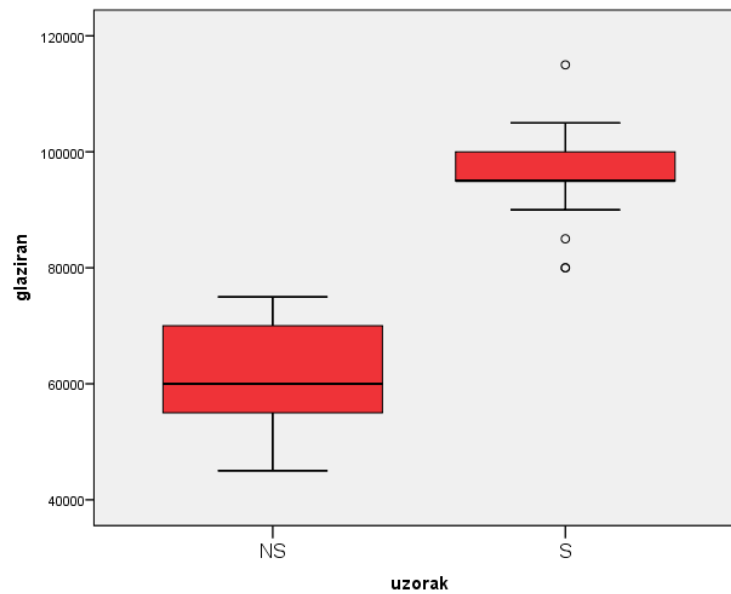
Grafikon 3. Broj fibroblasta u grupi sa poliranim površinama kod sterilnih i nesterilnih uzoraka

Kod poliranih površina, statistički značajna razlika u broju fibroblasta između sterilnih i nesterilnih uzoraka, i to tako, da je veći broj fibroblasta zabeležen u grupi sterilnih uzoraka (grafikon 4).



Grafikon 4. Broj fibroblasta u grupi sa poliranim površinama kod sterilnih i nesterilnih uzoraka

Statistički značajna razlika u broju fibroblasta uočena je i kod poliranih pa glaziranih površina, a između sterilnih i nesterilnih uzoraka (tabela 1). Analizom dobijene razlike zapažamo statistički značajno veći broj fibroblasta u grupi sterilnih uzoraka (grafikon 5).



Grafikon 5. Broj fibroblasta u grupi sa poliranim pa glaziranim površinama kod sterilnih i nesterilnih uzoraka

7.2.2. Linearna regresiona analiza uticaja posmatranih faktora na broj fibroblasta

Regresiona analiza korišćena je za ispitivanje uticaja posmatranih faktora vezano za način mehaničke obrade površina (samo polirane, polirane pa glazirane i samo glazirane) i vrstu uzoraka (sterilni i nesterilni) na broj fibroblasta.

Multivarijantnom linearnom regresionom analizom ispitivan je uticaj napred navedenih posmatranih faktora na broj fibroblasta. U ovom regresionom modelu kao zavisna varijabla posmatran je broj fibroblasta. Ova analiza ima za cilj da izdvoji nezavisne faktore, odnosno faktore prediktore među nezavisnim varijablama, koje su uticale na broj fibroblasta.

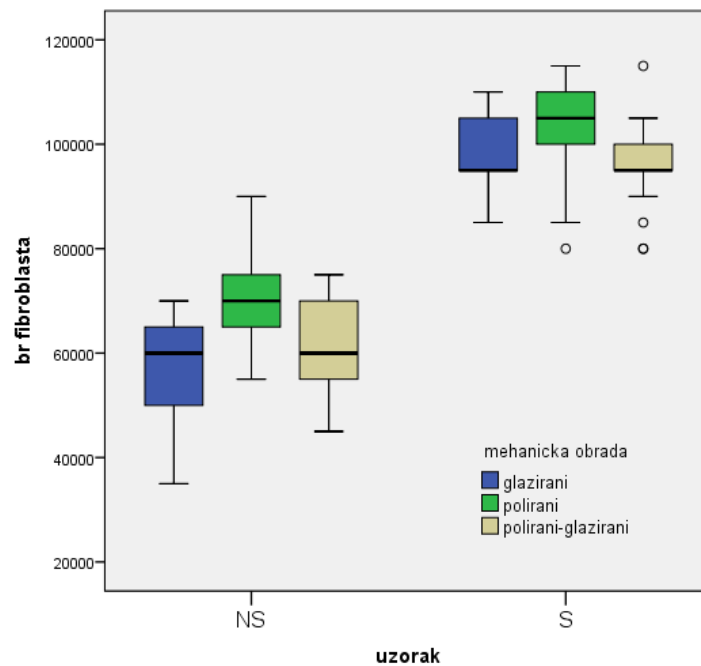
Višestruka linearna regresija pretpostavlja linearnu vezu između posmatrane ishodišne varijable i prediktrorskih ili eksplanatornih varijabli koje objašnjavaju varijabilitet zavisne odnosno ishodišne varijable. Univarijantnom linearnom regresijom ispitivan je uticaj svakog faktora ponaosob na ishodišnu varijablu, odnosno povezanost broja fibroblasta sa ostalim posmatranim faktorima.

Faktori koji su se univarijantnom analizom pokazali kao značajni ulazili su u multivarijantni regresioni model, gde je ispitivana nezavisnost uticaja svakog faktora koji se pokazao kao značajnim, u prethodnom modelu. Statistički značajan uticaj faktora dobijen univarijantnom analizom objašnjava povezanost broja fibroblasta i pojedinih nezavisnih faktora, ali u međusobnom sadejstvu, odnosno uz prisustvo svih ostalih prisutnih faktora. Multivarijantnom (višestrukom) analizom izdvajaju se nezavisni faktori koji direktno utiču na vrednosti broja fibroblasta, odnosno u tim slučajevima taj nezavisni faktor bi bio prediktor izmerenih vrednosti ovog parametra. Univarijantnom regresionom analizom, statistički značajna povezanost nađena je između broja fibroblasta i vrste uzoraka (tabela 3). Obzirom da se samo jedan faktor izdvojio kao značajan nije bilo moguće formirati multivarijantni model, odnosno on predstavlja prediktor vrednosti broja fibroblasta. Dobijeni rezultati pokazuje da je će u svim slučajevima broj fibroblasta biti veći kod sterilnih uzoraka (grafikon 6).

Tabela 3. Univarijantna regresiona analiza uticaja posmatranih faktora na broj fibroblasta

Posmatrani faktori	Univarijantna linearna regresiona analiza $R^2=0,796$	
	#B (95%CI)	Značajnost
Vrsta uzoraka	35555,556 (32874,453-38236.658)	p=0,000*
Mehanička obrada	1041,667 (-2569,916-4653,250)	p=0,570

*statistički značajan; #Nestandardizovani koeficijent B



Grafikon 6. Broj fibroblasta u kod različitih uzoraka

7.2.3. Logistička regresiona analiza u odnosu na vrstu uzorka

Logističkom regresionom analizom izdvajani su prediktori razlike između sterilnih i nesterilnih uzoraka, pošto su se oni izdvojili kao faktor sa nezavisnim uticajem na broj fibroblasta. Cilj ove analize je bio da se definišu, parametri razlika između sterilnih i nesterilnih uzoraka, odnosno da se definiše način mehaničke obrade koji bi bilo najbolje primenjivati kod nesterilnih uzoraka a da se dobije najveći broj fibroblasta.

Prvi deo logističke regresione analize jeste univarijantna logistička regresija kojom se ispituje moguća razlika između sterilnih i nesterilnih uzoraka, u svakom od posmatranih načina mehaničke obrade. Faktori koji su se univarijantnom analizom pokazali kao značajni ulazili su u multivarijantni regresioni model, gde je ispitivana nezavisnost uticaja svakog faktora koji se pokazao kao značajan, u prethodnom modelu. Statistički značajan uticaj faktora dobijen univarijantnom analizom objašnjava uticaj tog faktora na pojavu razlike između posmatranih uzoraka, ali u prisustvu svih ostalih faktora. Multivarijantnom (višestrukom) logističkom regresionom analizom izdvajaju se faktori koji su bili nezavisni faktori razlike između sterilnih i nesterilnih uzoraka.

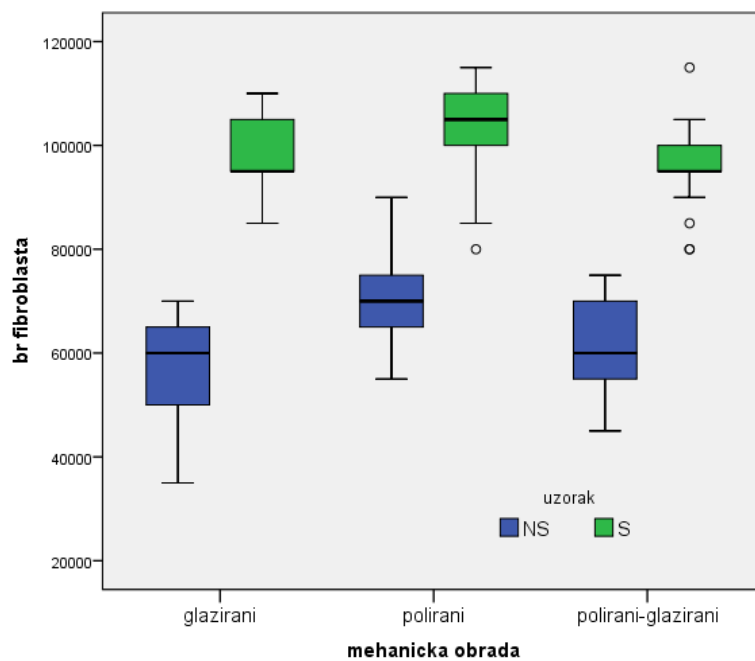
Univarijantnom i multivarijantnom regresionom analizom izračunava se i relativni rizik koji ima najveći značaj kao "mera povezanosti mogućeg uzroka i očekivane posledice" (exp (B)) i on nam pokazuje koliko puta su površine sa posmatranim načinom mehaničke obrade pod većom verovatnoćom za većim brojem fibroblasta.

Univarijantnom regresionom analizom kao statistički značajni faktor razlike između sterilnih i nesterilnih uzoraka izdvojio se način mehaničke obrade, kod kojeg su površine polirane. I ovde, kao i kod prethodnog regresionog modela, nije bilo moguće formirati multivarijantni model, s obzirom da se samo jedan faktor izdvojio kao značajan. Dobijeni rezultat ukazuje da je kod tog načina mehaničke obrada najmanja razlika u broju fibroblasta između sterilnih i nesterilnih uzoraka, odnosno da se kod nesterilnih uzoraka dobija najveći broj fibroblasta kod obrade površina gde je ona polirana (grafikon 7).

Tabela 4. Univarijantna logistička regresiona analiza razlike između sterilnih i nesterilnih uzoraka

Način mehaničke obrade	Sterilni vs nesterilni	
	ExpB (95%CI ExpB)	Značajnost
Glazirani	1,002 (0,542-1,852)	p=0,994
Polirani	1,000 (1,000-1,001)	p=0,002*
Polirani pa glazirani	1,006 (0,407-2,490)	p=0,989

*statistički značajno



Grafikon 7. Broj fibroblasta u kod površina sa različitim načinom mehaničke obrade

8. DISKUSIJA

Topografija površine uzoraka utiče na proces celularnih adhezija i sveukupnog biološkog ponašanja različitih ćelija. U tom kontekstu, fibroblasti će se drugačije ponašati u odnosu na osteoblaste ili epitelne ćelije (Schuler, 2006). Osteoblasti su ćelije za koje je afinitet prema hrapavim površinama višestruko dokazivan (Anselme, 2000). Dugo je smatrano da fibroblasti jednako pokazuju afinitet prema hrapavim površinama kao i osteoblasti, međutim skorija istraživanja na tu temu, otkrivaju potpuno drugačiji afinitet fibroblasta kada je hrapavost površine supstrata u pitanju. Tako je u sprovedenim studijama dokazano da humani gingivalni fibroblasti bolje adheriraju na glatkim površinama. Adherišući potencijal epitelnih ćelija daleko je slabiji u odnosu na fibroblaste i osteoblaste. Epitelne ćelije proporcionalno bolje adherišu na hrapave površine supstrata, za razliku od fibroblasta (Cochran i sar., 1994). Rezultati izvođenih eksperimentalnih studija iz domena celularnih adhezija na površine supstrata različite hrapavosti, bili su često kontradiktorni. Tako su Cochran i saradnici u rezultatima svoje studije naveli podatak boljeg adherišućeg potencijala fibroblasta, na glatkim površinama ispitivanog supstrata, nego na hrapavim. Nasuprot ovoj, u rezultatima slične studije koju su izveli Carmine i saradnici, humane epitelne ćelije pokazale su bolji afinitet adherencije na hrapavoj nego na glatkim površini ispitivanog supstrata (Carmine, 2003). U kontekstu navedenih oprečnih rezultata sprovedenih studija, Baumhammers i saradnici su naveli u rezultatima svog eksperimenta, da ne postoji razlika u adherišućem potencijalu epitelnih ćelija i fibroblasta kada su u pitanju površine različitih materijala i različite hrapavosti (Baumhammers, 1978). Kao moguće objašnjenje za različite rezultate serije eksperimenata na temu adherencije epitelnih ćelija i fibroblasta na površine istih materijala različite hrapavosti, navodi se velika varijabilnost u pogledu dizajna sprovedenih eksperimenata. Hrapavost svakako predstavlja determinišući faktor, ali očigledno ne i jedini. Priroda površine materijala, njena hemijska i fizička kompozicija, vrsta topografije, anizotropnost, hemijsko tretiranje površine, su važni faktori koji doprinose dobijenim rezultatima, a koje je teško na adekvatan način interpretirati. Takođe, ćelijske linije koje se koriste u svrhe laboratorijskih istraživanja, međusobno se razlikuju čak i u okvirima istog ćelijskog tipa. Tako, na primer, epitelne ćelije i fibroblasti mogu kao izvorište

imati različita tkiva. To mogu biti: tkivni transplantati, immortalizovane ćelije, koje opet mogu biti ili humanog ili animalnog porekla. Čak i ćelije poreklom iz istih uzoraka međusobno se mogu razlikovati i tako mogu doprineti dobijanju različitih rezultata u okvirima istog dizajna eksperimenta. Sa tim u vezi Marmary i saradnici su upoređivali histološke razlike kod ćelija dobijenih iz periodontalnog ligamenta i kože, na osnovu čega su upoređivali različitosti u ponašanju istih ćelijskih tipova, a različitog porekla (Marmary, 1976).

Iz pregleda literature pretpostavlja se da na polju celularnih adhezija na površine različitih supstrata, treba uzeti u obzir i vreme trajanja eksperimenta, broj ćelija u kulturi, kao i uslove u kojima se sam eksperiment izvodi. Ograničavajući faktori, koji se vezuju za laboratorijska *in vitro* istraživanja, onemogućavaju uspostavljanje adekvatne simulacije uslova koji vladaju u usnoj šupljini. Imajući u vidu tu činjenicu, jasno je da dobijene rezultate treba prihvatiti sa određenom rezervom.

