

**VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA**  
**Institut za medicinska istraživanja**

**ALEKSANDRA PETKOVIĆ- ĆURČIN**

**Povezanost polimorfizama gena za citokine i  
lokalnog imunskog odgovora sa faktorima  
rizika u nastanku periimplantitisa**

Doktorska disertacija

Beograd 2015

**MILITARY MEDICAL ACADEMY**

Institute of medical research

**ALEKSANDRA PETKOVIĆ- ĆURČIN**

**Association between cytokine gene polymorphisms  
and local immune response with risk factors in the  
development of periimplantitis**

Doctoral dissertation

Belgrade 2015

**PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE:**

**Mentor:**

**mj doc dr Zoran Tatić**, docent Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

**Predsednik komisije:**

**Dr med sci Zvonko Magić**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

**Članovi komisije:**

**Dr med sci Danilo Vojvodić**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

**Dr Katarina Zeljić**, docent Biološkog fakulteta Univeziteta u Beogradu

**Dr Dragana Daković**, docent Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_2015.

godine



## ZAHVALNICA

*Volela bih da iskažem veliku zahvalnost svim onim izuzetnim ljudima koji su najviše doprineli izradi mog rada, i svima onima koji su me na bilo koji način podržali, uz izvinjenje što ih na ovom mestu ne mogu sve pojedinačno pomenuti.*

*Zahvalnost dugujem:*

*Pre svega, profesorski Smiljani Matić, izuzetnoj ženi koja je svojom neiscrpnom energijom, pažnjom, znanjem, optimizmom i posvećenošću usmerila moj biološki um na istraživačku delatnost u oblasti oralne implantologije.*

*Profesoru Zvonku Magiću na pruženoj prilici da budem deo Laboratorije za molekulska genetiku, da se vratim sebi i svojim, kao i na i na dragocnim sugestijama u izradi ovog doktorskog rada.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem profesoru Danilu Vojvodiću koji mi je još od samih istraživačkih početaka svojim kreativnim intelektom dao vredne smernice i bio dragocena podrška od ideje do realizacije i magistarskog i doktorskog rada.*

*Mentoru ovog rada, majoru Zoranu Tatiću na optimizmu, lakoći komunikacije, a pre svega na korisnim savetima kojima mi je pomogao da rad dobije konačnu verziju.*

*Docentkinji Katarini Zeljić dugujem jedno veliko hvala, na pomoći oko statističke obrade podataka, na podršci, veri i pažnji koju je posvetila ovom radu.*

*Docentkinji Dragani Daković, zahvaljujem se na korisnim sugestijama i optimizmu koji je unela u završnim fazama ovog rada.*

*Veliko hvala i članovima Odeljenja za implantologiju na uvek toploj atmosferi i pomoći u prikupljanju uzoraka za ovo istraživanje.*

*Zahvalnost dugujem i mojim kolegicama iz Laboratorije za molekulska genetiku dr Bojani Cikoti-Aleksić na korisnim sugestijama i pomoći u eksperimentalnom delu istraživanja, dr Nataši Streljić i dr Vesni Ilić na znanju, iskustvu i podršci. Docentkinji Gordani Šupić na cimerskoj toleranciji i podršci. Diplomiranom biohemičaru Stevi Jovandiću i molekularnom biologu Bojani Milićević na saradnji kao i svim članovima Instituta za Medicinska istraživanja.*

*Zahvalnost osećam i prema preminulom profesoru Aleksandru Škundriću koji me je kao veliki znalac uveo u oralnu implantologiju. Kod velikih ljudi kao što je bio on, sve je bilo jednostavno, lako, ne postoje prepreke i ništa nije nemoguće. U tako nešto je uspeo i mene da uveri..da jedan molekularni biolog može da pronikne u svet stomatologije..a opet da je sagledava iz svog ugla.*

*Hvala svim mojim prijateljima jer me je druženje sa njima uveseljavalo i motivisalo.*

*Snaga volje i radost uvećana je podrškom i pažnjom mojih Petkovića, Ćurčina i Vasovića.*

*I na kraju posebnu zahvalnost dugujem mojim najdražima Teodori, Katarini i Darku na ljubavi, strpljenju, razumevanju, toleranciji i podršci!*

*Ovaj rad posvećujem mojoj majci*

# **Povezanost polimorfizama gena za citokine i lokalnog imunskog odgovora sa faktorima rizika u nastanku periimplantitisa**

## **Rezime**

**Uvod.** Identifikacija gena asociranih sa podložnošću čestim poligenetičkim i multifaktorijalnim bolestima predstavlja prioritet biomedicinskih istraživanja. Periimplantitis označava patoške promene koje zahvataju tkiva oko implantata i rezultuje gubitkom potporne kosti. Osim poznate uloge etioloških faktora, bakterijskih infekcija i biomehaničkih faktora, novija istraživanja ukazuju i na genetičku osnovu sklonosti ka periimplantitisu. Pod genetičkim polimorfizmom podrazumevamo alelsku varijantu koja postoji stabilno u populaciji u učestalosti koja je dovoljno velika da se ne smatra samo proizvodom mutacionog procesa i generalno je veća od 1%. U humanom genomu su najzastupljeniji polimorfizmi nukleotidne sekvence (Engl. Single Nucleotide Polymorphism – SNP). Proučavanje polimorfizama gena za citokine i CD14 gena ima važnu ulogu u razumevanju genetičke podložnosti razvoja periimplantitisa s obzirom da geni koji kontrolišu zapaljenski odgovor domaćina imaju važnu ulogu u modulaciji stadijuma periimplantitisa. Nastaje kao rezultat složenog preplitanja genetičkih faktora i faktora spoljašnje sredine. Vezivanje struktura mikroba za receptore epitelih ćelija pokreće signalne puteve i procese koji se završavaju indukcijom gena neophodnih za produkciju i sekreciju antimikrobnih peptida, slobodnih radikala, leukotriena, prostaglandina, hemokina i citokina IL1, IL6, TNF $\alpha$ . Aktivacija lokalnih rezidentnih ćelija koje prikazuju antigene, antigen prezentujuće ćelije (Engl. Antigen Presenting Cells-APC) u takvom mikrookruženju uz lokalno produkovane slobodne radikale i hemokine uzrokuje produkciju IL6, IL12, IL23, citokina ključnih za aktivaciju i diferencijaciju lokalno aktiviranih T limfocita.

Krajnji efektori oštećenja periimplantatnog tkiva su agresivni enzimi, metaloproteinaze čija je lokalna aktivnost regulisana citokinima. Zna se da

inflamatorni citokini povećavaju lokalnu sekreciju i aktivnost metaloproteinaza što rezultuje oštećenjem struktura periimplantatnog tkiva i stimulacijom mehanizma resorpcije kosti. Lokalna produkcija antiinflamatornih citokina umanjuje efekte oštećenja periimplantatnog tkiva. Progresijom periimplantitisa koncentracije citokina u periimplantatnoj tečnosti (PICF) se povećavaju, ali postoje individualne razlike u stepenu povećanja produkcije ovih medijatora zapaljenja.

U ovom doktorskom radu pošlo se od hipoteze da je prisustvo mutiranih genotipova ispitivanih gena za citokina ( $TNF\alpha_{-308}$ , IL1 ra , CD14-159, IL6-174, IL10-1082) udruženo sa povećanim rizikom za nastanak periimplantitisa kod ispitanika sa ugrađenim dentalnim implantatima kao i od toga da je kod ovih ispitanika lokalna produkcija citokina povezana sa mutiranim genotipovima i povećanom sklonošću ka periimplantitisu.

**Cilj.** Cilj ovog istraživanja bio je utvrđivanje učestalosti genotipova i alela polimorfizama gena za citokine, IL6-174 (rs1800795), IL10-1082 (rs1800896), IL1 Ra,  $TNF\alpha_{-308}$  (rs1800629), i CD14-159 (rs2569190), u grupi ispitanika sa razvojem i progresijom periimplantitisa i određivanje povezanosti datih genotipova sa faktorima rizika i sklonosti za razvoj periimplantitisa. Drugi deo istraživanja odnosio se na određivanje lokalne produkcije citokina (IL12,  $INF\gamma$ , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL1 $\beta$ ,  $TNF\alpha$ ,  $TNF\beta$ ) u uzorcima tečnosti periimplantatnog sulkusa i utvrđivanje povezanost između detektovanih koncentracija citokina i faktora rizika za sklonost ka periimplantitisu. Na kraju je ispitivano postojanje povezanosti između polimorfizama ispitivanih gena i koncentracije citokina u uzorcima PICF.

**Materijal i metode.** Studijska grupa je obuhvatala 98 ispitanika starosti između 18 i 70 godina sa ugrađenim dentalnim implantatima podeljenih u dve grupe: grupa sa zdravim periimplantatnim tkivom, kao i ona sa dijagnostikovanim periimplantitisom. U studiju su uključeni isključivo implantati koji imaju stabilan protetski rad, tj koji su u funkciji. Kod ispitanika su praćeni i beleženi klinički parametri prisustva ili odsustva zapaljenja tkiva oko implantata. Uzorci uzeti od ispitanika, natopljeni sadržajem periimplantatne tečnosti stavljeni su u sterilne epruvete i sadržaj iz papirnog "poena" je izdvojen nakon centrifugiranja uzorka. Određivana je koncentracija citokina IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12,  $IFN\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  i  $TNF\beta$

komercijalnim citofluorimetrijskim testom (Bender Medsystems flowcitomix multiplex test kit, BMS 810 FF, SAD). Osim tečnosti iz periimplantatnog sulkusa od svakog ispitanika su uzeti i uzorci periferne krvi za genetičke analize. Izolovana DNK iz krvi se koristila za genotipizaciju analiziranih polimorfizama i to PCR-RFLP metodom u slučaju TNF $\alpha$ , IL1ra i CD14 gena, odnosno Real Time PCR metodom za polimorfizme u IL6 i IL10 genima. Dobijeni rezultati su obrađeni statističkim programom SPSS. Povezanosti su smatrane statistički značajnim ukoliko je p vrednost bila manja od 0.05.

**Rezultati.** Zabeležene su značajne razlike u distribuciji genotipova za proučavane polimorfizme CD14<sup>-159</sup> (rs2569190) (p<0.0001), IL-6<sup>-174</sup> (rs1800795) (p<0.0001), IL-10<sup>-1082</sup> (rs1800896) (p<0.0001) i TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup> (rs1800629) (p<0.0001) između grupe sa periimplantitisom i kontrolne grupe. Statistički značajna razlika u distribuciji alela između ispitivanih grupa zabeležena je u slučaju CD14<sup>-159</sup> (p=0.003), IL6<sup>-174</sup> (p<0.0001) i TNF $\alpha$ <sup>-308</sup> (p<0.0001). Nije pronađena statistički značajna veza između analiziranih polimorfizama u CD14, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i IL-1ra genima i kliničko patoloških odlika pacijenata. U grupi ispitanika bez periimplantitisa uočeno je postojanje asocijacije između indeksa krvarenja i proučavanog polimorfizma rs2569190 u CD14 genu (p=0.004).

Na osnovu analize citokina u periimplantatnoj tečnosti i lokalnog imunskog odgovora došlo se do zaključka da je najmanji gingivalni indeks GI povezan sa visokim koncentracijama IL2, IL1 $\beta$  i TNF $\beta$ . Povećanje vrednosti GI povezana je sa visokim koncentracijama IFN $\gamma$ , IL4 i TNF $\alpha$ , dok su najveće vrednosti GI povezane sa visokim koncentracijama IL10, IL8 i IL5. Odsustvo plaka je povezano sa visokim koncentracijama IL2, IL10, IL6 i TNF $\beta$ , dok je razvoj plaka povezan sa visokim koncentracijama IFN $\gamma$ , IL8, IL4 i IL5 u periimplantatnoj tečnosti (PCIF).

U grupi ispitanika sa implantatima tipa I periimplantitis je povezan sa značajnim porastom IFN $\gamma$  i IL4, dok je u grupi pacijenata sa tipom II implantata periimplantitis povezan sa značajnim porastom vrednosti IL10, IL8, IL1 $\beta$  i TNF $\beta$ .