Sa ekološkog stanovišta usna šupljina predstavlja otvoreni sistem rasta velikog broja različitih vrsta mikroorganizama. U oblasti orofarinksa postoji neprekidno kruženje mikroorganizama i njihovih nutritijenata. Da bi bakterijske ćelije opstale u uslovima usne šupljine neophodno je da dođe do njihove čvrste adherencije za površinu tkiva. Posmatrano sa tog aspekta površine implantata i protetskih nadoknada predstavljaju idealna mesta za akumulaciju velikog broja mikroorganizama i formiranje biofilma. Formirani biofilm na čvrstim površinama zuba i protetskih nadoknada u nekontrolisanim uslovima dovodi do nastanka karijesa, periodontitisa, periimplantitisa i stomatitisa (Teughels, 2006). Mikroflora koja kolonizuje površinu implantata slična je mikroflori koja kolonizuje površinu prirodnog zuba. Na primer, neke parodontopatogene bakterije, kakve su *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* i *Prevotella intermedia*, predstavljaju dominantne infektivne činioce u nastanku periodontitisa, ali isto tako mogu doprineti i nastanku periimplantitisa, što ugrožava rezultat implantološke terapije (E.S-M. Ong, 1992). Osnovno pitanje koje se postavlja kada je u pitanju adherencija mikroorganizama na površine čvrstih materijala, odnosi se na faktore koji toj adherenciji doprinose. Dominantni faktor su hrapavost površine materijala i njegova hemijska priroda. Međutim, Mabboux i saradnici su u rezultatima svog eksperimenta prikazali podatak da i fizičko-hemijske karakteristike oralnih bakterijskih sojeva mogu uticati na adheziju mikroorganizama na površine titanijumskih implantata. Ovakav zaključak su izveli upoređujući dva titanijumska uzorka prekrivena pljuvačkom, uz istovremenu kolonizaciju dva soja mikroorganizama (hidrofilnih i hidrofobnih), gde je slobodna energija površine materijala pretpostavljena kao glavni fizički determinišući faktor adhezije (Mabboux, 2004). Nažalost, u literaturi ne postoji ni jedna slična komparativna studija

kada je cirkonijum u pitanju. Scarano i saradnici su u svojim eksperimentima pokušali da dokažu korelacijski odnos modifikacije površine titanijumskih implantata i adhezije mikroorganizama. Upoređivali su ponašanje površine implantata u domenu adhezije bakterijskih ćelija, kada su titanijumski implantati bili tretirani premazima titanijum-nitrita i cirkonijum-nitrita. Zaključak je bio da površina titanijumskog implantata prekrivena cirkonijum-nitritom, doprinosi redukovanoj kolonizaciji mikroorganizama na površini implantata, što podrazumeva bolji integrativni potencijal kada su u pitanju koštana i meka tkiva (Scarano A, 2003). Sa druge strane, u analizi literature zaključeno je da povećanje hrapavosti materijala iznad vrednosti za R_a veće od $0.2 \mu\text{m}$ dovodi do progresivne akumulacije mikroorganizama i formiranja biofilma. U literaturi je dostupno malo informacija o načinu obrade protetskih nadogradnji na implantatima izrađenih od itrijum stabilizovanog cirkonijum dioksid polikristala, a koji obezbeđuju optimalnu hrapavost površine u odnosu na ćelijske adhezije, kako ćelija domaćina tako i bakterijskih ćelija. S tim u vezi, Happe i saradnici su u cilju standardizacije protokola završne obrade Y-TZP kojim se postiže optimalna vrednost za hrapavost površine od $0.2 \mu\text{m}$, uradili studiju u kojoj su upoređivali 4 različita načina završne obrade. U rezultatima svoje studije su zaključili, da se hrapavost cirkonije od $0.2 \mu\text{m}$ postiže poliranjem materijala uz kombinovanu upotrebu prvo grubljih, a zatim srednje finih gumica za poliranje cirkonije (Happe, 2015). U eksperimentu koji su izveli Takamori i saradnici, na titanijumskim i cirkonija osnovama, zaključili su da je preferirana vrednost, koja se tiče povećane adherencije fibroblasta $0.1 \mu\text{m}$ (Takamori i sar., 2008.). Treba, doduše, imati u vidu da je u ovom radu analizirana samo inicijalna adhezija (4h i 24h), pa postoji mogućnost smanjenja značajnosti sa povećanjem vremena praćenja.

Quiryne i sar. su in vivo analizirali formiranje bakterijskog filma na implantima kod krezubih pacijenata (Quiryne, M., 1996.). Naime, pokazalo se da, iako se spirohete mogu naći samo na najgrubljim površinama, ostali uzorci imaju relativno ujednačenu raspodelu mikrofilma. Anaerobi su se mogli naći u relativno uniformnoj raspodeli kako u supra, tako i u subgingivalnom plaku. Autori su izveli interesantan zaključak, da postoji prag hrapavosti, ispod kojeg dalje promene ne utiču na način bakterijske kolonizacije. Što se tiče cirkonijumskih abatmenata, Rimondini i sar. izveli su eksperiment sa uzorcima različite hrapavosti ($R_a = 0.04$ do $0.18 \mu\text{m}$), uz poređenje sa titanijumom (Grosser- Schreiber, B., 2001.). Pa tako, dok se *Streptococcus mutans* rađe naseljavao na keramičke, *Streptococcus sanguis* preferirao je titanijumske uzorke, dok su *Actinomyces spp* i *Porphynomonas gingivalis* bili neopredeljeni. Autori su zaključili, da je bakterijska flora manje prisutna na cirkonijumskih uzorcima. Nadalje, cirkonijum se pokazao kao superioran i u odnosu na litijum-disilikat, kada su u pitanju

mikroorganizmi. U studiji Checketts i saradnici, ovi materijali analizirani su, zajedno sa zlatom, obrađeni na četiri različita načina, koja uzrokuju promene u hrapavosti površine. Uz inokulaciju *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* i *Actinomyces viscosus*, najbolje rezultate, odnosno najmanju prijemčivost pokazali su cirkonija keramički uzorci, koji su takođe imali i najmanju vrednost hrapavosti (Checketts i sar., 2014).

Scarano i saradnici uradili su eksperiment in vivo, gde su uzorci adaptirani u premolarni i molarni region dobrovoljnih ispitanika, slično kao u ovom istraživanju (Scarano i sar., 2004.). U eksperimentu su korišćeni titanijumski i cirkonijumski uzorci, koji su držani u uslovim usne duplje tokom perioda od 24h. Pri uslovim slične hrapavosti ($R_a = 0.73 \mu\text{m}$ za cirkoniju i $0.75 \mu\text{m}$ za titanijum), autori takođe preferiraju keramičke uzorke, s obzirom da je na njihovim površinama značajno manja kolonizacija. Takođe, treba imati u vidu in vivo studiju, napravljenu na kopicama za zarastanje titanijumskih i cirkonijumskih implanata (Degidi i sar., 46 u 11). U studiji je pokazano, da je pri sličnim vrednostima hrapavosti ($R_a = 0.73\text{-}0.75 \mu\text{m}$) značano veći inflamatorni eksudat prisutan kod titanijumskih kopica. Ipak, in vivo studija van Brakel i sar. pokazala je da cirkonija i titanijum nemaju razlike u ponašanju nakon tri meseca in situ, uz analizu kako većeg broja bakterijskih vrsta, tako i kliničkih parametara (Brakel i sar., 2005.). Neke od studija, koje su se bavile mekotkivnim odgovorom na materijale, od kojih su napravljeni dentalni implantati, rezimirao je Piattelli i sar., u svom preglednom radu (Piattelli i sar., 2011.).

Kada su rezultati analize topografije površine iz našeg eksperimenta u pitanju, uočava se korelacija sa rezultatima koje su naveli Happe i saradnici. U tom kontekstu, Albrektsson i Wennerberg su izvršili podelu materijala za izradu komponenata implantoloških sistema, gde je glavni kriterijum te podele bila hrapavost materijala. Definisali su tri kategorije hrapavosti površine komponenata implantološkog sistema. Prva kategorija, podrazumevala je mašinski obrađivane komponente implantata, sa hrapavošću površine do $0.5\mu\text{m}$. Druga kategorija je predstavljala komponente sa hrapavošću površine između $1.0\mu\text{m}$ i $2.0\mu\text{m}$, što je predstavljalo komponente implantološkog sistema sa umerenom hrapavošću površine. Treću kategoriju su predstavljale komponente sa izrazito hrapavom površinom, gde je hrapavost iznosila preko $2\mu\text{m}$. Ovakvom kategorizacijom materijala omogućena je detaljnija procena uticaja topografije površine na stepen akumulacije biofilma (Albrektsson, 2004). Takođe, dokazano je da hrapavost materijala predstavlja dominantan faktor u promociji akumulacije mikroorganizama, ali ne i jedini. Bolen i saradnici su u svojoj studiji istakli da, pored hrapavosti površine materijala, na akumulaciju biofilma nedvosmisleno utiče i vrsta materijala upotrebljenog u svrhu izrade odgovarajuće komponente implantološkog sistema (Bollen, 1996). Vrsta

materijala, tj. njegova hemijska kompozicija determiniše procese celularnih adhezija kada su mikroorganizmi u pitanju (Teughels, 2006). Ovakvi rezultati svakako idu u prilog činjenici sve masovnije upotrebe cirkonijumskih materijala u produkciji različitih elementata implantoloških sistema. Međutim, u literaturi se mogu pronaći i podaci koji su kontradiktorni navedenim u pogledu komparativno većeg afiniteta mikroorganizama prema cirkonijumu u odnosu na titanijum i legure titanijuma i cirkonijuma (Zhao, 2014). U ovoj interesantnoj studiji, uzorci titanijuma (Ti), titanijum-cirkonijuma (Ti-Zr) i cirkonije (Zr) su obrađeni na više načina (polirani, glodani, nagriženi i dodatno hemijski tretirani). Na žalost, direktno poređenje rezultata sa ovom studijom nije moguće, zato što su samo titanijumski uzorci polirani, a cirkonija uzorci obrađeni kao glodani i nagriženi. Pa tako, polirani titanijumski uzorci nose epitet najglatkijih, s obzirom da cirkonija nije ušla u analizu. Međutim, interesantnost ove studije ogleda se u ispitivanju uticaja, koji mikroorganizmi imaju na procese adherencije fibroblasta i epitelnih ćelija, na površinama cirkonijumskih protetskih nadogradnji na implantatima, a u sklopu mekotkivnih integrativnih procesa implantata i njihovih komponenata. Postoji deficit istraživanja i rezultata o istovremenom kompeticijskom odnosu različitih celularnih linija na istu površinu supstrata. Kada se materijal izloži dejstvu faktora usne šupljine ovakvi uslovi su neminovni. U navedenom eksperimentu, *Streptococcus oralis*, *aureus*, *mitis* i *salivarius* značajno su redukovali adherenciju fibroblasta na svim površinama, što se generalno poklapa sa našim rezultatima. Ova konstatacija jedino ne važi za najglatkije površine titanijuma. Tim je veća šteta, što se u eksperimentu ne analizira polirana cirkonija, koja bi mogla imati najpovoljniji uticaj.

Kao dokaz ovakvoj pretpostavci Bingran i saradnici su objavili rezultate eksperimenata, u kojima su dokazali da prisustvo bakterijskih ćelija na površini ispitivanog uzorka materijala značajno umanjuje adhezijska svojstva fibroblasta. Oni su u svojoj eksperimentalnoj studiji naglasili da humani gingivalni fibroblasti imaju veće šanse za kompeticijsku adheziju na glatkijim površinama uzoraka upotrebljenih materijala u odnosu na bakterijske ćelije. Time su zaključili, da manja hrapavost površine protetskih nadogradnji na implantatima stvara mogućnost obrazovanja protektivnog mekotkivnog čepa, koji onemogućava prodor bakterija u periimplantna tkiva. Obrazlažući navedene činjenice, istakli su da humani gingivalni fibroblasti, zahvaljujući većim dimenzijama, lakše adheriraju na glatkim površinama u odnosu na bakterije. Na hrapavim površinama zbog postojanja mikroskopskih šupljina i pukotina, bakterije kao dimenziono inferiorne ćelije lakše i brže adheriraju (Mei, 2011). Interesantno je napomenuti, da proteinski molekuli u ćelijskom zidu streptokoka mogu stimulisati ekspresiju beta 1-integrina u periodontalnim fibroblastima, što za posledicu ima aktivaciju ćelija i njihovu

adherenciju za površinu supstrata (Marc Engels-Deutsch, 2011). Ovaj fenomen se ispostavio kao najdelotvorniji na glatkim površinama, obezbeđujući dodatna uporišta za adherenciju fibroblasta. Na ovaj način se otkriva i moguća sinergistička priroda delovanja fibroblasta i mikroorganizama u procesima adherencije ćelija za površinu protetskih nadogradnji na implantatima. Kao rezultat ovih činjenica, nameće se zaključak da uspešnost implantološke terapije u kontekstu mekotkivnih integracija zavisi od toga ko će prvi i u kojoj meri naseliti površinu implantata i njegovih komponenti. Upravo ta činjenica bila je povod za izvođenje *in vitro* eksperimenta adherencije humanih MRC-5 ćelija na različito obrađivanim površinama cirkonijumskih uzoraka koji su predhodno bili izloženi dejstvu faktora oralne šupljine. Ovakav dizajn studije je omogućio simulaciju prirodnih uslova u kojima se materijal nalazi nakon završetka implantološke terapije. U dobijenim rezultatima, potvrđena je pretpostavka da fibroblasti u manjoj meri adheriraju na površine cirkonijumskih uzoraka na kojima je bilo omogućeno formiranje biofilma u trajanju od 24h. Kada je u pitanju uticaj koji topografija površine uzoraka ima na celularne adhezije MRC-5 fibroblasta, rezultati ovog eksperimenta su pokazali, da sa porastom prosečnih vrednosti Ra, Rz i Rmax progresivno opada broj adheriranih fibroblasta. Ovakvi rezultati su bili u korelaciji sa rezultatima sličnih eksperimenata, a koje su izveli Birte Größner-Schreiber i saradnici (Birte Größner-Schreiber, 2006). Najveći broj podataka iz sprovedenih eksperimenata u domenima celularnih adhezija odnose se na titanijum kao tradicionalno korišćeni materijal u implantološkoj eksperimentalnoj i kliničkoj praksi. Imajući u vidu činjenicu da cirkonijum zbog svojih estetskih i bioloških karakteristika sve više zaokuplja pažnju u okvirima implantološke prakse, nameće se potreba za različitim aspektima ispitivanja ovog materijala. U ovoj studiji, pokušali smo da damo odgovor na koji način topografija površine materijala utiče na akumulaciju mikroorganizama, sa jedne strane, i adherenciju fibroblasta, sa druge strane. Takođe, naša studija je dala odgovor na pitanje koji način obrade cirkonijumskih protetskih nadogradnji se preporučuje, kada su u pitanju mekotkivne integracije protetskih komponenta implantoloških sistema.

Cirkonijum predstavlja materijal koji se u implantologiji koristi preko dvadeset godina. Za to vreme njegova biokompatibilnost, kao osnovni preduslov upotrebe ovog materijala za izradu komponenta implantoloških sistema, višestruko je ispitivana (Glauser, i sar., 2004).

Biokompatibilnost cirkonijuma podrazumeva da materijal, kada je u kontaktu sa tkivima domaćina, ne izaziva zapaljenske, toksične, imunološke i kancerogene reakcije. Pored biokompatibilnosti, cirkonijum ispoljava i bioinertnost, što se dokazuje jedva primetnom inkapsulacijom cirkonijumskih elemenata vezivnim tkivom i gotovo nedetektabilnom otpuštanju rezidualnih elemenata. Za cirkoniju jedokazano da predstavlja i osekonduktivan

materijal, što omogućava favorizaciju procesa osteosinteze (Josset, 1999). Ovaj važan biološki fenomen višestruko dokazivan brojnim SEM analizama, direktno opravdava upotrebu cirkonijuma u izradi endosealnih komponenata implantoloških sistema. Međutim, i dalje ostaje pitanje komparabilne trajnosti implantoloških komponenata izrađenih od cirkonijuma i titanijuma, a u kontekstu specifičnosti njihove primene u usnoj duplji. Osobnost implementacije kako cirkonijuma, tako i titanijuma u različitim domenima implantološke prakse, ogleda se u istovremenom kontaktu materijala sa nekoliko histološki različitih tkiva. To su: epitel obrazne sluzokože, vezivno tkivo gingive i alveolarna kost. Upravo iz ovog razloga sva *in vitro* i *in vivo* ispitivanja vršena su na ćelijskim linijama osteoblasta, fibroblasta, limfocita i makrofaga. Kao rezultat tih istraživanja zaključeno je da cirkonijum ispoljava izuzetnu biokompatibilnost, bioinertnost i ostekonduktivnost.

Imajući u vidu činjenicu da vezivno tkivo zauzima najveći procenat ljudskog organizma, prva istraživanja vezana za fenomene biokompatibilnosti titanijuma i cirkonijuma su sprovedena na celularnim komponentama ovog tkiva. Ćelijski gradivni elementi fibroznog vezivnog tkiva su fibroblasti i fibrociti. U istoriji eksperimentalnih istraživanja na fibroblastima korišćene su ćelijske linije humanog i animalnog porekla. Kako bi se povećala autentičnost dobijenih eksperimentalnih rezultata, poslednjih godina se sve više insistira na fibroblastima humanog porekla (Bukat, 1990). Upravo ta činjenica bila je povod za odabir humanih MRC-5 ćelija fibroblasta za izvođenje studijskog eksperimenta.