Između medijane koncentracija tri ispitivana citokina TNF $\alpha$ , IL6 i IL10, nije postojala statistička značajnost u zavisnosti od genotipa analiziranih polimorfizama.



**Zaključak.** Analiza polimorfizama gena uključenih u tok i ishod periimplantitisa može dati važne informacije o ovom oboljenju. Između grupe ispitanika sa periimplantitisom i kontrolne grupe sa zdravim tkivom oko implantata uočena je razlika u distribuciji genotipova CD14, IL6, IL10 i TNF $\alpha$ ., kao i alela IL6, TNF $\alpha$  i CD14 gena što bi moglo da ukaže na potencijalnu ulogu navedenih polimorfizama u sklonosti ka periimplantitisu. Nije pronađena statistički značajna veza između analiziranih polimorfizama u CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra genima i kliničko patoloških odlika. Multivarijantnom analizom pokazano je da su pol i gingivalni indeks statistički značajni faktori rizika za nastanak periimplantitisa. Kada se analiziraju svi ispitivani citokini (IL12, IFN $\gamma$ , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) detektovani u uzorcima PICF ispitanika sa različitim tipom implantata u odnosu na periimplantitis, uočljiv je potpuno drugačiji tip lokalnog odgovora na nastalu inflamaciju. Dobijen je i profil imunskog odgovora prema plak indeksu, gingivalnom indeksu i dubini parodontalnog džepa.

Analiza lokalnog imunskog odgovora u periimplantatnom tkivu i razjašnjenje genetičke osnove periimplantitisa bi moglo obezbediti bolje razumevanje etiologije bolesti. To bi dovelo do kritičnijeg izbora pacijenata, naročito identifikacije rizičnih pacijenata što bi pospešilo uspeh implantacije. Time bi se stvorio kvalitetniji osnov za jednostavnije lečenje i prevenciju nastanka oboljenja.

**Ključne reči:** Periimplantitis, citokini, polimorfizmi gena za citokine, inflamacija.

# **Association between polymorphism of genes to cytokines and local immune response with risk factors in the development of periimplantitis**

## **Abstract**

**Introduction.** Identification of genes associated with the susceptibility to common polygenetic and multifactorial diseases represents a priority of biomedical research. Peri-implantitis signifies pathological changes that take hold of tissues around implants and result in the loss of the supporting bone. Apart from the well-known role of etiological factors, bacterial infections and biomechanical factors, the latest research also points to the genetic basis of the susceptibility to peri-implantitis. Genetic polymorphism is the allelic version that stands stable in the population that is frequent enough so as not to be considered merely as the product of mutational process and is generally larger than 1%. In the human genome the most commonly present are Single Nucleotide Polymorphisms – SNP. Studying of polymorphism of genes for cytokines and CD14 genes has a vital role in understanding of genetic susceptibility of the development of peri-implantitis, given that the genes that control the inflammatory response of the host play a crucial role in the modulation of the stadium of peri-implantitis. As many other diseases, peri-implantitis is multifactorial and is considered to be caused by multigenes with a discreet genetic alterations that are present and connected in a longer time interval with the factors of the environment by the activity of pathogenes and their enzymes. Linking the structures of the microbes with the receptors of epithelial cells starts the signal ways and processes that end with the induction of genes necessary for the production and secretion of antimicrobe peptides, free radicals, leukotrienes, prostaglandins, chemokines and cytokines IL1, IL6, TNF $\alpha$ . Activation of the local residential cells, or Antigen Presenting Cells – APC in such micro environment with locally produced

free radicals and chemokines cause the production of IL6, IL12, IL23, cytokines which are crucial for the activation and differentiation of locally activated T lymphocytes.

The end effectors of the damage of the peri implant tissue are aggressive enzymes, metalloproteinases whose local activity is regulated by cytokines. It is known that the inflammatory cytokines increase the local secretion and activity of the metalloproteinases, which results in the damage of the structure of peri implant tissue and the stimulation of mechanisms of the resorption of the bones. Local production of the antiinflammatory cytokines decreases the effects of the damage of perimplant tissue. With the progression of the peri-implantitis increases the concentration of cytokines in the peri implant liquid (PICF), but there are individual differences in the degree of the increase of production of these mediators of inflammation. This doctoral thesis starts with the hypothesis that the presence of the mutated genotypes of the tested genes for cytokines (TNF $\alpha$ -308, IL1 ra, CD14-159, IL6-174, IL10-1082) is combined with the enhanced risk for the development of peri-implantitis in patients with dental implants as well as that the local production of cytokines in these patients is connected to mutated genotypes and with the increased susceptibility to peri-implantitis.

**Aim.** The aim of this research was to determine the frequency of genotypes and alleles of polymorphism genes for cytokines, IL6-174(rs1800795), IL10-1082(rs1800896), IL1 Ra, TNF $\alpha$ -308 (rs1800629), i CD14-159 (rs2569190), in the group of patients with the development or progression of peri-implantitis and to determine the linkage of the given genotypes with the risk factors and the susceptibility to the development of peri-implantitis. The second part of research referred to the determination of the local production of cytokines (IL12, INF $\gamma$ , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) in the samples of peri implant sulcus liquid and the determination of the linkage between detected concentration of cytokines and risk factors for the susceptibility to peri-implantitis.

**Materials and methods.** Study group comprised of 98 patients aged 18-70 with the built-in dental implants divided into two groups: The first group with healthy peri implant tissue, as well as the one with diagnosed perimplantitis. The study included

exclusively the implants with the stable protetic work i.e. the one that is functioning. The patients were monitored and the clinical parametres of presence or absence of inflammation of tissues around the implants were recorded. The samples were taken from the patients, soaked in the content of peri implant liquid put in sterile test tubes, and the content of the paper 'point' was extracted after the centrifusion of the sample. The concentration of cytokines IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and TNF $\beta$  was determined with the commercial citofluorimetrical test (Bender Medsystems flowcitomix multiplex test kit, BMS 810 FF, USA). Apart from the liquid from the peri implant sulcus, the samples of the peripheral blood were taken from each patient for genetic analyses. The isolated DNA from the blood was used for genotypisation of analysed polymorphysms, using PCR-RFLP in the case of TNF $\alpha$ , IL1r and CD14 genes i.e. Real Time PCR method for polymorphisms in IL6 and IL10 genes. The received results were processed in SPSS statistical programme. The linkage was considered statistically important if the p value was less than 0.05.

**Results.** Significant differences in the distribution of genotypes for the research of polymorphisms CD14-159 (rs2569190) (p<0.0001), IL-6-174 ( rs1800795) (p <0.0001),IL-10-1082 (rs1800896) (p<0.0001) i TNF- $\alpha$ -308 rs1800629 (p<0.0001) were recorded between the groups with peri-implantitis and the control group. Statistically significant difference in the distribution of alleles among the researched groups was recorded in the cases of CD14-159 (p=0.003), IL6-174 (p<0.0001) and TNF $\alpha$ -308 (p<0.0001). Statistically there was no significant connection between analysed polymorphism in CD14, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  and IL-1r genes and clinically pathological features of the patients. The presence of the association between index bleeding and researched polymophysm rs2569190 in CD14 gene (p=0.004) was recorded in the group of patients without peri-implantitis.

Based on the analysis of cytokines in periimplant liquid and local immune response, it was concluded that the smallest gingival index GI was connected to the high concentrations of IL2, IL1 $\beta$  and TNF $\beta$ . The increase of the value of GI is connected to the high concentrations of IFN $\gamma$ , IL4 and TNF $\alpha$ , whereas the biggest values of GI are connected to the high concentrations of IL10, IL8 and IL5. The absence of plaque is connected to the high concentrations of IL2, IL10, IL6 and TNF $\beta$ , whereas the

development of the plaque is connected to the high concentrations of IFN $\gamma$ , IL8, IL4 and IL5 in peri implant liquid (PICF).

In the group of patients with implants type I peri-implantitis is connected to the significant increase of IFN $\gamma$  and IL4, whereas in the group of patients with type II implants, peri-implantitis is connected to the significant increase of values of IL10, IL8, IL1 $\beta$  and TNF $\beta$ .

**Conclusions.** Analysis of polymorphism genes included in the course and outcome of peri-implantitis can give valuable information about this disease. A difference was discovered between the group of patients with peri-implantitis and the control group with healthy tissue around the implants regarding the distribution of genotypes CD14, IL6,IL10 and TNF $\alpha$ , as well as alleles IL6,TNF $\alpha$  and CD14 genes that could indicate a potential role of the above mentioned polymorphisms in the susceptibility to peri-implantitis. No statistically significant connection between analysed polymorphisms in CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1r genes and clinically pathological features was found. Multivariant analysis proved that the sex and gingival index are statistically significant risk factors for the development of peri-implantitis. When all the researched cytokines (IL12, IFN $\gamma$ , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) detected in the samples of PICF patients with different types of implants with regards to peri-implantitis were analysed, a completely different type of local response to the created inflammation was detected. A profile for immune response to the plaque index, gingival index and the depth of the pocket were gained. The analysis of the local immune response in peri implant tissue and the solving of the genetic basis of peri-implantitis provides a better understanding of the etiology of the disease, which could lead up to the more critical choice of patients, particularly identification of risk patients, which would improve the success of implantation. This would create a better quality basis for a simpler treatment and prevention of the cause of the disease.

**Key words:** Periimplantitis, cytokines, polymorphism of genes for cytokines, inflammation.

# SADRŽAJ

<b>UVOD .....</b>	<b>17</b>
1.1. Dentalni implantati i njihova interakcija sa organizmom.....	19
1.1.1. Reakcija kosti na ugradnju implantata .....	19
1.1.2. Oseointegracija .....	21
1.1.3. Faktori oseointegracije .....	23
1.1.4. Biokompatibilnost materijala .....	23
1.1.5. Dizajn i površina implantata.....	24
1.2. Periimplantatna tkiva .....	24
1.2.1. Periimplantatni sulkus i tečnost.....	25
1.2.2. Inflamacija periimplantatnog tkiva.....	27
1.2.3. Perimukozitis i periimplantitis (klinička slika, dijagnoza).....	28
1.2.4. Etiološki faktori .....	31
1.2.5. Bakterijska infekcija.....	31
1.2.6. Biomehanički faktori .....	34
1.2.7. Faktori rizika .....	35
1.3. Imunski sistem .....	35
1.3.1. Imunski odgovor na patogene usne šupljine.....	36
1.3.2. Patogeneza periimplantitisa.....	37
1.3.3. Citokini i imunski odgovor kod periimplantitisa.....	43
1.3.4. Lokalni odgovor periimplantatnog tkiva na bakterijsku infekciju .....	51
1.4. Sklonost (genetička predispozicija) ka periimplantitisu.....	54
1.4.1. Polimorfizam nukleotidne sekvence.....	56
1.4.2. Polimorfizmi gena za citokine.....	58
1.4.3. Polimorfizmi gena za CD14 .....	59
1.4.4. Polimorfizmi gena za IL6 .....	59

1.4.5. Polimorfizmi gena za IL10 .....	61
1.4.6. Polimorfizmi gena za TNF $\alpha$ .....	61
1.4.7. Polimorfizmi gena za IL1 ra .....	62
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZE .....</b>	<b>64</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>66</b>
3.1. Studijska grupa .....	67
3.2. Uzimanje anamneze ispitanika .....	67
3.3 Klinički pregled .....	68
3.4. Uzimanje uzoraka .....	70
3.5. Određivanje detektabilnosti citokina iz periimplantatne tečnosti .....	70
3.6. Detekcija polimorfizama gena za citokine i CD14 gena .....	71
3.6.1. Biološki uzorci i izolacija DNK .....	71
3.6.2. Provera kvaliteta i koncentracije genomske DNK .....	71
3.6.3. Lančana reakcija polimerizacije (PCR) .....	72
3.6.4. Analiza polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata- RFLP .....	73
3.6.5. Real-time PCR alelska diskriminacija .....	75
3.7. Statistička obrada rezultata .....	76
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>78</b>
4.1. Određivanje detektabilnosti i koncentracija citokina .....	79
4.1.1. Određivanje koncentracija citokina u periimplantatnoj tečnosti .....	79
4.1.2. Lokalni imunski odgovor, tip implantata i periimplantitis .....	80
4.1.3. Lokalni imunski odgovor u odnosu na vrednosti gingivalnog indeksa .....	85
4.1.4. Lokalni imunski odgovor i vrednosti plak indeksa .....	87
4.1.5. Lokalni imunski odgovor i dubina periimplantatnog sulkusa .....	90
4.2. Određivanje polimorfizama gena za citokine i CD14gen .....	93