Još ranih devedesetih godina prošlog veka Bukat i saradnici su uz primenu SEM-a ispitivali fenomene adhezije i proliferacije 3T3 fibroblasta animalnog porekla, na keramičkim materijalima, alumini i sinterovanom cirkonijumu (Ca-PSZ), a koji su ispoljavali stepen poroznosti od 30% (Bukat, 1990). Nešto kasnije Ito i saradnici su u komparativnoj studiji koristili debris nastao frikcijom polietana visoke molekulske težine (UHMPWE) i cirkonijuma, ili titanijuma i UHMPWE na ćelijskoj liniji animalnih fibroblasta L929, kako bi analizirali ćelijsku proliferaciju. Autori su zaključili postojanje veće citotoksičnosti cirkonijumskog (Y-TZP) debrisa u odnosu na titanijumski (Ito, 1993). Ovakav rezultat stvorio je mogućnost komparativnog sagledavanja biokompatibilnosti titanijuma i cirkonijuma sa vezivnim tkivom. Sa druge strane, Li i saradnici su upoređivali uticaj od Y-TZP-a i drugih keramičkih materijala na humanim oralnim fibroblastima u direktnom kontaktu sa ćelijama, a kroz analizu efikasnosti formiranja ćelijskih kolonija, zatim metil-tiazol sulfat testom (MTT) i testom rastvaranja koji je podrazumevao detekciju oslobođenih jona na temperaturi od 37°C u fiziološkom rastvoru. Zaključeno je, da cirkonijumski prah ispoljava veću citotoksičnost u odnosu na prah drugih keramičkih materijala (Li, 1993). Cirkonijumski prah je testiran odvojeno i u pogledu

ispitivanja citoksičnosti. Dion i saradnici su ispitivali citotoksičnost cirkonijumskog praha na humanim umbilikalnim endotelnim ćelijama i 3T3 fibroblastima u indirektnom kontaktu sa ćelijama. Ispitivali su ćelijsku proliferaciju (MTT) i diferencijaciju testovima imunofluorescence i zaključili da cirkonijum ne ispoljava efekte citotoksičnosti na ispitivanim ćelijskim linijama (Hisbergues, 2009). Isti zaključak po pitanju citotoksičnosti u sličnim eksperimentima su izveli Harmand i saradnici kada je u pitanju itrijumom stabilizovani cirkonijum dioksid polikristal (Y-TZP). U ovom eksperimentu cilj je bio ispitivanje biokompatibilnosti različito mehanički tretiranih površina uzoraka izrađenih od Y-TZP, gde se tumačenjem rezultata vidi činjenica da način obrade površine materijala utiče i na njegovu biokompatibilnost. Moguće različitosti, po pitanju dobijenih rezultata u eksperimentima koji su imali sličan dizajn, mogu se pripisati različitim labaratorijskim uslovima u kojima se eksperimenti izvode. Međutim, kako bi se povećala pouzdanost dobijenih rezultata, eksperiment je vršen u skladu sa standardizacijom eksperimentalnih istraživanja vezanih za biokompatibilnost, a kroz Round Robinov test standardizacije (Tateishi, 1993).

Cirkonijum ispoljava tri kristalne faze: monokliničku, kubičnu i tetragonalnu (Piconic, 1999). Na sobnoj temperaturi ima monokliničku strukturu, a na 1170°C prelazi u tetragonalnu, dok u kubičnu fazu dospeva na 2370°C. Za vreme hlađenja kristalne faze su nestabilne što uzrokuje fragmentaciju na sobnoj temperaturi. Dodavanjem oksida kao što je Y_2O_3 čistoj cirkoniji stabilizuje se kubična faza što uzrokuje nastanak multifaznog materijala zvanog parcijalno stabilizovan cirkonijum (PSZ), a koja kombinuje kubičnu, monokliničku i tetragonalnu fazu. Dodavanjem itrijum oksida cirkonijumu, dobija se poseban oblik keramičkog materijala na sobnoj temperaturi poznatog kao tetragonalni cirkonijum polikristal (TZP). Takva struktura se postiže dodavanjem 2-3% Y_2O_3 i sastoji se od tetragonalnih partikula veličine nekoliko stotina nanometara (Lange, 1982). Ovakav itrijumom stabilizovani TZP ispoljava sledeće fizičke karakteristike: nisku poroznost, veliku gustinu, čvrstoću i tvrdoću, što opravdava njegovu upotrebu u izradi različitih komponenata implantoloških sistema. Zamor materijala ili starenje cirkonijuma je u direktnoj korelaciji sa mehaničkim karakteristikama keramičkog materijala, a posledica je progresivne spontane transformacije metastabilne tetragonalne faze u monokliničku. Ovakva transformacija uzrokuje nastanak mikropukotine i drugih mehaničkih oštećenja što je u funkciji vremena ključni faktor u procesu starenja i zamora materijala (Basu, 2004). Upravo navedena činjenica predstavlja glavnu dilemu pacijenata i lekara u pogledu trajnosti nadoknada izrađenih od itrijumom stabilizovanog cirkonijum-dioksid polikristala. Načini distribucije i dodavanja itrije cirkoniji takođe mogu doprineti transformaciji materijala. Čvrstoća i strukturalna stabilnost Y-TZP takođe mogu biti afektirani

završnom obradom ili poliranjem materijala ili starenjem materijala kao posledica izloženosti različitim faktorima koji vladaju u usnoj duplji (Basu B, 2004). Navedena činjenica je bila od ključnog značaja u okviru tehničke pripreme materijala za izvođenje našeg eksperimenta. Nedavna *in vitro* istraživanja su pokazala otpornost Y-TZP prema različitim načinima obrade (Papanagiotou, 2006; Guazzato, 2005; Ardlin, 2002). Površine uzoraka u izvedenim eksperimentima su ispitivane *scanning* elektronskom mikroskopijom (SEM) i mikroskopom atomskih sila (AFM). Kada su u pitanju podaci o hemijskoj kompoziciji materijala, u eksperimentima navedenim iz pregleda literature, analiza je vršena energijom disperzivne spektroskopije, a identifikacija faznih transformacija je analizirana difrakcijom X-zraka. Zbog kvalitativnih analitičkih prednosti AFM analize topografije površine u odnosu na SEM, u ovom eksperimentu korišćena je AFM analiza.

U literaturi se navode podaci da promena topografije površine cirkonijumskih materijala može uticati na sveukupno ćelijsko ponašanje i adheziju. U tom kontekstu postoji očigledna povezanost sa titanijumom kao referentnim materijalom za eksperimentalna istraživanja. Afya Ashib Diab Al-Radha i saradnici su u svojim eksperimentima dokazali da povećanje hrapavosti cirkonijumskih uzoraka materijala doprinosi boljoj adherenciji mikroorganizama. Autori su takođe istakli da i druge fizičke karakteristike materijala utiču na histološke fenomene celularnih adhezija. Akcenat je stavljen na fizičke fenomene površine kvašenja materijala kao i vrednosti slobodne energije površine. Zaključak je bio da niže vrednosti slobodne energije površine i površine kvašenja materijala imaju direktno proporcionalan odnos sa brojem adheriranih mikroorganizama. Nasuprot ovom zaključku, povećanje hrapavosti površine doprinelo je većoj akumulaciji mikroorganizama (Afya Sahib Diab Al-Radha, 2012).

Rimondini i saradnici su u sklopu svoje eksperimentalne studije upoređivali kolonizaciju specifičnih parodontopadogenih sojeva mikroorganizama na površine cirkonijumskih i titanijumskih uzoraka različite hrapavosti. Pokazan je niži stepen adherencije mikroorganizama na cirkonijumske u odnosu na titanijumske uzorke. Pokazana je i statistička povezanost broja adheriranih mikroorganizama sa hrapavošću površine uzoraka (Rimondini, i sar., 2002). Bremer i saradnici su, upoređujući pet različitih keramičkih materijala slične hrapavosti, došli do zaključka da cirkonijum predstavlja najmanje atraktivnu površinu za kolonizaciju mikroorganizama (Bremer, 2011).

Sagledavanjem literature dolazi se do zaključka da manja akumulacija mikroorganizama na površini ispitivanog materijala stvara uslove za bolju adherenciju epitelnih ćelija i fibroblasta. Kada su u pitanju mekotkivne integracije oko vrata implantata i protetskih nadogradnji, veoma je značajan kompeticijski odnos između ćelija vezivnog tkiva sa jedne

strane i mikroorganizama sa druge. Akumulacija mikroorganizama ne samo da determiniše adhezije fibroblasta i epitelnih ćelija na površine implantnih struktura već utiče i na nastanak zapaljenskih reakcija u periimplantnim tkivima. Dugoročno gledano, ovo se nepovoljno odražava na uspeh implantološke terapije u celosti. Sa druge strane postavlja se i pitanje kompeticijskog odnosa fibroblasta i epitelnih ćelija, što može predstavljati ključni faktor u ostvarivanju fiziološkog procesa mekotkivnih integracija. Nekontrolisana favorizacija adhezije epitelnih ćelija u odnosu na fibroblaste na površine implantnih struktura može dovesti do redukovane adhezije fibroblasta. Kao posledica ovakvog rezultata kompeticijskog odnosa dve ćelijske linije odgovorne za proces mekotkivnih integracija implantata, čitav ishod implantološke terapije može biti doveden u pitanje. Zaključuje se da fizičko-hemijske karakteristike materijala treba da budu takve da omoguće ravnomernu i istovremenu adheziju svih ćelijskih komponenata mukogingivalnog kompleksa lokalizovanog oko implantata. Samo na taj način moguće je ostvariti predvidljivu mekotkivnu integraciju komponenata implantološkog sistema. U domenu ćelijskih adhezija još jedan fenomen je značajan za njihovu procenu. U eksperimentalnom radu se često spominju inicijalne adhezije koje se odnose na adhezije ćelijskih linija u prva 2 sata od početka eksperimenta. Ukoliko se adhezioni proces ne dogodi tokom ovog kritičnog vremena neće se uopšte ni desiti (Michaels, 1989). U ovoj studiji, kada su u pitanju inicijalne ćelijske adhezije MRC-5 fibroblasta (2 sata nakon inkubacije), nije postojala statistički značajna razlika u pogledu broja adheriranih ćelija na površinama različito obrađivanih cirkonijumskih uzoraka. Međutim, nakon završetka eksperimenta u trajanju od 24h, postojale su značajne razlike u kvantitativnoj zastupljenosti fibroblasta na različito obrađivanim površinama uzoraka. Upravo ta činjenica, sagledana kroz dobijene rezultate, potkrepljuje hipotezu da vreme ekspozicije materijala ćelijama iz kulture doprinosi njihovoj sveukupnoj proliferaciji, diferencijaciji i broju ćelijskih adhezija (Michaels, 1989). Pored metoda korišćenih u okviru eksperimenta za ispitivanje broja adheriranih fibroblasta na površine materijala različitih topografskih karakteristika, domen ćelijskih adhezija se može ispitivati i primenom reakcije lančanog umnožavanja (*polimerase chain reaction* - PCR), kao i testovima elektroforeze. Na taj način moguće je determinisati ekspresiju specifičnih integrina, koji predstavljaju receptore inkorporirane u strukturu ćelijskog zida i koji učestvuju u ćelijskim adhezijama posredstvom hemidezmozoma. Refai i saradnici su ispitivali uticaj hrapavosti materijala na ekspresiju specifičnih citokina i eksperimentalno dokazali da sa promenom hrapavosti ispitivanog materijala dolazi do ekspresije različitih citokina što za posledicu ima modulaciju ćelijskog ponašanja u domenu adhezije. U eksperimentu su korišćeni makrofagi iz miša slični ćelijama RAW 264.7, ispitivan je uticaj titanijskih površina različite hrapavosti

na aktivaciju makrofaga i ekspresija specifičnih citokina IL-1 β , TNF- α i IL-6. Merenjem nivoa sekretovanih citokina definisana je adhezivnost makrofaga na površine različite hrapavosti. Zaključeno je da se adhezija ćelija za materijal iste vrste a različite hrapavosti značajno razlikuje (Refai i sar., 2004). Rezultati ove studije su u skladu sa navedenim rezultatima autora Refai i saradnika. Promena površinske topografije ispitivanih uzoraka je dovela do pojave statistički značajne razlike u broju adheriranih fibroblasta na tri uzorka istog materijala, ali različite hrapavosti. Slično, Spyrou i saradnici su ispitivanjem adhezije osteoblasta na površine istog materijala različite hrapavosti, dokazali da sa promenom topografije površine dolazi do promene u afinitetu formiranja ćelijske veze sa površinom ispitivanog materijala. Pokazano je, da veća hrapavost površine ispitivanog uzorka materijala utiče na povećanje broja adheriranih osteoblasta (Spyrou i sar., 2002). Ovakvi rezultati su suprotni rezultatima ove studije, gde je sa povećanjem hrapavosti površine cirkonijumskih uzoraka zapažen smanjen broj adheriranih fibroblasta. Dobijeni rezultati potvrđuju podatak da se ponašanje i adhezija osteoblasta i fibroblasta značajno razlikuju kada je u pitanju hrapavost površine materijala (Anselme, 2000).

Treba napomenuti, da se u literaturi uglavnom porede nadoknade na bazi cirkonije i titanijuma. Ređe, mogu se naći i drugi materijali, na primer alumina (Mustafa i sar., 2005.). U ovom primeru, takođe se analizira prijemčivost ćelija u odnosu na različitu topografiju površine, preciznije, glodanu, sinterovanu i poliranu. U ovom radu, inicijalna kolonizacija nakon 24h značajno je veća na glatkim površinama, međutim, hrapavije površine prelaze u vodstvo nakon 72h. Autori ovakve rezultate objašnjavaju na interesantan način, naime, smatraju da je veći broj ćelija moguć na uzorcima veće površine (a to su svakako hrapaviji uzorci), dok su ćelije na glatkim površinama prosto popunile sve raspoložive kapacitete površine još tokom inicijalne faze.

Pojam hrapavosti cirkonija nadoknada dospelo je u žižu javnosti sa tematikom njegovog uticaja na gleđ antagonističkih zuba. Naime, prvobitna tehnika izrade keramičkih nadoknada podrazumevala je kompjutersko modelovanje bezmetalne kapice, koja predstavlja ojačanu osnovu protetskog rada. S obzirom na optičke karakteristike prvobitnih cirkonija materijala, ova se osnova morala fasetirati, jer je sama osnova bila premalo transparentna, odnosno neogovarajućeg tona boja. Problem ovakve tehnike, poznate kao 'tehnika slojeva' u praksi, nastaje usled zamene cirkonija materijala, otpornosti oko 1200 MPa, sa fasetnom keramikom, čija otpornost ne prelazi 90 MPa (Fischer i sar., 2008.). Tokom funkcije, fasetni materijal podlegao je dejstvu snažnih okluzalnih sila, što je vodilo frakturi ili čak delaminaciji cele fasete (Triwatana i sar., 2012.). Iz ovih razloga, istraživanja su bila usmerena u smeru iznalaženja modifikovanog cirkonija – ojačanog materijala, koji bi imao povećanu transparentiju bez

značajnog gubitka otpornosti. Vremenom se došlo do modifikacije procesa izrade, kako sirovih uzoraka, tako i načina presovanja praha u diskove. Naime, povećanjem pritiska, kao i presovanjem sa više strana, stvoren je materijal čije su granice kristalnih zrna takve, da manje prelamaju ulazni snop svetlosti, te stvaraju materijal veće transparentnosti. Takođe, gusto pakovanje kristalnih zrna dovelo je čak do povećanja otpornosti materijala, čije vrednosti u okviru standardne devijacije dosežu čak 1400 MPa. Nove generacije cirkonijumskih diskova sada su se mogle koristiti i za izradu jednodelnih, odnosno kruna pune anatomije, poznatijih i kao monolitne krune. Osnovna prednost ovog tipa nadoknada zapravo je nepostojanje sloja fasetne keramike, koji, iako izvanrednih optičkih, zapravo je bio sloj daleko inferiornih mehaničkih svojstava. Takođe, sam spoj ova dva materijala bio je dodatni locus minoris resistentiae. Nadoknade, izrađene monolitnom tehnikom, zahtevale su samo površinsko bojenje, odnosno glaziranje mašinski izrađene krunice.

Istraživanja su, međutim, pokazala da nadoknada izrađena na ovaj način – mašinski glodana, a potom glazirana u skladu sa protokolom – vrši veoma negativan uticaj na antagonističke parova zuba. Glazura, naime, predstavlja komponentu sistema feldspatne keramike, uz modifikaciju tačke topljenja i transparentnosti. Kao takva, poseduje fizičke karakteristike koje, tokom vremena, dovode do trošenja glazure na mestima najprominentnijih okluzalnih kontakata (Lohbauer i sar., 2017.). Na ovaj način, smatra se da već nakon perioda od 6 meseci antagonisti, zapravo, okludiraju sa samim cirkonijumskim materijalom, koji se nalazi ispod, a ne sa glatkom glazurom. Ukoliko je cirkonija monolitna krunica veće hrapavosti, to je njena abraziona sposobnost veća, a samim tim i negativni uticaj na antagoniste. Treba napomenuti, da je tvrdoća cirkonija nadoknada preko dva puta veća, u odnosu, na primer, na krunice od litijum-disilikatne keramike. Ovaj problem pretio je da dalekosežno ugrozi primenu monolitnih cirkonija nadoknada u rekonstruktivnim procedurama.

Srećom, veliki broj istraživanja je pokazao, da su vrednosti abrazije gleđi antagonista izuzetno male, ukoliko nasuprot sebe imaju visoko poliranu cirkonija nadoknadu (Stawarczyk i sar., 2013.). Štaviše, ispostavilo se, da je trošenje gleđi nasuprot ovakve krunice manje, nego li da su antagonisti prirodni zubi. Na ovaj način, kao klinička procedura u primeni cirkonija krunica, preporučuje se glaziranje, a potom poliranje tačaka kontakata. Glazura, u ovom kontekstu, zapravo daje estetske osobine, u smislu površinskog bojenja i karakterizacije materijala, a sledstveno poliranje omogućuje kontakt lišen hrapavosti, te i abrazivnog potencijala na antagoniste.

U kontekstu ovog istraživanja, treba primetiti da je pristup bio analiza površina koje su polirane, pa glazirane, dok se kod monolitnih kruna primenjuje inverzni redosled. Ovo stoga,

što je zahtev za primenu postupka različit, pa, samim tim, i izvođenje procedure. Naime, kod krunica glazura ima isključivo estetski efekat, koji nema presudnu ulogu kod spoljašnje površine keramičkog abatmenta. Nadalje, poliranje može voditi potpunom gubitku glazurnog sloja, što je poželjno kod monolitnih kruna, ali nesvrshodno kod implantnih abatmenata. Iz tih razloga, u našem eksperimentu analizirana površina je obrađena shodno zahtevima, koji odgovaraju implantnim nadoknadama.

U svom radu, Nothdurft i sar. takođe su istakli važnost upotrebe cirkonija abatmenata, kao savremene alternative titanijumskim radovima. Oni ističu estetske prednosti keramičkom materijala, ali konstatuju, da nema dostupnih informacija, niti konsenzusa po pitanju karakteristika površine cirkonije, koja pogoduje stvaranju adekvatne mekotkivne kragne. U eksperimentu su poredili glodane, polirane i peskirane površine kako titanijumskih, tako i cirkonija abatmenata (Nothdurft i sar., 2015.). Poliranje je rađeno sa diskom 40 grita veličine, dok su čestice peska bile $110 \mu\text{m Al}_2\text{O}_3$. Najglatkija površina dobija se poliranjem cirkonije, što se objašnjava strukturalnim karakteristikama u poređenju sa titanijumom. Iz istog razloga, međutim, najhrapavija površina pripada titanijumu, jer se cirkonijum ne može lako peskirati, s obzirom da njegova tvrdoća prevazilazi aluminijum-trioksid. Nakon perioda inkubacije od 24 i 72 sata, najveći broj fibroblasta zabeležen je na površini srednje vrednosti hrapavosti, odnosno na glodanom uzorku, kada je u pitanju cirkonija. Kod titanijuma, međutim, najveće vrednosti ima najhrapavija površina, odnosno ona tretirana peskom. Autori, takođe, potenciraju neslaganje literaturnih podataka po pitanju odnosa hrapavosti i adherencije, konstatujući da postoji i razlika u poimanju pojmova 'gladak' ili 'hrapav'. Vrednosti hrapavosti polirane cirkonije komparabilne su sa rezultatima, dobijenim u ovoj studiji. Nasuprot, Pae i saradnici pokazali su neznačanu razliku upravo između glatke i hrapave cirkonija površine, pri sličnim eksperimentalnim uslovima (Pae i sar., 2009.). Ovakve razlike možda se mogu objasniti i vremenom praćenja. Naime, Rompen i saradnici, na osnovu literaturnog pregleda, zaključili su da fibroblasti bolje adherišu na glatke površine, ali na hrapavim pokazuju rapidniju proliferaciju (Rompen i sar., 2006.). Ovakvi rezultati mogu se očekivati tek nakon višednevnog perioda posmatranja.

U literaturi se mogu naći i različiti pokušaji modifikacije površinskih karakteristika materijala, a u cilju mogućeg poboljšanja adherencije kako fibroblasta, tako i epitelnih ćelija. Na primer, Al-Radha i saradnici izvršili su različite modifikacije titanijuma, nakon čega je meren kontaktni ugao, površinska energija, kristalna faza, hemijski sastav, zatim hrapavost i mikrotvrdoća (Al-Radha i sar., 2016.). Pokazalo se, da povećanje hidrofobnosti uz smanjenje površinske energije smanjuje bakterijsku adherenciju na površine uzoraka. Nadalje, Dong-Won

Lee i sar. predlažu laserski tretman titanijuma, uz stvaranje kratera veličine 5 μm , čime je povećano prisustvo epitelnih, ali ne i ćelija fibroblasta (Dong-Won Lee i sar., 2015.). Autori ovakav nalaz objašnjavaju činjenicom, da fibroblasti sadrže visok nivo fibronektina i fibrina, stvarajući na taj način jaku vezu sa titanijumskom osnovom bez neophodnosti laserskog tretmana. Što se cirkonije tiče, Young-Dan Cho i saradnici poredili su titanijum sa diskovima napravljenim od itrijum-stabilizovanog cirkonijum-dioksida, sa dodatkom niobijum-oksida (Nb_2O_5), uz različite stepene hrapavosti površine (Young-Dan Cho i sar., 2015.). U tom eksperimentu, titanijumski uzorci bili su ili glodani ili anodizirani, dok su cirkonijumski uzorci bili polirani ili peskirani. Ispitivanje morfologije i proliferacije ćelija pokazalo je, da glatkije površine ova materijala imaju veći proliferativni potencijal. Nadalje, PRC podaci pokazali su da je produkcija kolagena tipa I, integrina $\alpha 2$ i $\beta 1$ veća na poliranim uzorcima nakon 24h i 48h. Sami autori navode, da se u literaturi nalaze sasvim oprečna mišljenja, treba li površina za pripoj ćelija da bude hrapava ili, baš nasuprot, glatka. Niederauer i saradnici analizirali su ponašanje ćelija u odnosu na keramičke materijale na bazi trikalcijum fosfata ili magnezijum aluminata (spinel), pri čemu je postojalo tri stepena hrapavosti uzoraka (gladak, malo iregularan ili sa makroporama). Ovo istraživanje ide u prilog tezi, da epitelne ćelije adheriraju na više, a fibroblasti na manje hrapave površine (Niederauer i sar., 1993.). Nalazi obe grupe autora idu u korak sa rezultatima našeg istraživanja. Poslednja grupa čak smatra, da je hrapavost, a ne sama vrsta supstrata, od presudne važnosti kad je ponašanje ćelija u pitanju. Nadalje, postoji opcija UV tretmana površine (Yang i sar., 2013.). U eksperimentu su analizirane glatke i hrapave cirkonija površine bez i sa UV tretmana. Analizirani su različiti parametri, uključujući adheziju, proliferaciju i sintezu kolagena tokom 7 dana, kao i kontaktni ugao, čiju vrednost ovaj tretman značajno smanjuje. Što se fibroblasta tiče, hrapave površine postaju prijemčivije nakon UV ekspozicije, dok kod glatkih se pozitivna promena primećuje samo nakon tročasovne provere. Autori nisu sa sigurnošću mogli da povežu vrednosti kontaktnog ugla i hrapavost sa adherencijom, s obzirom na neke kontradiktorne rezultate, koji upućuje na to, da UV tretman indukuje neku dodatnu vrstu promena u materijalu. Cirkonija se, naime, smatra fotoreaktivnim materijalom, koji reaguje na svetlost talasne dužine oko 250 nm. Liu i saradnici takođe su pokušali sa površinskim promenama, ovog puta u vidu prekrivanja polidopaminom (Liu i sar., 2015.). Jednostavnost ovog postupka svakako ga čini interesantnim, s obzirom da je u pitanju jednostavno potapanje u alkalni rastvor ovog bioinertnog jedinjenja, koje deluje u smislu promocije ćelijske adhezije. Analizirani su *Streptococcus gordonii* i *Streptococcus mutans* s jedne, kao i adherencija humanim gingivalnim fibroblastima, s druge strane. Pokazalo se, da ovakva modifikacija pozitivno deluje na povećanje integrina $\alpha 1$, $\beta 3$ i $\beta 5$, kao i fibronektina, uz

istovremenu redukciju bakterijske adherencije na uzorke. U interesantnoj tezi, analizirane su četiri modifikovane titanijumske i jedna cirkonija površina (Sitbon, 2009.). Na osnovu detaljnih analiza, koje su podrazumevale ekspresiju citokina, PCR, kao i morfološko ispitivanje epitelnih ćelija, nije nađena razlika između ispitivanih supstrata. Ovo istraživanje interesantno je stoga, što su dva načina modifikacije titanijuma zapravo nisu bila poznata, već su uzorci za ispitivanje dobijeni od proizvođača. Na ovaj način, pokazuje se interesovanje firmi za dalje modifikacije i poboljšanja površine, odnosno bolji uspeh na tržištu.

Interesantno je zapažanje autora Richards i saradnika, da glatkoća je glatkoća površine poželjna, ali ne iz razloga fibroblastne adherencije (Richard i sar., 1996.). Naime, u njihovom eksperimentu, ispitivani su uzorci titanijuma različitog stepena hrapavosti (grit 80, 600 i 1000). Na ovim primerima, nije dokazana razlika u adherenciji ali autor predlaže glatku površinu, navodeći korelaciju između veličine bakterije te hrapavosti, u smislu otežanja njihove kolonizacije. Takođe, autori Oates i saradnici smatraju da postoji razlika u izgledu ćelija na supstratima različite hrapavosti. Naime, useci i prominencije hrapave površine uslovljavaju specifično grupisanje ćelija, dok ravne površine daju relativno jednolični ćelijski sloj (Oates i sar., 2005.). Interesantan pregledni rad, po pitanju obrade cirkonijuma i njenog uticaja na ponašanje ćelija objavili su Soon i saradnici (Soon i sar., 2016.). U njemu su opisani poliranje, UV tretman, peskiranje, nagrizanje, tretman laserom itd. U zaključku se navodi, da se s obzirom na evidentna neslaganja literaturnih podataka po ključnim pitanjima buduća istraživanja moraju pozvati u pomoć.

Vraćajući se na koncept fasetiranja, odnosno odnosa cirkonija i fasetne feldspatne keramike, interesantno je analizirati rad Tete i saradnika (Tete i sar., 2014). U ovom radu analiziraju se savremeni materijali, dostupni na tržištu kao alternativa titanijumu. Naime, eksperiment uključuje cirkonija, litijum-disilikatnu i feldspatnu keramiku, uz korišćenje SEM, MTT i ELISA testa radi procene ćelijske reakcije. Cirkonija keramika podeljena je u dve grupe, glodana i polirana, dok su druge dve polirane, kakva je i uobičajena klinička praksa. Rezultati su pokazali, da je inicijalna adherencija fibroblasta značajno manja na hrapave površine, što se slaže sa rezultatima naših ispitivanja. Morfološkim ispitivanjem otkriveno je, da se ćelije često raspoređuju paralelno s iregularnostima površine. Autori čak spekuliraju, kako veličina i smer useka površine determiniše ćelijsku adheziju. Nadalje, autori zapažaju značajniju proliferaciju ćelija kako cirkonija, tako i litijum-disilikatne keramike, a u odnosu na feldspatnu. Ovakav nalaz, autori objašnjavaju superiornom biokompatibilnošću ove dve vrste keramike, a pogotovu cirkonije, čije su vrednosti adherencije na glatku površinu svakako najveće. U ovom kontekstu, rad Wennerberga i saradnika može poslužiti kao podsetnik, da feldspatna keramika, iako u

širokoj primeni u stomatologiji, ne provocira pripajanje epitelnih ćelija (Wennerberg i sar., 2010.), a takođe treba pomenuti i istraživanje vezano za evaluaciju citotoksičnosti protetskih materijala (Sabaliauskas i sar., 2011.). Rezultati poređenja ova tri keramička materijala generalno se poklapaju sa nalazima ove studije, s obzirom na redosled favorizacije cirkonije u odnosu na fasetnu keramiku.

U eksperimentu Bremer i saradnika, analizirane su različite keramike i to tri tipa cirkonija keramike (itrijum-stabilizovna (Y-TZP), toplotno izostatski presovana (HIP Y-TZP) i HIP Y-TZP sa dodatkom 25% alumine), zatim litijum-disilikatna i, konačno, fasetna keramika prema njihovom afinitetu za stvaranje bakterijskog plaka (Bremer i sar., 2011.). Autori su objasnili ovakav izbor keramičkih materijala činjenicom, da su oni danas propagirani kao savremeni i aktuelni, ali uz manjak naučnih referenci vezano za njihovo ponašanje prema bakterijskim kolonijama. Uzorci bakterija dobijeni su od dobrovoljnih ispitanika, nakon nošenja specijalno dizajniranog splinta u trajanju od 24 h. Cirkonija uzorci pokazali su najmanju bakterijsku kolonizaciju, što bi, poređenja radi, značilo i najveću dostupnost za kompetitivno naseljavanje fibroblasta. Autori dobijene vrednosti objašnjavaju karakteristikama materijala, a ne vrednostima hrapavosti, koje su bile ispod granične vrednosti ispod koje dalje smanjenje nema uticaja na kolonizaciju bakterija ($R_a = 0.2 \mu\text{m}$). Treba, međutim, napomenuti, da vrsta cirkonija materijala, koja se poklapa sa onom, korišćenom u ovoj studiji, nije pokazala značajnu premoć u odnosu na feldspatnu keramiku. Autori, u sadašnjem eksperimentu, nisu mogli da nadju korelaciju između slične adherencije bakterija na supstrat sa većim udelom staklene faze (feldspatna keramika) i onog, koji uopšte nema stakleni deo (HIP cirkonija), te su zaključili da su neophodna dalja ispitivanja razloga ovakvog ponašanja dvaju materijala.

Nedoumice, vezano za ponašanje materijala sa i bez fasetne keramike imao je i Mustafa sa saradnicima, pa su izveli interesantnu eksperimentalnu studiju (Mustafa i sar., 2008.). Autori navode široku rasprostranjenost titanijumskih abatmenata, koji, na žalost, pokazuju očigledne estetske nedostatke, kada je u pitanju vidljiva zona osmeha. Dalje se navodi, da se keramika obično glazira, ponekad uz dodatak pigmenata. Ovaj postupak vodi stvaranju makroskopski glatke površine, koja je, međutim, sasvim drugačije topografije površine na mikroskopskom nivou. Rad karakteriše četiri eksperimentalne grupe od svakog izabranog materijala (alumina i cirkonija). U tom kontekstu, postoji grupa glodanih, poliranih, glaziranih i glaziranih pa poliranih uzoraka. Rezultati pokazuju, da je nakon perioda praćenja od 24 h, najveći broj ćelija adherirao na glodane uzorke, što autori objašnjavaju većom površinom dostupnom za adherenciju. Takođe se navodi, da se ćelije orijentišu u skladu sa neregularnostima na površini. Incijalno, fibroblasti bolje prijanjaju za cirkoniju, u odnosu na aluminu, a ova razlika nestaje

sedmog dana praćenja. Iako ovi rezultati spadaju u oponirajuću grupu, u odnosu na ovu studiju, poklapa se trend razlike cirkonija i fasetne keramike. Naime, glazirane površine pokazale su manju tendenciju za rast, kao i manji broj fibroblasta u odnosu na površine čiste cirkonije.

U još jednoj studiji poređenja cirkonija i feldspatne keramike, tražile su se razlike u morfologiji, kinetici rasta, vijabilitetu, indukciji apoptoze, kao i kapacitetu celularne adhezije za supstrat (Raffalli i sar., 2007.). Rezultati su pokazali, da je broj fibroblasta, koji je kultivisan na cirkoniji, duplo veći u odnosu na one, koji su narasli na feldspatnoj keramici. Ovi rezultati podudaraju se sa onima, dobijenim u našoj studiji. Takođe, MTT test je pokazao, da postoji procenat ćelija koje su nekrotizirale na feldspatnoj keramici, što se nije moglo zaključiti za cirkonija materijal. Apoptoza nije primećena ni na jednom materijalu. RAT-1 ćelije, korišćene u ovom eksperimentu, takođe su pokazale veću ekspresiju i sekreciju fibronektina, ukoliko su gajene na cirkonija uzorcima. Takođe, cirkonija pokazuje veći broj konekcija između ćelija, a i njihovu bržu finalnu organizaciju. Razlike između dva materijala, autori objašnjavaju ranijom i većom sekrecijom fibronektina kod ćelija gajenih na cirkonija uzorcima.