4.2.1. Distribucija genotipova i alela ispitivanih polimorfizama u IL1ra, TNF $\alpha$ , IL10, IL6 i CD14 genima.....	93
4.2.2. Etiološke i kliničko-patološke odlike ispitivane studijske grupe .....	100
4.2.3. Asocijacija proučavanih polimorfizama sa rizikom za razvoj periimplantitisa .....	102
4.2.4. Povezanost polimorfizama gena za citokine IL6, IL10 i TNF $\alpha$ sa lokalnom produkcijom citokina.....	107
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>110</b>
5.1 Imunski odgovor u periimplantitisu.....	111
5.1.1 Lokalni imunski odgovor u periimplantitisu .....	111
5.1.2. Analiza lokalnog imunskog odgovora shodno tipu implantata .....	116
5.1.3. Lokalni imunski odgovor i plak indeks .....	119
5.1.4. Lokalni imunski odgovor i gingivalni indeks.....	121
5.1.5. Lokalni imunski odgovor i dubina džepa .....	123
5.2. Polimorfizmi gena za citokine i CD14 gen .....	129
5.2.1 Polimorfizam rs2569190 CD14 gena .....	129
5.2.2 Polimorfizam IL1ra gena.....	133
5.2.3 Polimorfizam rsl800629 TNF $\alpha$ -308 gena.....	138
5.2.4. Polimorfizam rs1800795 gena za IL6 .....	140
5.2.5 Polimorfizam rs1800896 IL10 gena .....	143
5.2.6. Povezanost faktora rizika sa polimorfizmima gena za citokine .....	145
5.2.7. Povezanost polimorfizama gena za citokine IL6, IL10 i TNF $\alpha$ sa lokalnom produkcijom citokina.....	148
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>150</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>153</b>



## **UVOD**

Oralna implantologija je stomatološka disciplina koja se bavi dijagnostikom, ugradnjom, nadoknadom i/ili primenom aloplastičnih ili autogenih oralnih struktura u cilju vraćanja izgleda, komfora, funkcije, estetike, govora i/ili zdravlja potpuno ili delimično bezubih pacijenata.

To je multidisciplinarna oblast stomatologije zasnovana na kliničkim i bazičnim ispitivanjima hirurških metoda ugradnje implantata i mogućnostima protetske rehabilitacije. Jedna od poznih komplikacija koja se može pojaviti nakon ugradnje implantata, a koja utiče na njegovu stabilnost i održanje je periimplantitis. Periimplantitis je definisan kao inflamatorni proces tkiva oko oseointegriranih implantata i rezultuje gubitkom potporne kosti. Pokazano je da se učestalost periimplantitisa kreće u opsegu od 1-19% (Lekholm i sar., 1999, Berglundh i sar., 2002). Za jedan od glavnih uzroka periimplantitisa se smatra kolonizacija bakterija površine implantata, dok se doprinos dodatnih faktora rizika kao što su parodontopatija, loša oralna higijena, konzumiranje duvana, pre i post operativne terapija i genetička sklonost i dalje izučavaju (Brunelli i sar., 2012). Grupa autora je proučavajući moguću povezanost prethodne istorije parodontopatije i periimplantitisa ukazala na to da osobe sa istorijom parodontopatije mogu imati povećani rizik za periimplantatne infekcije (Carinci, 2012). Drugi autori su proučavali povezanost periimplantitisa sa koštanim gubitkom, sistemskim uslovima i demografskim profilom (Maximo i sar., 2008). Periimplantitis je doveden u vezu sa opštim gubitkom kosti i sa lošom oralnom higijenom (Serino i sar., 2009).

Razjašnjenje genetičke osnove ovih oboljenja bi moglo da obezbedi bolje razumevanje etiologije bolesti, omogućilo bi kategorizaciju pacijenata u različite grupe prema postojanju rizika za razvoj periimplantitisa, a sve sa ciljem povećanja uspešnosti implantacije, čime bi se stvorio osnov za jednostavnije lečenje i prevenciju nastanka bolesti.

## 1.1. Dentalni implantati i njihova interakcija sa organizmom

Dentalni (oralni) implantat je fabrička ili laboratorijska konstrukcija koja se ugrađuje u viličnu kost, a služi kao nadoknada izgubljenog zuba i osnova buduće stomatološke nadoknade (Slika 1). Gubitak zuba za posledicu ima veću ili manju resorpciju alveolarnog grebena što otežava protetsko zbrinjavanje. U tim slučajevima je primena implantata u terapiji parcijalne i/ili totalne bezubosti široko prihvaćena metoda.



*Slika 1.* Šematski prikaz dentalnog implantata

Aktom implantacije dolazi do traumatskog oštećenja mekog i koštanog tkiva. Bez obzira koliko je taj akt pažljivo izveden tkivni odgovor je kontrolisan mehanizmima koštanog zarastanja, metabolizmom kao i drugim biomehanizmima. Kao i kod svakog oštećenja tkiva, organizam reaguje zapaljenskom reakcijom čiji je cilj ograničavanje oštećenja odnosno zamena izgubljenog ili oštećenog tkiva regeneracijom ili reparacijom. Procesom regeneracije nastaju tkiva koja se strukturno i funkcionalno ne razlikuju od stanja pre oštećenja (zarastanje fraktura) dok reparacija podrazumeva formiranje fibroznog ožiljnog vezivnog tkiva koje se strukturno i funkcionalno razlikuje od stanja pre oštećenja (koštano tkivo oko implantata, koža).