Rezimirajući različite studije, pristupe, ideje, kao i rezultate dobijenih istraživanja, može se zaključiti da je tematika pripoja fibroblasta veoma interesantna, aktuelna i još nedovoljno istražena tema. Ona nastavlja da se razvija sa uvođenjem novih materijala, koji menjaju prvobitne postavke naučene iz prakse sa drugim osnovama. Ovo je važno napomenuti, s obzirom na očigledne razlike u ponašanju titanijuma i cirkonijuma, a, takođe, i u ponašanju različitih tipova ćelija, na primer, epitelnih ćelija i fibroblasta. Poseban značaj ovom istraživanju daje korelacija sa kliničkom praksom upotrebe materijala, koji su korišćeni u ovom eksperimentu, te se stoga mogu izvući zaključci sa praktičnom primenom, odnosno smernice za svakodnevni rad. Naravno, treba imati u vidu, da svaka studija, pa i prethodno izvedena, ima svoja ograničenja, koja zahtevaju dalje istraživačke kapacitete na zadatu temu. U konkretnom slučaju, ćelijski odgovor može se posmatrati i in vivo, s obzirom na široku rasprostranjenost potrebe implantata kod savremenih pacijenata. Na daljim je istraživanjima, da potvrde, modifikuju ili opovrgnu sadašnje stavove, doprinevši lepoti raznovrsnosti i naučno-istraživačkog rada.

9. ZAKLJUČCI

Nulta hipoteza – da različito obrađene površine keramičkih abatmenata ne utiču na adheziju fibroblasta – ne može se prihvatiti.

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Najmanju vrednost površinske hrapavosti imaju uzorci obrađeni poliranjem, zatim polirani pa glazirani uzorci i, na kraju, najgrublju okarakterisanu površinu imaju eksperimentalni uzorci dobijeni glaziranjem.
2. U grupi sterilnih uzoraka, najveća kvantifikacijska zastupljenost adherisanih fibroblasta dobijena je kod poliranih uzoraka, a najmanja kod poliranih pa glaziranih eksperimentalnih uzoraka.
3. U grupi nesterilnih uzoraka, najveća kvantifikacijska zastupljenost adherisanih fibroblasta dobijena je kod poliranih uzoraka, a najmanja kod glaziranih eksperimentalnih uzoraka.
4. Postoji razlika u kvantifikacijskoj zastupljenosti adherisanih fibroblasta na uzorcima, koji su bili izloženi dejstvu faktora usne šupljine u trajanju od 24 časa, i uzoraka, koji su bili sterilni. Fibroblasti bolje adherišu na sterilnim uzorcima u odnosu na nesterilne uzorke. Takođe, postoji razlika u adheziji fibroblasta na različito završno obrađenim uzorcima. Fibroblasti najbolje adherišu na polirane površine.

Rezimirajući navedene zaključke, može se preporučiti, da abatmente izrađene od itrijumom stabilizovanog cirkonijum dioksid polikristala treba polirati pre kliničke upotrebe, bez tretmana glazurom.

10. LITERATURA

- Aboushelib, M. N., de Jager, N., Kleverlaan, C. J., & Feilzer, A. J. (2007). Effect of loading method on the fracture mechanics of two layered all-ceramic restorative systems. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 23(8), 952-959.
- Abrahamsson, I., & Cardaropoli, G. (2007). Peri-implant hard and soft tissue integration to dental implants made of titanium and gold. *Clinical Oral Implants Research*, 18(3), 269-274.
- Abrahamsson, I., Berglundh, T., Glantz, P. O., & Lindhe, J. (1998). The mucosal attachment at different abutments. an experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(9), 721-727.
- Abrahamsson, I., Berglundh, T., Moon, I. S., & Lindhe, J. (1999). Peri-implant tissues at submerged and non-submerged titanium implants. *Journal of Clinical Periodontology*, 26(9), 600-607.
- Abrahamsson, I., Zitzmann, N. U., Berglundh, T., Linder, E., Wennerberg, A., & Lindhe, J. (2002). The mucosal attachment to titanium implants with different surface characteristics: An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(5), 448-455.
- Afya Sahib Diab Al-Radha, D. D. (2012). Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *Journal of dentistry*, 146-153.
- Ajay VS. *Clinical Implantology*. 1st ed. Gurgaon: Elsevier India; 2013.
- Ahmed M. Ballo, Omar Omar, Wei Xia and Anders Palmquist (2011). *Dental Implant Surfaces –Physicochemical Properties, Biological Performance, and Trends*, *Implant Dentistry - A Rapidly Evolving Practice*, Prof. Ilser Turkyilmaz (Ed.), ISBN: 978-953-307- 658-4
- Albrektsson T, Wennerberg A. The impact of oral implants—past and future, 1966– 2042. *J Can Dent Assoc* 2005;71:327.
- Albrektsson, T., & Wennerberg, A. (2005). The impact of oral implants - past and future, 1966-2042. *Journal (Canadian Dental Association)*, 71(5), 327.

Albrektsson, T., Branemark, P. I., Hansson, H. A., & Lindstrom, J. (1981). Osseointegrated titanium implants. requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 52(2), 155-170.

Al-Radha, ASD., Younes, C. The effect of different surface modification on titanium dental implant surface characteristics and bacterial adhesion. *IOSR-JDMS*, 2016, 15(8):62-70.

Al-Sabbagh, M. (2006). Implants in the esthetic zone. *Dental Clinics of North America*, 50(3), 391-407. BačÁková L, Walachová K, Švorčík V, Hnatowicz V: Adhesion and proliferation of rat vascular smooth muscle cells on polyethylene implanted with O⁺ and C⁺ ions. *J Biomater Sci Polym Ed* 12: 817-834, 2001a.

Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, Hardouin P: Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses, *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 49, p. 155-166, 2000.

BačÁková L, Starý V, KofroňOvá O, Lisá V: Polishing and coating carbon fibre-reinforced carbon composites with a carbon-titanium layer enhances adhesion and growth of osteoblast-like MG63 cells and vascular smooth muscle cells in vitro. *J Biomed Mater Res* 54: 567-578, 2001b.

BačÁková L, Starý V, Horník J, Glogar P, Lisá V, KofroňOvá O: Osteoblast-like MG63 cells in cultures on carbon fibre-reinforced carbon composites. *Eng Biomater (Inzynieria Biomaterialów)* 4(17-19): 11- 12, 2001c.

BačÁková L, Lisá V, Kubínová L, Wilhelm J, Novotná J, Eckhart A, Herget J: UV light-irradiated collagen III modulates expression of cytoskeletal and surface adhesion molecules in rat aortic smooth muscle cells in vitro. *Virchows Arch* 440: 50-62, 2002.

BačÁková L, Lapčíková M, Kubies D, RypáčEk F: Adhesion and growth of rat aortic smooth muscle cells on lactide-based polymers. *Adv Exp Med Biol* 534: 179-89, 2003a.

BačÁková L, Starý V, Glogar P, Lisá V: Adhesion, differentiation and immune activation of human osteogenic cells in cultures on carbon-fibre reinforced carbon composites. *Eng Biomater (Inzynieria Biomaterialów)* 6(30-33): 8-9, 2003b.

BačÁková L, Herget J, Novotná J, Eckhart A, Lisá V: Vascular smooth muscle cells in cultures on collagen I degraded by matrix metalloproteinase-13. *Physiol Res* 52: 23P, 2003c.

Bacakova, L., Filova, E., Ripacek, F., Svorcik, V., Stary, V. Cell adhesion on arteficial materials for tissue engineering. *Physiol Res* 2004, 53:35-45.

Bagis B, Tüzüner T, Turgut S, Mehmet Korkmaz F, Baygın Ö, Bağış YH. Effects of Protective Resin Coating on the Surface Roughness and Color Stability of Resin-Based Restorative Materials. *The Scientific World Journal*. 2014; Article ID 832947, 7 pages, 2014. doi:10.1155/2014/832947

Baharloo, B., Textor, M., & Brunette, D. M. (2005). Substratum roughness alters the growth, area, and focal adhesions of epithelial cells, and their proximity to titanium surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research.Part A*, 74(1), 12-22.

Baier, R. E. (1988). Surface preparation. *The International Journal of Oral Implantology: Implantologist*, 5(2), 15-19.

Baier, R. E., Meyer, A. E., Natiella, J. R., Natiella, R. R., & Carter, J. M. (1984). Surface properties determine bioadhesive outcomes: Methods and results. *Journal of Biomedical Materials Research*, 18(4), 327-355.

Balać I, Bugarski B, Ćosić I, Dramićanin M, Đorđević D, Filipović N, et al. *Biomaterijali*, 1sted. Beograd: Institut tehničkih nauka srpske akademije nauka I umetnosti; 2010

Balasubramanian, V., Hall, C. L., Shivashankar, S., Slack, S. M., & Turitto, V. T. (1998). Vascular cell attachment and procoagulant activity on metal alloys. *Journal of Biomaterials Science.Polymer Edition*, 9(12), 1349-1359.

Banerjee P, Irvine DJ, Mayes AM, Griffith LG: Polymer latexes for cell-resistant and cell-interactive surfaces. *J Biomed Mater Res* 50: 331-339, 2000.

Bauman, G. R., Rapley, J. W., Hallmon, W. W., & Mills, M. (1993). The peri-implant sulcus. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 8(3), 273-280.

Baumhammers, A. a. (1978). Scanning electron microscopy of epithelial cells grown on enamel, glass and implant materials. *Journal of periodontology*, 592-597.

Baumhammers, A., Langkamp, H. H., Matta, R. K., & Kilbury, K. (1978). Scanning electron microscopy of epithelial cells grown on enamel, glass and implant materials. *Journal of Periodontology*, 49(11), 592-597.

Becker W, Becker BE, Ricci A, Bahat O, Rosenberg E, Rose LF, et al. A prospective multicenter clinical trial comparing one- and two-stage titanium screw-shaped fixtures with one-stage plasma-sprayed solid-screw fixtures. *Clin.Implant Dent Relat Res* 2000;2:159– 65.

Berglundh, T., Lindhe, J., Ericsson, I., Marinello, C. P., Liljenberg, B., & Thomsen, P. (1991). The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clinical Oral Implants Research*, 2(2), 81-90.

- Bhola R, Bhola M. S, Liang H, Mishra B. Biocompatible Denture Polymers. *Trends Biomater Artif Organs*. 2010; 23(3) 129-136.
- Binon, P. P. (1996). The effect of implant/abutment hexagonal misfit on screw joint stability. *The International Journal of Prosthodontics*, 9(2), 149-160.
- Binon, P. P., & McHugh, M. J. (1996). The effect of eliminating implant/abutment rotational misfit on screw joint stability. *The International Journal of Prosthodontics*, 9(6), 511-519.
- Birte Größner-Schreiber, B. a. (2006). Focal adhesion contact formation by fibroblasts cultured on surface-modified dental implants: an in vitro study. *Clinical oral implants research*, 736-746.
- Blackburn, E. H. (1991). Telomeres. *Trends in Biochemical Sciences*, 16(10), 378-381.
- Bollen, C. M. L., Papaioanno, W., VanEldere, J., Schepers, E., Quirynen, M., & Van Steenberghe, D. (1996). The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clinical Oral Implants Research*, 7(3), 201.
- Bordenave L, Remy-Zolghadri M, Fernandez P, Bareille R, Midy D: Clinical performance of vascular grafts lined with endothelial cells. *Endothelium* 6: 267-275, 1999.
- Boyan, B. D., Hummert, T. W., Dean, D. D., & Schwartz, Z. (1996). Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, 17(2), 137-146.
- Branemark, P. I., Adell, R., Breine, U., Hansson, B. O., Lindstrom, J., & Ohlsson, A. (1969). Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. experimental studies. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, 3(2), 81-100.
- Bremer, F. a. (2011). In vivo biofilm formation on different dental ceramics. *Quintessence International*.
- Bianco P: e stem cell next door: skeletal and hematopoietic stem cell “niches” in bone, *Endocrinol* 152:2957, 2011.
- Brånemark R, Brånemark PI, Rydevik B, Myers RR. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: A review. *J Rehabil Res Dev*. 2001;38(2):175–181.
- Brett PM, Harle J, Salih V, Mihoc R, Olsen I, Jones FH, et al. Roughness response genes in osteoblasts. *Bone* 2004;35:124–33.
- Brill N, Bjorn H. Passage of tissue fluid into human gingival pockets. *Acta Odontol Scand*. 1959; 17:11-21.

- Brodbeck, U. (2003). The ZiReal post: A new ceramic implant abutment. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry : Official Publication of the American Academy of Esthetic Dentistry ...[Et Al.]*, 15(1), 10-23.
- Bremer, F., Grade, S., Kohorst, P., Stiecsh, M. In vivo biofilm formation on different dental ceramics. *Quintessence Int.* 2011, 42(7):565-574.
- Brew K, Nagase H: Thee tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diver- sity, *Biochim Biophys Acta* 1803:55, 2010.
- Brunette, D. M. (1999). In vitro models of biological responses to implants. *Advances in Dental Research*, 13, 35-37.
- Brunette, D. M., & Chehroudi, B. (1999). The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. *Journal of Biomechanical Engineering*, 121(1), 49-57.
- Burrige, K., & Fath, K. (1989). Focal contacts: Transmembrane links between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 10(4), 104-108.
- Burrige, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., & Turner, C. (1988). Focal adhesions: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annual Review of Cell Biology*, 4, 487-525.
- Buser, D., Weber, H. P., Donath, K., Fiorellini, J. P., Paquette, D. W., & Williams, R. C. (1992). Soft tissue reactions to non-submerged unloaded titanium implants in beagle dogs. *Journal of Periodontology*, 63(3), 225-235.
- Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. In uence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorp- hometric study in miniature pigs. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1991;25(7):889-902.
- Buser, D; Nydegger, T; Oxland, T; Cochran, DL; Schenk, RK; Hirt, HP; Snétivy, D. & Nolte,LP. (1999). Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *JBiomed Mater Res*, 45, 75-83.
- Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 2004;83:529– 33.

Casuccia A, Mazzitellia C, Monticellib F, Toledanoc M, Osorioc R, Osorioc E, Papacchinia F, Ferraria M. Morphological analysis of three zirconium oxide ceramics: Effect of surface treatments. *Dental Materials*, 2010.

Carmine, M. D. Spreading of epithelial cells on machined and sandblasted titanium surfaces: an in vitro study. *Journal of periodontology*, 2003: 289-295.

Carinci F., Pezzetti F., Volinia S., Francioso F., Arcelli D., Farina E., et al: Zirconium oxide: analysis of MG63 osteoblast-like cell response by means of a microarray technology. *Biomaterials* 2004; 25: pp. 215-228

Cattaruzza S, Perris R: Approaching the proteoglycome: molecular interactions of proteoglycans and their functional output, *Macromol Biosci* 6:667, 2006.

Cate, T., & Nanci, A. (2008). *Oral histology* (7th edition ed.). St Louis, Missouri 63146: ELSEVIER MOSBY.

Cavaillon, J. M. (1995). Cytokines in inflammation. [Les cytokines de l'inflammation] *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales*, 189(4), 531-544.

Cavaillon, J. M. (2001). Pro- versus anti-inflammatory cytokines: Myth or reality. *Cellular and Molecular Biology* (Noisy-Le-Grand, France), 47(4), 695-702.

Cavaillon, J. M. (2005). Molecular mediators: Cytokines. *Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine* (2nd Edition, vol.8 ed., pp. 431-431-460). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag.

Checktetts, M., Turkyilmaz, I., Asar, NV. An investigation on the effect of scaling-induced surface roughness on bacterial adhesion in common fixed dental restorative materials. *J Proshtet Dent* 2014, 112:1265-1270.

Chehroudi, B., & Brunette, D. M. (2002). Subcutaneous microfabricated surfaces inhibit epithelial recession and promote long-term survival of percutaneous implants. *Biomaterials*, 23(1), 229-237.

Chehroudi, B., Gould, T. R., & Brunette, D. M. (1990). Titanium-coated micromachined grooves of different dimensions affect epithelial and connective-tissue cells differently in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research*, 24(9), 1203-1219.

Chehroudi, B., Gould, T. R., & Brunette, D. M. (1992). The role of connective tissue in inhibiting epithelial downgrowth on titanium-coated percutaneous implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 26(4), 493-515.

- Chien C. C., Liu K. T., Duh J. G., Chang K. W., Chung K. H.: Effect of nitride film coatings on cell compatibility, *Dental materials*, vol. 24, p. 986–993, 2008.
- Chevalier, J. (2006). What future for zirconia as a biomaterial? *Biomaterials*, 27(4), 535543.
- Chou, L., Firth, J. D., Uitto, V. J., & Brunette, D. M. (1995). Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts. *Journal of Cell Science*, 108 (Pt 4)(Pt 4), 1563-1573.
- Cho, YD., Shin, JC., Yoon, HI., Ku, Y., Ryoo, HM., Kim, DJ., Kim, DG., Han, JS. Characterization of human gingival fibroblasts on zirconia surfaces containing niobium oxide. *Materials*, 2015, 8:6018-6028.
- Christensen GJ. Choosing an all-ceramic restorative material: porcelain-fused-to-metal or zirconia-based? *J Am Dent Assoc*. 2007;138(5):662-5.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., & Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *The Journal of Cell Biology*, 133(6), 1403-1415.
- Clarke, I. C., Manaka, M., Green, D. D., Williams, P., Pezzotti, G., Kim, Y. H., et al. (2003). Current status of zirconia used in total hip implants. *The Journal of Bone and Joint Surgery.American Volume*, 85-A Suppl 4, 73-84.
- Cochran, D. L. (1994). Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough titanium. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 289-297.
- Cochran, D. L., Simpson, J., Weber, H. P., & Buser, D. (1994). Attachment and Growth of Periodontal Cells on Smooth and Rough Titanium. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* ., 289-297.
- Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res* 1998;40:1–11.
- Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res* 1998;40:1–11.
- Conner K, Sabatini R, Mealey B, Takacks V, Mills M, Cochran D. Guided bone regeneration around titanium plasma-sprayed, acid-etched and hydroxyapatite-coated implants in the canine model. *J Periodontol* 2003;74:658–68.

- Cook AD, Hrkach JS, Gao NN, Johnson IM, Pajvani UB, Cannizzaro SM, Langer R: Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *J Biomed Mater Res* 35: 513-523, 1997.
- Cho Y.D, Shin J.C, Yoon H.I, Ku Y, Ryoo H.M, Kim D.J, Kim D.G. Han J.S. Characterization of Human Gingival Fibroblasts on Zirconia Surfaces Containing Niobium Oxide. *Materials* 2015, 8, 6018-6028.
- Conover, W. J., & Iman, R. L. (1976). Some alternative procedures using ranks for analysis of experimental-designs. *Communications in Statistics*, 5(14), 1349.
- Conover, W. J., & Iman, R. L. (1981). Rank transformation as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *American Statistician*, the, 35(3), 124.
- Cooper, LF; Zhou, Y; Takebe, J; Guo, J; Abron, A; Holmen, A, et al. (2006). Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials*, 27, 926-936.
- Covacci V, Bruzzese N, Maccauro G, Andreassi C, Ricci GA, Piconi C, et al. In vitro evaluation of the mutagenic and carcinogenic power of high purity zirconia ceramic. *Biomater.* 1999;20:371-6.
- Ćalasan D. Uticaj hirurške tehnike ugradnje i mikro i makro dizajna implantata na njihovu stabilnost u bočnom segmentu gornje vilice: doktorska disertacija. Beograd: Stomatološki fakultet; 2014.
- Dahl JE, F rangou-Ployzois MJ, Polyzois GL. In vitro biocompatibility of denture relining materials. *Gerodontology*. 2006; 23: 17-22.
- Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:195–200.
- Dee KC, Puleo DA, Bizios R. Biocompatibility. In: *An introduction to tissue-biomaterial interactions*. Wiley-Liss. 2002; 173-183.
- Damji, A., Weston, L., & Brunette, D. M. (1996). Directed confrontations between fibroblasts and epithelial cells on micromachined grooved substrata. *Experimental Cell Research*, 228(1), 114-124.
- Damsky, C. H., & Ilic, D. (2002). Integrin signaling: It's where the action is. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(5), 594-602.
- De Groot K, Wolke JG, Jansen JA. Calcium phosphate coatings for medical implants. *Proc Inst Mech Eng* 1998;212:137–47.

- Degidi M., Artese L., Scarano A., Perrotti V., Gehrke P., and Piattelli A.: Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. *Journal of Periodontology* 2006; 77: pp. 73-80
- Denry I, Kelly JR. State of the art of zirconia for dental applications. *Dent Mater.* 2008;24(3):299-307.
- Deporter, D. A., Friedland, B., Watson, P. A., Pilliar, R. M., Howley, T. P., Abdulla, D., et al. (1986). A clinical and radiographic assessment of a porous-surfaced, titanium alloy dental implant system in dogs. *Journal of Dental Research*, 65(8), 1071-1077.
- Deporter, D. A., Watson, P. A., Pilliar, R. M., Howley, T. P., & Winslow, J. (1988). A histological evaluation of a functional endosseous, porous-surfaced, titanium alloy dental implant system in the dog. *Journal of Dental Research*, 67(9), 1190-1195.
- Di Carmine, M., Toto, P., Feliciani, C., Scarano, A., Tulli, A., Strocchi, R., et al. (2003). Spreading of epithelial cells on machined and sandblasted titanium surfaces: An in vitro study. *Journal of Periodontology*, 74(3), 289-295.
- Dion I, Bordenave L, Lefebvre F et al. Physico-chemistry and cytotoxicity of ceramics, Part II: Cytotoxicity of ceramics. *J Mater Sci Mater Med.* 1994;5:18-24
- Dvoranková B, Holíková Z, Vacík J, Königová R, Kapounková Z, Michálek J, Přádný M, Smetana K JR: Reconstruction of epidermis by grafting of keratinocytes cultured on polymer support - clinical study. *Int J Dermatol* 42: 219-223, 2003.
- Elshahawya W, Watanabeb I, Nakagawac M, Kramerd P. Fibroblasts attachment to CaCl₂ hydrothermally treated titanium implant. *Tanta Dental Journal*, 2014, 11(3): 223–226.
- Ergücü Z, Türkün LS. Surface Roughness of Novel Resin Composites Polished with One-step Systems. *Operative Dentistry.* 2007; 32(2): 185-192.
- Everts V, Delaissé JM, Korper W, et al: e bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation, *J Bone Miner Res* 17:77, 2002.
- Farwell, D. G., Shera, K. A., Koop, J. I., Bonnet, G. A., Matthews, C. P., Reuther, G. W., et al. (2000). Genetic and epigenetic changes in human epithelial cells immortalized by telomerase. *The American Journal of Pathology*, 156(5), 1537-1547.
- Ferguson SJ, Brogginini N, Wieland M, De Wild M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, et al. Biomechanical evaluation of the interfacial strength of a chemically modified sandblasted and

- acid-etched titanium surface. *Journal of Biomedical Materials Research – Part A*. 2006;78(2):291-7.
- Fischer, J., Stawarczyk, B., Hammerle, C. Flexural strength of veneering ceramics for zirconia. *Journal of dentistry*, 2008, 36(5):316-321.
- Fitzgerald, J. E., & Kreutzer, D. L. (1995). Localization of interleukin-8 in human gingival tissues. *Oral Microbiology and Immunology*, 10(5), 297-303.
- Folkman, J., & Moscona, A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature*, 273(5661), 345-349.
- Gadelmawla, ES; Koura, MM; Maksoud, TMA; Elewa, IM. & Soliman, HM. (2002). Roughness parameters. *Journal of Materials Processing Technology*, 123, 133-145.
- Gasparoni, A., Squier, C. A., & Fonzi, L. (2005). Cytokeratin changes in cell culture systems of epithelial cells isolated from oral mucosa: A short review. *Italian Journal of Anatomy and Embryology = Archivio Italiano Di Anatomia Ed Embriologia*, 110(2), 75-82.
- Geng JP, Xu DW, Tan KB, Liu GR. Finite element analysis of an osseointegrated stepped screw dental implant. *The Journal of oral implantology*. 2004;30(4):223-33.
- Geng JP, Ma QS, Xu W, Tan KBC, Liu GR. Finite element analysis of four thread-form configurations in a stepped screw implant. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2004;31(3):233-9.
- Ghinea R, Ugarte-Alvan L, Yebra A, Pecho EO, Paravina DR, Mar Perez M. Influence of surface roughness on the color of dental-resin composites. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2011; 12(7): 552–562.
- Glauser, R., Sailer, I., Wohlwend, A., Studer, S., Schibli, M., & Schärer, P. (2004). Experimental Zirconia Abutments for Implant-Supported Single-Tooth Restorations in Esthetically Demanding Regions: 4-Year Results of a Prospective Clinical Study. *International Journal of Prosthodontics*, 285-290.
- Glauser, R., Sailer, I., Wohlwend, A., Studer, S., Schibli, M., & Scharer, P. (2004). Experimental zirconia abutments for implant-supported single-tooth restorations in esthetically demanding regions: 4-year results of a prospective clinical study. *The International Journal of Prosthodontics*, 17(3), 285-290.
- Gordon MK, Hahn RA: Collagens, *Cell Tissue Res* 339:247, 2010. Laird DW: Life cycle of connexins in health and disease, *Biochem J* 394:527, 2006.

- Gorski JP: Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms, *Crit Rev Oral Biol Med* 9:201, 1998.
- Gotfredsen K, Wennerberg A, Johansson C, Skovgaard LT, Hjørtting-Hansen E. Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: an experimental study with rabbits. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1223–31.
- Greider, C. W. (1991). Telomeres. *Current Opinion in Cell Biology*, 3(3), 444-451.
- Grinnell, F. (1978). Cellular adhesiveness and extracellular substrata. *International Review of Cytology*, 53, 65-144.
- Gristina, A. (2004). Biomaterial-centered infection: Microbial adhesion versus tissue integration. 1987. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (427)(427), 4-12.
- Groessner-Schreiber, B., Hannig, M., Duck, A., Griepentrog, M., & Wenderoth, D. F. (2004). Do different implant surfaces exposed in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities? *European Journal of Oral Sciences*, 112(6), 516-522.
- Grossner-Schreiber, B., Griepentrog, M., Haustein, I., Müller, WD., Lange, KP., Briedigkeit, H et al. Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 2001, 12: 543-551.
- Grossner-Schreiber, B., Herzog, M., Hedderich, J., Duck, A., Hannig, M., & Griepentrog, M. (2006). Focal adhesion contact formation by fibroblasts cultured on surface modified dental implants: An in vitro study. *Clinical Oral Implants Research*, 17(6), 736-745.
- Han YK, Kwon JW, Kim JS, Cho CS, Wee WR, Lee JH: In vitro and in vivo study of lens refilling with poloxamer hydrogel. *Br J Ophthalmol* 87: 1399-1402, 2003.
- Han S. K., Chang Y. J., Kim Y. S., Lee J. Y., Lim Y. W.: Effect of Surface Modification on Biomechanical Properties of Titanium Alloy Ti6Al4V, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 7, p. 338-343, 2010.
- Hansson S, Norton M. The relation between surface roughness and interfacial shear strength for bone-anchored implants. A mathematical model. *J Biomech* 1999;32:829–36.
- Hupp JR, Ellis E, Tucker MR. *Contemporary Oral and Maxillofacial surgery*. 6th ed. St. Louis: Mosby; 2014

- Hamilton, D. W., Chehroudi, B., & Brunette, D. M. (2007). Comparative response of epithelial cells and osteoblasts to microfabricated tapered pit topographies in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 28(14), 2281-2293.
- Heurich E, Beyer M, Jandt KD, Reichert J, Herold V, Schnabelrauch M, Sigusch BW. Quantification of dental erosion--a comparison of stylus profilometry and confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Dent Mater*. 2010; 26(4): 326-36.
- Hong, H. L., & Brunette, D. M. (1987). Effect of cell shape on proteinase secretion by epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 87 (Pt 2)(Pt 2), 259-267.
- Hormia, M., Kononen, M., Kivilahti, J., & Virtanen, I. (1991). Immunolocalization of proteins specific for adherens junctions in human gingival epithelial cells grown on differently processed titanium surfaces. *Journal of Periodontal Research*, 26(6), 491-497.
- Huang YH, Xiropaidis AV, Sorensen RG, Albandar JM, Hall J, Wikesjo UM. Bone formation at titanium porous oxide(TiUnite) oral implants in type IV bone. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:105–11.
- Huang F M, Chang Y C. Cytotoxicity of resinbased restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94: 361-365.
- International Standards Organization (1994) ISO10993. *Biological evaluation of medical devices*. Geneva, Switzerland.
- International Standard ISO 7405. Preclinical Evaluation of Biocompatibility of Medical Devices Used in Dentistry – Test Methods for Dental Materials. Geneva: International Organization for Standardization, 1997.
- Irvine DJ, Mayes AM, Griffith LG: Nanoscale clustering of RGD peptides at surfaces using Comb polymers. 1. Synthesis and characterization of Comb thin films. *Biomacromolecules* 2: 85-94, 2001.
- Ito A, Tateishi T, Niwa S, Tange S. In vitro evaluation of the cytocompatibility of wear particles generated by UHMWPE- zirconia friction. *Clin Mat*. 1993;12:203-9.
- Ivković N, Božović Đ, Ristić S, Mirjanić V, Janković O. The Residual Monomer in Dental Acrylic Resin and its Adverse Effects. *Contemporary materials*. 2013; 4(1) 84-91.
- Jakovac M. Utjecaj toplinske obradbe na mikrostrukturne promjene i ostala svojstva cirkonijeve keramike (disertacija). Zagreb: Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2008.

- Jemt T, Lekholm U, Adell R. Osseointegrated implants in the treatment of partially edentulous patients: a preliminary study on 876 consecutively placed fixtures. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 1989;4(3):211-7.
- Jevremović PD, Ajduković RZ, Stanković DS, Radosavljević DR. Profilometric and SEM analyses of composite surfaces after cement excess removal. *Hem Ind*. 2012; 66(1) 59–66.
- Jones, J. C., Hopkinson, S. B., & Goldfinger, L. E. (1998). Structure and assembly of hemidesmosomes. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 20(6), 488-494.
- Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L 929 cells, Effect of polymerization cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology*. 2007; 24:52-57.
- Jurišić M, Stamenković D, Marković A, Todorović A, Dimitrijević B, Leković V, et al. *Oralna implantologija*. Beograd: Stomatološki fakultet; 2008.
- Jurisić V, Bumbasirević V. In vitro assays for cell determination. *Acta Oncol* 2008; 16: 49-54.
- Karsenty G: Genetic control of bone formation, *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:629, 2009.
- Karsenty G, Oury F: The central regulation of bone mass: the first link between bone remodeling and energy metabolism, *J Clin Endocrinol Metab* 95:4795, 2010.
- Kay HB. Free-standing versus implant-tooth-interconnected restorations: understanding the prosthodontic perspective. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 1993;13(1):47-69;
- Kawahara, H., Kawahara, D., Hashimoto, K., Takashima, Y., & Ong, J. L. (1998). Morphologic studies on the biologic seal of titanium dental implants. report I. in vitro study on the epithelialization mechanism around the dental implant. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 13(4), 457-464.
- Khalili, A., Ahmad, M. A review of cell adhesion studies for biomedical and biological application. *Int. J. Mol. Sci*. 2015, 16: 18149-18184.
- Kim JH, Kim SC: PEO-grafting on PU/PS IPNs for enhanced blood compatibility-effect of pendant length and grafting density. *Biomaterials* 23: 2015-2025, 2002.
- Kim BS, Nikolovski J, Bonadio J, Smiley E, Mooney DJ. Engineered smooth muscle tissues: regulating cell phenotype with the scaffold. *Exp Cell Res* 251: 318-328, 1999.

- Kinch, M. S., Petch, L., Zhong, C., & Burridge, K. (1997). E-cadherin engagement stimulates tyrosine phosphorylation. *Cell Adhesion and Communication*, 4(6), 425-437.
- Klein-Nulend J, Nijweide PJ, Burger EH: Osteocyte and bone structure, *Curr Osteopor Rep* 1:5, 2003.
- Knežević G. Osnove dentalne implantologije. Zagreb: Školska knjiga; 2002.
- Kobayashi T, Kronenberg H: Minireview: transcriptional regulation in development in bone, *Endocrinol* 146:1012, 2005.
- Koçak S, Erten H, Baris E, Türk S, Alaçam T. Evaluation of the biocompatibility of experimentally manufactured portland cement: An animal study. *J Clin Exp Dent*. 2014; 6(1) 17-21.
- Kollar A, Huber S, Mericske E, Mericske- Stern R. Zirconia for teeth and implants: a case series. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2008;28(5):479-87.
- Kostić M, Krunić N, Najman S. Savremeni aspekt ispitivanja biokompatibilnosti materijala u stomatologiji. *Acta Stomatologica Naissi*. 2010; 26(62) 1007 – 1016.
- Kostoryz LE, Tong YP, Chappelow CC, Eick DJ, Glaros GA, Yourtee MD. In vitro cytotoxicity of solid epoxy-based dental resins and their components. *Dental Materials*. 1999; 15(5): 363-73.
- Lamandé SR, Bateman JF: Procollagen folding and assembly: The role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones, *Cell & Dev Biol* 10:455, 1999.
- Lauer, G., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Otten, J. E., Hubner, U., Schmelzeisen, R., & Schilli, W. (2001). The titanium surface texture effects adherence and growth of human gingival keratinocytes and human maxillar osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials*, 22(20), 2799-2809.
- Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials*. 2007;23(7):844-54.
- Leblebicioglu, B., Rawal, S., & Mariotti, A. (2007). A review of the functional and esthetic requirements for dental implants. *Journal of the American Dental Association* (1939), 138(3), 321-329.
- Leblond CP: Synthesis and secretion of collagen by cells of connective tissue, bone, and dentin, *Anat Rec* 224:123, 1989.