### 1.1.1. Reakcija kosti na ugradnju implantata

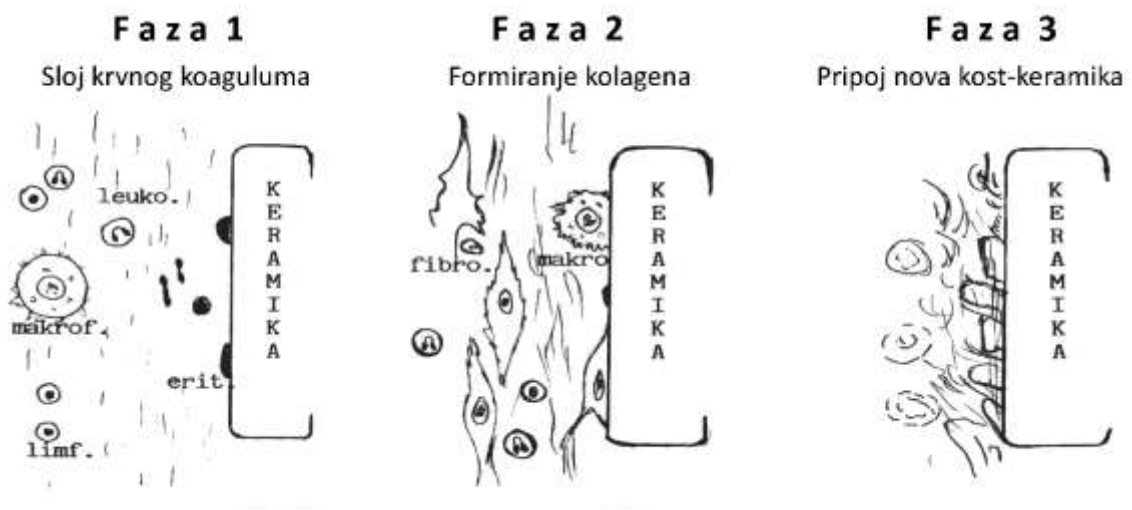
Dentalna implantacija po svojoj definiciji predstavlja unošenje aloplastičnih materijala u tkiva gornje i donje vilice koja podrazumeva i odgovor tkiva domaćina na uneti materijal. Ugrađeni endoosealni dentalni implantati sa urađenim protetskim radom zajedno predstavljaju implantatni kompleks (Slika 2).



**Slika 2.** Implantatni kompleks

Ugradnja enosalnih implantata je trauma za meka i koštana tkiva. Reakcija tkiva odnosno kosti prilikom ugradnje implantata odvija se u više faza.

Početak akutne faze zapaljenja je podjeljen na primarnu i sekundarnu fazu. Primarna faza nastaje posle nekoliko sati i karakteriše se lučenjem serozne tečnosti plazme i nagomilavanjem makrofaga. Na samom početku se oslobađa histamin i acetilholin.



**Slika 3.** Reakcija kosti na ugradnju implantata od keramičkog materijala

Tokom ugradnje implantata dolazi do oštećenja koja dovode do oštećenja mukoznog i koštanog tkiva. Oštećenjem mekog i tvrdog tkiva počinje proces zarastanja rane što na kraju omogućava da implantat postane oseintegrisan i uspostavlja se osetljiva

mukozna barijera prema titan implantatu koji sprečava sadržaj iz usne duplje da dođe do koštanog tkiva koje okružuje implantat (Matić, 2008).

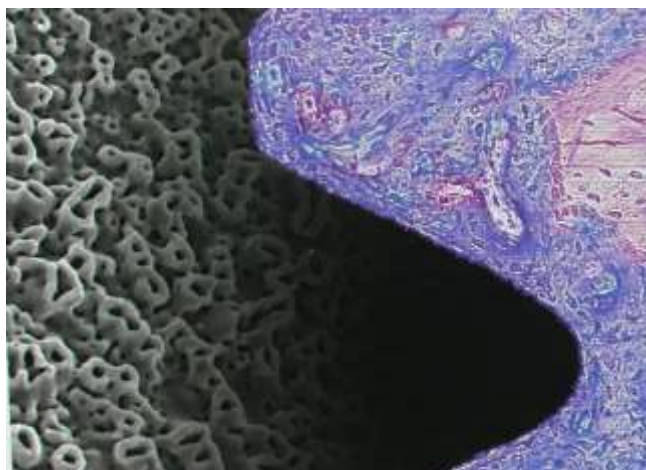
Pošto implantat mora da ostane u organizmu, postepeno dolazi do prelaska u hronični ili proliferativni oblik zapaljenja (Slika 3). Ova faza nastaje posle 48 sati i u njoj dolazi do umnožavanja vaskularnog i vezivnog tkiva, odnosno do proliferacije kapilara, umnožavanja histiocita, fibroblasta i fibrocita. Posle 7 dana na mestu krvnog koaguluma nastaje granulaciono tkivo. Oko 10-og dana nastaje katabolička faza zarastanja u kojoj se vide i prvi osteoblasti. Ova faza prerasta u anaboličku fazu u kojoj počinje diferencijacija mezenhimnih ćelija granulacionog tkiva. Ove ćelije imaju i fibro i osteogenski potencijal.

Cilj je da se stvori koštano tkivo oko implantata:

- do 6. nedelje je to nezrela kost
- od 6 - 12 nedelje se formira tzv. lamelarna kompaktna kost i to je faza rane remodelacije
- u 18. nedelji počinje faza pozne remodelacije i tada se implantat opterećuje, odnosno počinje protetska rehabilitacija
- od 18 - 54 nedelje je faza maturacije

### **1.1.2. Oseointegracija**

*Oseointegracija* se definiše 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 (Brånemark, 2001). Tokom oseointegracije dolazi do konstantnih metaboličkih i morfoloških promena koje se dešavaju na nivou grebena u koji je integrisan implantat i kontaktne kosti na površini implantata, čime se obezbeđuje funkcionalnost implantata. Dovoljno je da implantat ostvari kontakt na 75% površine da bi moglo da se kaže da je oseointegrisan (Slika 4).



**Slika 4.** Oseointegracija

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

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".

Misch (1999) je oseointegraciju označio kao direktni kontakt živog koštanog tkiva sa površinom implantata koji je vidljiv na svetlosnom mikroskopu.

U odnosu na tip procesa, proces oseointegracije prolazi kroz dve faze, gde prva faza podrazumeva primarno oseintegriranje implantata, a druga faza podrazumeva adaptiranje 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).

### **1.1.3. Faktori oseointegracije**

Sam proces oseointegracije uslovljen je mnogobrojnim faktorima koji delovanjem direktno utiču na kontakt implantata i kosti.