- Lee, E. A., & Jun, S. K. (2000). Achieving aesthetic excellence through an outcomebased restorative treatment rationale. *Practical Periodontics and Aesthetic Dentistry : PPAD*, 12(7), 641-8; quiz 650.
- Lee D.W, Kim J.G, Kim M.K, Ansari S, Moshaverinia A, Choi, S.H, Ryu J.J. Effect of laser-dimpled titanium surfaces on attachment of epithelial-like cells and fibroblasts. *J Adv Prosthodont*. 2015 Apr; 7(2): 138–145.
- Lekholm U, Zarb G. Patient selection and preparation. In: Brånemark P-I, Zarb GA, Albrektsson T, editors. *Tissue-integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry*. Chicago: Quintessence; 1985. p. 199-210.
- Lindhe, J., & Berglundh, T. (1998). The interface between the mucosa and the implant. *Periodontology 2000*, 17, 47-54.
- Lindhe, J., Berglundh, T., Ericsson, I., Liljenberg, B., & Marinello, C. (1992). Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clinical Oral Implants Research*, 3(1), 9-16.
- Linkevicius, T., & Apse, P. (2008). Influence of abutment material on stability of periimplant tissues: A systematic review. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 23(3), 449-456.
- Littell, R. C., Milliken, G. A., Stroup, W. W., Wolfinger, R. D., & Schabenberger, O. (2006). *SAS® for mixed models (2nd ed. ed.)*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Liu, S. C., & Karasek, M. (1989). Isolation and growth of adult human epidermal keratinocytes in cell culture. 1978. *The Journal of Investigative Dermatology*, 92(4 Suppl), 164S; discussion 165S.
- Liu VA, Jastromb WE, Bhatia SN: Engineering protein and cell adhesivity using PEO-terminated triblock polymers. *J Biomed Mater Res* 60: 126-134, 2002.
- Liu, M., Zhou, J., Yang, Y., Zheng, M., Yang, J., Tan, J. Surface modification of zirconia with polydopamin to enhance fibroblast response and decrease bacterial activity in vitro: a potential tehniqe for soft tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2015, 136:74-83.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L. S., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). *Molecular cell biology (4th edition ed.)*. 41 Madisoehn Avenue, New York, New York 10010: W. H. Freeman and Company.

- Lohbauer, U., Reich, S. Antagonist wear of monolithic zirconia crowns after 2 years. *Clin Oral Invest* (2017) 21: 1165.
- Lohmann, C. H., Dean, D. D., Koster, G., Casasola, D., Buchhorn, G. H., Fink, U., et al. (2002). Ceramic and PMMA particles differentially affect osteoblast phenotype. *Biomaterials*, 23(8), 1855-1863.
- Lossdorfer S., Schwartz Z., Wang L, Lohmann C. H., Turner J. D., Wieland M., Cochran D. L., Boyan B. D.: Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 70, p. 361-369, 2004.
- Lutolf MP, Lauer-Fields JL, Schmoekel HG, Metters AT, Weber FE, Fields GB, Hubbell JA: Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5413-5418, 2003.
- Maddikeri, R. R., Tosatti, S., Schuler, M., Chessari, S., Textor, M., Richards, R. G., et al. (2008). Reduced medical infection related bacterial strains adhesion on bioactive RGD modified titanium surfaces: A first step toward cell selective surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 84(2), 425-435.
- Manicone, P. F., Rossi Iommetti, P., & Raffaelli, L. (2007). An overview of zirconia ceramics: Basic properties and clinical applications. *Journal of Dentistry*, 35(11), 819-826. Marks SC Jr: The structural basis for bone cell biology, *Acta Med Dent Helv* 2:141, 1997.
- Mann BK, West JL: Cell adhesion peptides alter smooth muscle cell adhesion, proliferation, migration, and matrix protein synthesis on modified surfaces and in polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 60: 86-93, 2002.
- Martin TJ, Ng KW: Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity, *J Cell Biochem* 56:357, 1994.
- Marković D, Radovanović A, Kovačević-Filipović M, Francuski J, Todorović V. Histološke karakteristike mekih tkiva posle implantacije biokeramičkih materijala I procena biokompatibilnosti. *Vet Glasnik*. 2012; 66 (3-4) 285 - 297.
- Moharamzadeh K, Brook MI, Van Noort R. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials*. 2009; 2(2) 514-548.
- Marmary, Y. a. (1976). Differences in vitro between cells derived from periodontal ligament and skin of *Macaca irus*. *Archives of oral biology*, 709-716.

- Marmary, Y., Brunette, D. M., & Heersche, J. N. (1976). Differences in vitro between cells derived from periodontal ligament and skin of macaca irus. *Archives of Oral Biology*, 21(12), 709-716.
- Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *ClinOral Implants Res*. 2005;16:650–656.
- Massaro C, Rotolo F, De Riccardis F, Milella E, Napoli A, Wieland M, et al. Comparative investigation of the surface of commercial titanium dental implants. Part 1: chemical composition. *J Mater Sci Mater Med* 2002;13:535–48.
- Masini, V. (2005). Versatility of transmucosal implants with zirconium ring. *Minerva stomatologica*, Vol. 54(1-2), 69-69-77.
- McGrew, Roderick “*Encyclopedia of Medical History*”, New York: McGraw Hill, 1985. 1.
- Mendes AP, Barceleiro Mde O, dos Reis RS; Bonato LL; Dias KR.. Changes in surface roughness and color stability of two composites caused by different bleaching agents. *Braz Dent J*. 2012; 23 (6): 659-66.
- Michaels, C. a. (1989). In vitro connective tissue cell attachment to cp Ti. *J Dent Res*, 276.
- Misch, C.E. Density of bone: effect on treatment plans, surgical approach, healing, and progressive bone loading. *The International journal of oral implantology : implantologist*. 1990;6(2):23-31.
- Misch, C. E. (2005). *Dental implant prosthetics* (1st edition ed.). St louis, Missouri 63146: Elsevier MOSBY.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Burbelo, P. D., Akiyama, S. K., et al. (1995). Integrin function: Molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *The Journal of Cell Biology*, 131(3), 791-805.
- Moatt P, Gaumont MH, Salois P, et al: Bril: a novel bone-specific modulator of mineralization, *J Bone Miner Res* 23:1497, 2008.
- 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(10), 658-663.
- Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez B. S., Arvidson K: Determining optimal surface roughness of TiO(2) blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone, *Clinical Oral Implants Research*, vol. 12, p. 515-525, 2001.

- Mustafa, K., Oden, A., Wennerberg, A., Hultenby, K., Arvidson, K. The influence of surface topography of ceramics abutments on the attachment and proliferation of human oral fibroblasts. *Biomaterials* 2005, 26:373-381.
- Mustafa, K., Wennerberg, A., Arvidson, K., Messelt, EB., Haag, P., Karlsson, S. Influence of modifying and veneering the surface of ceramic abutments on cellular attachment and proliferation. *Clin Oral Impl Res* 2008, 19:1178-1187.
- Myshin, H. L., & Wiens, J. P. (2005). Factors affecting soft tissue around dental implants: A review of the literature. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 94(5), 440-444.
- Nelson R.F.A. Silva , Irena Sailer , Yu Zhang , Paulo G. Coelho , Petra C. Guess , Anja Zembic and Ralf J. Kohal, Performance of Zirconia for Dental Healthcare, *Materials* 2010, 3(2), 863-896
- Niederaurer, GG.,McGee, TD., Keller, JC., Zaharias, JC. Attachment of epithelial cells and fibroblasts to ceramic materials. *Biomaterials* 1994, 15(5):342-352.
- Niessen CM, Gottardi CJ: Molecular component of the adherens junctions, *Biochim Biophys Acta* 1778: 562, 2008.
- Nothdurft F, Fontana D, Ruppenthal S, May A, Aktas C, Mehraein Y. Differential Behavior of Fibroblasts and Epithelial Cells on Structured Implant Abutment Materials: A Comparison of Materials and Surface Topographies. *Clinical Implant Dentistry*. 2015;17(6):1237–1249.
- Norton MR, Gamble C. Bone classification: An objective scale of bone density using the computerized tomography scan. *Clinical Oral Implants Research*. 2001;12(1):79-84.
- Noth U, Tuli R, Osyczka AM, Danielson KG, Tuan RS. In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 8: 131-144, 2002.
- Nothdurft, F., Fontana, D., Ruppenthal, S., May, A., Aktas, C., Mehraein, Y., Lipp, P., Kaestner, L. Different behaviour of fibroblasts and epithelial cells on structured implant abutment materials: a comparison of materials and surface topographies. *Clin Impl Dent Rel Res*. 2015, 17(6):1237-1249.
- Oates, TW., Maller, SC., West, J., Steffensen, B. Human gingival fibroblast integrin subunit expression on titanium implant surfaces. *J Periodontol* 2005, 76:1743-1750.
- Pae, A., Lee, H., Kim, HS., Kwon, YD., Woo, YH. Attachment and growth behavior of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Biomed Mater* 2009, 4:025005

- Park, J. C., Kim, H. M., & Ko, J. (1998). Effects of extracellular matrix constituents on the attachment of human oral epithelial cells at the titanium surface. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 13(6), 826-836.
- Park YD, Tirelli N, Hubbell JA: Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating network. *Biomaterials* 24: 893-900, 2003.
- Par tt AM: The bone remodeling compartment: a circulatory function for bone lining cells, *J Bone Miner Res* 16:1583, 2001.
- Perala, D. G., Chapman, R. J., Gelfand, J. A., Callahan, M. V., Adams, D. F., & Lie, T. (1992). Relative production of IL-1 beta and TNF alpha by mononuclear cells after exposure to dental implants. *Journal of Periodontology*, 63(5), 426-430.
- Pavlović Ž. Karakterizacija površinske strukture neštampajućih elemenata CTP termalne štamparske forme za ofset štampu. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Fakultet tehničkih nauka: Departman za grafičko inženjerstvo i dizajn, 2012.
- Polyzois GL. In vitro evaluation of dental materials. *Clinical Materials*. 1994; 16: 21-60.
- Paepegaey AM, Barker ML, Bartlett DW, Mistry M, West NX, Hellin N, Brown LJ, Bellamy PG. Measuring enamel erosion: a comparative study of contact profilometry, non-contact profilometry and confocal laser scanning microscopy. *Dental Mater*. 2013; 29(12): 1265-1272.
- Perović J: Oralna implantologija, 2004, Nauka, Beograd
- Piattelli, A., Pontes, AEF., Degidi, M., Iezzi, G. Histological studies on osteointegration: Soft tissue response to implant surfaces and components. A review. *Dental Materials*, 2011, 27(1):53-60.
- Pingel, L.C., Kohlgraf K.G., Hansen C.J., Eastman C.G., Dietrich D.E., Burnell K.K., et al. (2008). Human beta-defensin 3 binds to hemagglutinin B (rHagB), a non-fimbrial adhesin from *Porphyromonas gingivalis*, and attenuates a pro-inflammatory cytokine response. *Immunology and Cell Biolgy* 86,643-649.
- Pizzofferato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola C. R, Granchi D and Savalino L. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clinical materials* 1994;15:173-190.
- Presland RB, Dale BA: Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease, *Crit Rev Oral Biol Med* 11:383, 2000.
- Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J: *Cell biology*, Philadelphia, 2008, Saunders.
- Raiz LG: Pathogenesis of osteoporosis: concepts, con icts, and prospects, *J Clin Invest* 115:3318, 2005.

- Regina L, Messer W, Lockwood P, Wataha J, Lewis J, Norris S, Bouillaquet S. In vitro cytotoxicity of traditional versus contemporary dental ceramics. *J Prosthet Dent*. 2003;90(5):452-8.
- Rodriguez JM, Curtis RV, Bartlett DW. Surface roughness of impression materials and dental stones scanned by non-contacting laser profilometry. *Dent Mater*. 2009; 25(4):500-5.
- Roger A, Eastell R: Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor κ B ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment, *J Clin Endocrinol Metab* 90:6323, 2005.
- Rompen, E., Domken, O., Degidi, M., Pontes, AE., Piattelli, A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connection on soft tissue integration: a literature review. *Clin Oral Implant Res* 2006, 17(suppl 2):55-67.
- Roodman GD: Osteoclast differentiation and activity, *Biochem Soc Trans* 26:7, 1998.
- Rupp, F; Scheideler, L; Olshanska, N; de Wild, M; Wieland, M. & Geis-Gerstorfer, J. (2006). Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res A*, 76, 323-334.
- Salo J, Lehenkari P, Mulari M, et al: Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis, *Science* 276:270, 1997. Young MF: Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis, *Osteoporos Int* 14(suppl 3):S35, 2003.
- Scarano, A., Piattelli, M., Caputi, S., Favero, GA, Pittelli, A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide discs: an in vivo human study. *J Periodontology* 2004, 75:292-296.
- Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. Biocompatibility of dental materials. 1st ed. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag GmbH; 2009.
- Schmalz G, Gröppel F, Hiller KA, Galler MK. Three-Dimensional Human Cell Cultures for Cytotoxicity Testing of Dental Filling Materials. *Acta Stomatologica Croatica*. 2014; 48(2) 99-108.
- Schroeder HE: *Diferentiation of human oral stratified epithelia*, Basel, Switzerland, 1981, S Karger.
- Sela M. N., Badihi L., Rosen G., Steinberg D., Kohavi D.: Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces, *Clinical Oral Implants Research*, vol. 18, p. 630-638, 2007.

- Sipahi C, Ozen J, Ural AU, Dalkiz M, Beydemir B. The effect of two fibre impregnation methods on the cytotoxicity of glass and carbon fibre-reinforced acrylic resin denture base material on oral epithelial cells and fibroblasts. *J Oral Rehabil* 2006; 33: 666-673.
- Smetana K JR, Vacik J: Anionic polymers for implantation. *Ann N Y Acad Sci* 831: 95-100, 1997.
- Sitbon, YA. Epithelial cells attachment on five different implant abutment surface attachments. MS thesis, University of Iowa, 2009.
- Stamenković D. i sar. Gradivni stomatološki materijali (dostignuća i perspektive): Stomatološki fakultet Beograd 2007; 37-62.
- Stawarczyk, B., Ozcan, M., Schmutz, F., Trottmann, A., Roos, M., Hammerle, CH. Two-body wear of monolithic, veneered and glazed zirconia and their corresponding enamel antagonists. *Acta Odontol Scand* 2013, 71:102-112.
- Steed E, Balda MS, Matter K: Dynamics and functions of tight junctions, *Trends Cell Biol* 20:142, 2010.
- Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Roser K, Wennerberg A, Albrektsson T. Oxidized implants and their influence on the bone response. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12:1025– 31.
- Sul YT, Johansson C, Wennerberg A, Cho LR, Chang BS, Albrektsson T. Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:349–59.
- Sul YT, Johansson CB, Roser K, Albrektsson T. Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodized implants. *Biomaterials* 2002;23:1809–17.
- Squier C, Brogden K: *Human oral mucosa, development, structure & function*, Oxford, UK, 2011, Wiley-Blackwell.
- Szmukler-Moncler, S; Perrin, D; Ahossi, V; Magnin, G. & Bernard, JP. (2004). Biological properties of acid etched titanium implants: effect of sandblasting on bone anchorage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 68, 149-159.
- Tassiopoulos AK, Greisler HP: Angiogenic mechanisms of endothelialization of cardiovascular implants: a review of recent investigative strategies. *J Biomater Sci Polym Ed* 11: 1275-1284, 2000.
- Testori T, Wiseman L, Woolfe S, Porter S. A prospective multicenter clinical study of the Osseotite implant: four-year interim report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:193– 200.

Tete, S., Zizzari, VL., Borelli, B., De Colli, M., Zara, S., Sorrentino, S., Scarano, A., Gherlone, E., Cataldi, A., Zarone, F. Proliferation and adhesion capability of human gingival fibroblasts onto zirconia, lithium disilicate and feldspatic ceramics in vitro. *Dental materials Journal*, 2014, 33(1):7-15.

Thomason HA, Scothern A, McHarg S, Garrod DR: Desmosome: adhesive strength and signalling in health and disease, *Biochem J* 429:419, 2010.

Quirynen, M., van der Mei, H. C., Bollen, C. M., Schotte, A., Marechal, M., Doornbusch, G. I., et al. (1993). An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *Journal of Dental Research*, 72(9), 1304-1309.

Quirynen, M., Bollen, CM., Papaionannou, W., Van Eldere, J., Van Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short term observation. *Int J Oral Maxillofacial Implants* 1996; 11:169-178.

Raffaelli, L., Iommetti, PR., Piccioni, E., Toesca, A., Serini, S., Resci, F., Missori, M., de Spirito, M., Manicone, PF., Calviello, G. Growth, viability, adhesion potential, and fibronectin expression in fibroblasts cultured on zirconia or feldspatic ceramic in vitro. *J Biomed mater res.* 2008, 86A:959-968.

Raisanen, L., Kononen, M., Juhanoja, J., Varpavaara, P., Hautaniemi, J., Kivilahti, J., et al. (2000). Expression of cell adhesion complexes in epithelial cells seeded on biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 49(1), 79-87.

Refai, A. K., Textor, M., Brunette, D. M., & Waterfield, J. D. (2004). Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 70(2), 194-205.

Richards, RG. The effects of surface roughness on fibroblast adhesion in vitro. *Injury* 1996, 27(3):38-43.

Rimondini, L., Cerroni, L., Carrassi, A., & Torriceni, P. (2002). Bacterial Colonization of Zirconia Ceramic Surfaces: An In Vitro and In Vivo Study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* . , 793-798.

Ruggeri, A., Franchi, M., Marini, N., Trisi, P., & Piatelli, A. (1992). Supracrestal circular collagen fiber network around osseointegrated nonsubmerged titanium implants. *Clinical Oral Implants Research*, 3(4), 169-175.

Ruoslahti, E., & Pierschbacher, M. D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science (New York, N.Y.)*, 238(4826), 491-497.

- Sabaliauskas, V., Juciute, R., Bukelskiene, V., Rutkunas, V., Triumpaite-Vanagiene, R., Puriene, A. In vitro evaluation of cytotoxicity of permanent prosthetic materials. *Stomatologija* 2011, 13:75-80.
- Sader M. S., Balduino A, Soares Gde A, Borojevic R: Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation, *Clinical Oral Implants Research*, vol. 16, p. 667-675, 2005.
- Scarano, A. a. (2004). Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *Journal of periodontology*, 292-296.
- Scarano, A., Piattelli, M., Caputi, S., Favero, G. A., & Piattelli, A. (2004). Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: An in vivo human study. *Journal of Periodontology*, 75(2), 292-296.
- Schaller, M. D. (2001). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1540(1), 1-21.
- Schlaepfer, D. D., Hauck, C. R., & Sieg, D. J. (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 71(3-4), 435-478.
- Schmalz, G., Schuster, U., & Schweikl, H. (1998). Influence of metals on IL-6 release in vitro. *Biomaterials*, 19(18), 1689-1694.
- Schroeder, A., van der Zypen, E., Stich, H., & Sutter, F. (1981). The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *Journal of Maxillofacial Surgery*, 9(1), 15-25.
- Schuler, M. a. (2006). Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: A cell morphology study. *Biomaterials*, 4003-4015.
- Schuler, M., Owen, G. R., Hamilton, D. W., de Wild, M., Textor, M., Brunette, D. M., et al. (2006). Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: A cell morphology study. *Biomaterials*, 27(21), 4003-4015.
- Schupbach, P., & Glauser, R. (2007). The defense architecture of the human periimplant mucosa: A histological study. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 97(6 Suppl), S1525.
- Shiraiwa, M., Goto, T., Yoshinari, M., Koyano, K., & Tanaka, T. (2002). A study of the initial attachment and subsequent behavior of rat oral epithelial cells cultured on titanium. *Journal of Periodontology*, 73(8), 852-860.
- Silva, V. V., Lameiras, F. S., & Lobato, Z. I. (2002). Biological reactivity of zirconiahydroxyapatite composites. *Journal of Biomedical Materials Research*, 63(5), 583-590.

- Simion, M., Baldoni, M., & Rossi, P. (1991). A study on the attachment of human gingival cell structures to oral implant materials. *The International Journal of Prosthodontics*, 4(6), 543-547.
- Soon, G., Pinnguan-Murphy, B., Lai, KW., Akbar, SA. Review of zirconia based ceramics: surface modification and cellular response. *Ceramics International* 2016, 42:12543-12555.
- Spyrou, P., Papaioannou, S., Hampson, G., Brady, K., Palmer, R. M., & McDonald, F. (2002). Cytokine release by osteoblast-like cells cultured on implant discs of varying alloy compositions. *Clinical Oral Implants Research*, 13(6), 623-630.
- Squier, C. A., & Collins, P. (1981). The relationship between soft tissue attachment, epithelial downgrowth and surface porosity. *Journal of Periodontal Research*, 16(4), 434-440.
- Stamenković D. Stomatološki materijali. Knj. 2. Beograd: Stomatološki fakultet; 2012.
- Stanford, C. M. (2006). Advancements in implant surface technology for predicable longterm results
- Stanford, C. M., Solursh, M., & Keller, J. C. (1999). Significant role of adhesion properties of primary osteoblast-like cells in early adhesion events for chondroitin sulfate and dermatan sulfate surface molecules. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47(3), 345-352.
- Steflik, D. E., McKinney, R. V., Sisk, A. L., Koth, D. L., Singh, B. B., & Parr, G. R. (1990). Ultrastructural investigations of the bone and fibrous connective tissue interface with endosteal dental implants. *Scanning Microscopy*, 4(4), 1039-47; discussion on 1047-8.
- Sullivan, R. M. (2001). Implant dentistry and the concept of osseointegration: A historical perspective. *Journal of the California Dental Association*, 29(11), 737-745.
- Swab, J. J. (1991). Low-temperature degradation of Y-TZP materials. *Journal of Materials Science*, 26(24), 6706.
- Takamori, ER., Cruz, R., Goncalvez, F., Zanetti, RV., Zanetti, A., Granjeiro, JM. Effects of roughness of zirconia and titanium on fibroblast adhesion. *Artificial organs*, 2008, 32(4):305-309.
- Takata, T., Katauchi, K., Akagawa, Y., & Nikai, H. (1994). New connective tissue attachment formation on various biomaterials implanted in roots. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 9(1), 77-84.
- Teughels, W. a. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical oral implants research*, 68-81.

- Thomsen, P., Larsson, C., Ericson, L. E., Sennerby, L., Lausmaa, J., & Kasemo, B. (1997). Structure of the interface between rabbit cortical bone and implants of gold, zirconium and titanium. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 8(11), 653-665.
- Torricelli, P., Verne, E., Brovarone, C. V., Appendino, P., Rustichelli, F., Krajewski, A., et al. (2001). Biological glass coating on ceramic materials: In vitro evaluation using primary osteoblast cultures from healthy and osteopenic rat bone. *Biomaterials*, 22(18), 2535-2543.
- Tosatti, S., De Paul, S. M., Askendal, A., VandeVondele, S., Hubbell, J. A., Tengvall, P., et al. (2003). Peptide functionalized poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) on titanium: Resistance to protein adsorption in full heparinized human blood plasma. *Biomaterials*, 24(27), 4949-4958.
- Triwatana, P., Nagaviroj, N., Tulapornchai, C. Clinical performance and failures of zirconia-based fixed partial dentures: A review literature. *J Adv Prosthodont*, 2012; 4(2):76-83.
- van Brakel, R., Cune, MS., van Winkelhoff, AJ., de Puter, C., Verhoeven, JW., van der Reiden, W. Early bacterial colonization and soft tissue health around zirconia and titanium abutments: an in vivo study in man. *Clin Oral Impl Res* 2011, 22:571-577.
- VandeVondele, S., Voros, J., & Hubbell, J. A. (2003). RGD-grafted poly-L-lysine-graft(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(7), 784-790.
- Wang DA, Ji J, Sun YH, Shen JC, Feng LX, Elisseeff JH: In situ immobilization of proteins and RGD peptide on polyurethane surfaces via poly(ethylene oxide) coupling polymers for human endothelial cell growth. *Biomacromolecules* 3: 1286-1295, 2002.
- Wang N, Naruse K, Stamenovic D, Fredberg JJ, Mijailovich SM, Tolic-Norrelykke IM, Polte T, Mannix R, Ingber DE: Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7765-7770, 2001.
- Watacha J. C. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent* 2001;86:203-209.
- Watacha CJ. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dental Materials*. 2012; 28(1) 23-40.
- Watkin, A., & Kerstein, R. B. (2008). Improving darkened anterior peri-implant tissue color with zirconia custom implant abutments. *Compendium of Continuing Education in Dentistry* (Jamesburg, N.J.: 1995), 29(4), 238-40, 242.

- Welander, M., Abrahamsson, I., & Berglundh, T. (2008). The mucosal barrier at implant abutments of different materials. *Clinical Oral Implants Research*, 19(7), 635-641. doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01543.x
- Wennerberg A, Albrektsson T, Albrektsson B, Krol JJ. Histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implant Res* 1996;6:24–30.
- Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:11–9.
- Wennerberg A., Albrektsson T: Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces, *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, vol. 15, p. 331-344, 2000.
- Wennerberg, A., Sennerby, L., Kultje, C., & Lekholm, U. (2003). Some soft tissue characteristics at implant abutments with different surface topography. A study in humans. *Journal of Clinical Periodontology*, 30(1), 88-94.
- Wennerberg, A., Albrektsson, T. On implant surfaces: review of current knowledge and opinions. *Int J Oral maxillofacial implants* 2010, 25: 63-74.
- Werb, Z., Hembry, R. M., Murphy, G., & Aggeler, J. (1986). Commitment to expression of the metalloendopeptidases, collagenase and stromelysin: Relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. *The Journal of Cell Biology*, 102(3), 697-702.
- Wheeler, S. L., Vogel, R. E., & Casellini, R. (2000). Tissue preservation and maintenance of optimum esthetics: A clinical report. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 15(2), 265-271.
- Yang, Y., Zhou, J., Liu, X., Zheng, M., Yang, J., Tan, J. Ultraviolet light-treated zirconia with different roughness affects function of human gingival fibroblasts in vitro: the potential surface modification developed from implant to abutment. *J Biomed Mater Res part B* 2015 2013B:116-124.
- Zarb, G. A., & Schmitt, A. (1993a). The longitudinal clinical effectiveness of osseointegrated dental implants in anterior partially edentulous patients. *The International Journal of Prosthodontics*, 6(2), 180-188.
- Zarb, G. A., & Schmitt, A. (1993b). The longitudinal clinical effectiveness of osseointegrated dental implants in posterior partially edentulous patients. *The International Journal of Prosthodontics*, 6(2), 189-196.

- Zarb, G. A., Smith, D. C., Levant, H. C., Graham, B. S., & Staatsexamen, W. Z. (1979). The effects of cemented and uncemented endosseous implants. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 42(2), 202-210.
- Zarb, G. A., Zarb, F. L., & Schmitt, A. (1987). Osseointegrated implants for partially edentulous patients. interim considerations. *Dental Clinics of North America*, 31(3), 457-472.
- Zhao, B., van der Mei, H., Subbiahdoss, G., de Vries, J., Rustema-Abbing, M., Kuijter, R., Bussher, H., Ren, Y. Soft tissue integration versus early biofilm formation on different dental implant materials. *Dental Materials*, 2014, 30:716-727.
- Zinger O, Anselme K, Denzer A, Habersetzer P, Wieland M, Jeanfils J, et al. Time- dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials* 2004;25:2695–711
- Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 2005; 74: 49-58.
- Zhihong C, Yezhen L, Zhiyuan G, Hongqiao Y, Li Xiaoxue L, Yifeng R, Weikun F, and Jiliang H. Comparison of the cytogenotoxicity induced by five different dental alloys using four in vitro assays. *Dent Mater J* 2011; 30(6):861–868.

PRILOZI

Prilog 1.

INFORMACIJA ZA PACIJENTE I OBRAZAC ZA PRISTANAK NA UČESTVOVANJE U ISTRAŽIVANJU

Naziv istraživanja: Uticaj različito obrađenih površina keramičkih abatmenata na funkcionalnu adaptaciju mekih periimplantnih tkiva

U studiju se uključuju pacijenti, koji daju dobrovoljni pristanak za učešće u istraživanju. Molimo Vas da učestvujete u istraživanju, pošto ispunjavate kriterijume potrebne za studiju.

Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je da se ispita kvantifikacijski stepen adherencije fibroblasta na različito obrađivanim uzorcima od itrijum stabilizovanog cirkonijum dioksid polikristala.

Plan istraživanja

Istraživanje uključuje zdrave ispitanike, bez sistemskih oboljenja navedenih u anamnezi, nepušače starosti od 25-35 godina. Ispitanicima se postavljaju pitanja vezana za kliničke i laboratorijske podatke, kao i za opšte zdravstvene podatke. Ispitanicima će na odabrane zdrave zube biti zalepljeni uzorci ispitivanog materijala, ukupno tri na svaki odabrani zub po jedan. Sav eksperimentalni materijal koji dolazi u kontakt sa ispitanikom je sterilan.

U sledećem koraku, a nakon 24 sata, ispitanicima se skidaju postavljeni uzorci i šalju na dalje laboratorijsko ispitivanje.

Rizik

Pošto su navedene procedure neinvazivne, ne postoji rizici vezani za njih.

Korist

Ispitivanje ima za cilj da utvrdi da li različiti načini obrade protetskih nadogradnji na implantatima utiču na stepen adherencije fibroblasta i mekotkivnu integraciju implantata. Vaša uloga u tome, kao ispitanika, je vrlo značajna. Doprinosite razvoju najpodesnije izrade protetskih nadogradnji na implantatima, što u značajnoj meri doprinosi uspehu implantološke terapije u celosti.

Tajnost podataka

Posebna pažnja je posvećena očuvanju tajnosti podataka o pacijentima iz studije. Svi rezultati će biće registrovani u kompjuterskoj bazi podataka, pomoću posebnog šifrovanog sistema. Identitet svakog ispitanika biće poznat samo lekaru koji sprovodi istraživanje.

Dobrovoljno učestvovanje i uslovi povlačenja iz istraživanja

Vaše učešće u studiji je potpuno dobrovoljno. Svakom ispitaniku mora biti jasna izneta činjenica da se u svakom trenutku, iz bilo kog razloga, mogu povući iz istraživanja, i da pritom neće ugroziti svoje buduće lečenje.

Pristanak pacijenta

U okviru navedenog opisa „Plana istraživanja“, kao i dodatnog dokumenta „*Informacija za pacijente*“, opisan je postupak izvođenja istraživanja, kao i njegovi potencijalni rizici i koristi. Pročitao/la sam informaciju za pacijente, ona mi je bila razumljiva i pružila mi je dovoljno informacija o ispitivanju u kome bih učestvovao/la. Data mi je prilika da postavim pitanja vezana za ovo ispitivanje i dobio/la sam zadovoljavajuće odgovore.

Dobrovoljno pristajem na procedure navedene u planu istraživanja. Potpisom ovog informisanog pristanka se ne odričem svojih zakonskih prava. Jedan potpisani primerak ovog informisanog pristanka ostaje meni.

Ime i prezime pacijenta

Redni broj ispitanika

Datum rođenja

** Popunjava pacijent*

Prilog 2.

BIOGRAFIJA

Nenad Borotić završio je osnovnu i srednju školu u Beogradu. Stomatološki fakultet u Beogradu upisao je 2001. godine, i završio 2008. godine sa prosečnom ocenom 9.18. Tokom studija učestvovao je na nekoliko studentskih kongresa, gde je izlagao naučne radove iz oblasti stomatološke protetike. Bio je aktivan u oblasti studentskog organizovanja, kroz osnivanje Studentske Unije na Stomatološkom fakultetu u Beogradu. Jedan od tri člana studenta u prvoj akademskoj akreditaciji Stomatološkog fakulteta u Beogradu.

Nakon obavljenog pripravničkog staža 2009. godine na Stomatološkom fakultetu u Beogradu, izabran je u zvanje saradnika u nastavi na predmetu Oralna hirurgija, na Stomatološkom fakultetu u Pančevu, Privredna akademija u Novom Sadu. Iste godine, upisao je i doktorske studije na Stomatološkom fakultetu u Pančevu. Naredne, 2010. godine izabran je u zvanje asistenta na predmetu Stomatološka protetika. Zdravstvenu specijalizaciju iz oblasti Stomatološke protetike upisao je 2012. godine, a specijalistički ispit položio je 2015. godine. Objavio je dva rada kategorizacije M 23, a jedan rad je trenutno u štampi, takođe kategorizacije M 23. Završio je nekoliko kurseva iz oblasti implantologije i implantno-protetske rehabilitacije pacijenata u zemlji i inostranstvu i sertifikovani je instruktor jednog implantološkog sistema.