U faktore oseointegracije ubrajaju se:

- a) Biokompatibilnost materijala
- b) Kost kao akceptor
- c) Reakcija kosti na ugradnju implantata
- d) Dizajn i površina implantata
- e) Atraumatska operativna tehnika

Ostali faktori su doba starosti, pol, opšte zdravstveno stanje, opšte oralno stanje, osteogenetički faktori.

### **1.1.4. Biokompatibilnost materijala**

Jedan od preduslova uspešne implantacija je izbor materijala za izradu implantata. Prema najvećem broju autora, implantatni materijali moraju da poseduju sledeće osobine (Muddugangadhar i sar 2011): biokompatibilnost (podrazumeva da je materijal u tkivima inertan, bioadhezivan, bioreaktivan, netoksičan, nealergen, neteratogen i nekancerogen), otpornost na koroziju, otpornost na lom i mnoge druge osobine koje ga čine adekvatnim za primenu. Od metala koji se upotrebljavaju u implantologiji najčešće se koristi titan. Citološkim istraživanjima je utvrđeno da od 70 elemenata u periodnom sistemu elemenata samo na pet nije bilo nikakve reakcije ćelija, a među njima je i titan. Samim tim metal izbora za izradu implantata je komercijlno čist titan koji sadrži 99,75% titanijuma sa primesama u količini od 0,25% koje se odnose na kiseonik (O<sub>2</sub>) i azot (N<sub>2</sub>). On je inertan, nerastvorljiv i otporan na istezanje zbog čega i tanji implantati mogu da izdrže velika opterećenja što je veoma značajno s obzirom da se dentalni implantati nalaze u specifičnim uslovima u organizmu (tj. u kosti i u usnoj šupljini odnosno pljuvački).

### **1.1.5. Dizajn i površina 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.

Hrapava površina (može da se dobije 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, na pr. 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).

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

Uzimajući u obzir sve ove činjenice, sam proces formiranja 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.

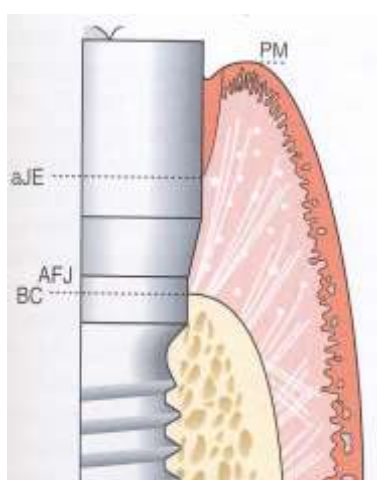
## **1.2. Periimplantatna tkiva**

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).

Za opstanak implantata, od velikog značaja je i stanje periimplantatnog mekog i koštanog tkiva (Slika 5). 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).



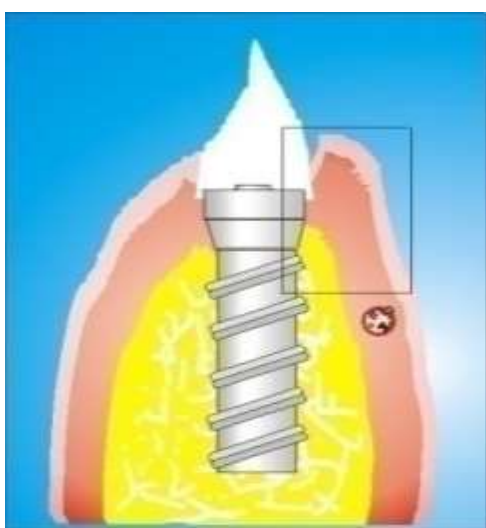
- PM- periimplantatna margina mekog tkiva
- aJE- apikalni završetak pripojnog epitela
- AFJ- spoj nosač-implantat
- BC- vrh alveolarnog grebena

**Slika 5.** Periimplantatna tkiva

### 1.2.1. Periimplantatni sulkus i tečnost

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 (Slika 6). 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.



**Slika 6.** Sulkusni prostor ispunjen sa PICF

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.

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):

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

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

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

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.

### **1.2.2. Inflamacija periimplantatnog tkiva**

Inflamatorni infiltrat u periimplantatnom tkivu predstavlja lokalni odgovor domaćina na bakterijsku akumulaciju i proliferiše u apikalnom smeru ako se produži vreme akumulacije plaka. Akumulacija mikroorganizama na periimplantatnoj margini je praćena lokalnim inflamatornim odgovorom. Unutar 10-20 dana akumulacije plaka,

uočeni su klinički znaci inflamacije, čak i tokom rane faze inflamacije pojavilo se tkivno oštećenje.

Dominantne ćelije u inflamatornoj leziji su neutrofilni, granulociti (Slika 7). Neutrofilni granulociti su mobilisani vrlo brzo na mestu povrede ili bakterijske infekcije (tokom 30 min) i oni sačinjavaju prvu liniju odbrane protiv infektivnih agenasa. Broj neutrofila raste sa inflamacijom. Degradacija vezivnog tkiva je praćena epitelnom migracijom i koštanom resorpcijom-ovaj stadijum je granična linija između mukozitisa i periimplantitisa.

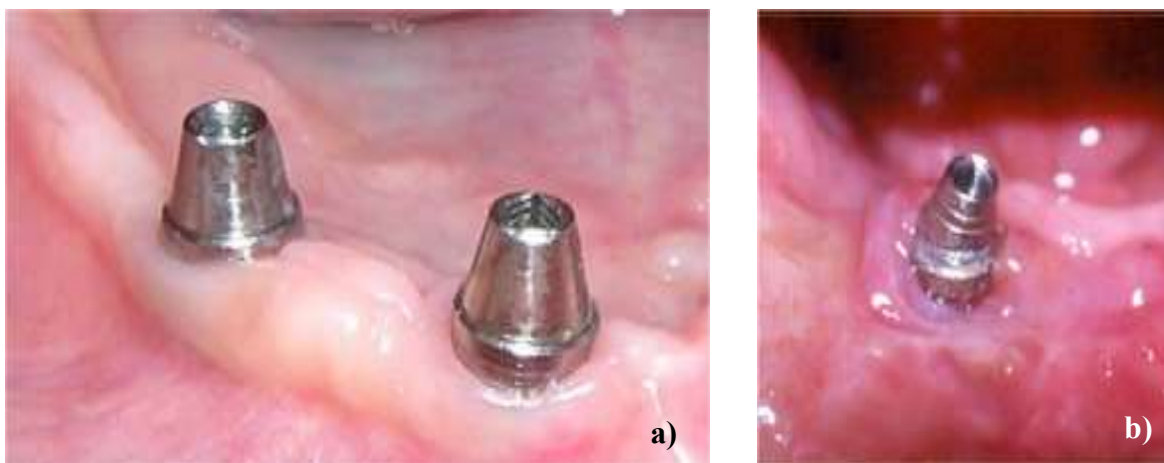


**Slika 7.** Ćelije uključene u inflamatorni odgovor

### 1.2.3. Perimukozitis i periimplantitis (klinička slika, dijagnoza)

Jedna od kasnijih komplikacija koja se može pojaviti nakon ugradnje implantata, a koja utiče na njegovu stabilnost i održanje je periimplantitis. Periimplantitis označava patološke promene koje zahvataju tkiva oko oseointegrisanog dentalnog implantata (Albrektsson i Isidor, 1994). Definisan je kao progresivni gubitak kosti udružen sa inflamacijom periimplantatnog tkiva. Oboljenja periimplantatnog tkiva se prema progresiji inflamatornog procesa dele na perimukozitise koji zahvataju meka tkiva oko implantata i periimplantitise kod kojih je zahvaćena i potporna kost (Mombelli i

Lang, 2008; Zitzmann i Berglundh, 2008). Periimplantatni mukozitis je definisan kao reverzibilna inflamatorna promena periimplantatnog mekog tkiva bez ikakvog koštanog gubitka (Albrektson i Isidor 1994). Oba ova termina se mogu svrstati u kategoriju periimplantatnog oboljenja (Lang i sar 2011). Kliničke studije su pokazale da periimplantitis može dovesti do neuspeha i gubitka implantata. Periimplantitis otpočinje na koronarnom delu implantata, dok se najapikalniji deo implantata održava u oseointegrisanom stanju (Lindhe i sar., 1992; Lang i sar., 1993). Ovo znači da implantat nije klinički mobilan do poslednjeg stadijuma kada dođe do progresije koštanog gubitka koja zahvata kompletnu implantatnu površinu (Newman i Fleming, 1998) (Slika 8).



**Slika 8.** Klinički prikaz a) zdravog i b) inflamiranog tkiva oko implantata

Razlika u zastupljenosti periimplantatnog mukozitisa (8 – 44 % Adel i sar 1986; Lekholm i sar., 1994, u odnosu na učestalost periimplantitisa (1 – 19 % Lekholm, 1999; Berglundh, 2002) se može objasniti i širokim opsegom učestalosti razlika u definisanju ova dva entiteta. Periimplantitisi predstavljaju multifaktorsko oboljenje u čijoj se etiologiji prepliću imunološki, mikrobiološki i genetički faktori, za koje se pretpostavlja da uzajamno rezultuju patološkom reakcijom periimplantatnog tkiva.

Kliničke studije su pokazale da periimplantitis može dovesti do odbacivanja implantata. U proceni stepena zapaljenja periimplantatnih tkiva osnovnu ulogu imaju klinički i rendgenološki nalazi.

Klinička procena stanja periimplantatnog tkiva zasnovana je na stanju gingive, rasklaćenosti implantata i vidljivim parametarima inflamacije koji su prisutni tek kod odmaklog periimplantitisa.

Periimplantitis se klinički manifestuje većim ili manjim otokom mekog tkiva oko implantata, crvenilom, krvarenjem na najmanji nadražaj, povećanjem dubine periimplantantog sulkusa, supuracijom i bolom.

Rendgenološki nalaz se karakteriše pojačanom resorpcijom kosti koja se prezentuje kao klinasta resorpcija sa mezijalne i distalne strane vrata implantata. Radiološke procene se najčešće primenjuju iako one mogu biti neprecizne, pošto daju samo odnos koštanih tkiva mezijalno i distalno od nosača jer je nemoguće na snimku uvideti stanje bukalne i lingvalne kosti.

Meko tkivo implantatne regije, fizički oštećeno nakon akta implantacije, reaguje zapaljenskom reakcijom. Zapaljenska reakcija je neophodna u odvijanju procesa zarastanja periimplantatnih tkiva. To je proces čiji je cilj da se oštećenje ograniči na mesto povrede i u kome dolazi do brze migracije neutrofila iz periferne krvi na mesto povrede. U povređenom tkivu dominiraju makrofagi čija je ključna uloga u reparaciji tkiva koju ostvaruju posredstvom solubilnih medijatora. Smatra se da su T limfociti odgovorni za formiranje ožiljnog tkiva nakon povrede, njegovu konzistenciju i ćelijsku proliferaciju u procesu zarastanja (Tales i sar., 2008). Pretpostavlja se da je regulacija produkcije citokina u povređenim periimplantatnim tkivima nakon implantacije u disbalansu što sigurno dovodi do usporenog zarastanja rane ili pak do prekomerne proliferacije povećanom sintezom kolagena i stvaranjem hipertrofičnih ožiljaka. Vezivno tkivo čini osnovu ožiljnog tkiva i aktivno učestvuje u procesima zarastanja rane. Za vreme procesa zarastanja periimplantatnih mekih tkiva fibroblasti prolaze kroz četiri faze: proliferaciju, migraciju, sintezu proteina ekstraćelijskog matriksa i ekspresiju aktinskih vlakana. Kada je sintetisana dovoljna količina proteina i kolagenih vlakana (nakon 10 do 14 dana), dolazi do iščezavanja fibroblasta i smanjenje sinteze kolagena. U ekstraćelijskom prostoru podležu modifikaciji i dolazi do umrežavanja. Reepitelizacija nastalog defekta nakon implantacije počinje nekoliko sati od povrede i tom prilikom proteini bazalne membrane epitela mekih tkiva prijanjaju uz bazalnu membranu i preko hemidezmozoma se vezuju za površinu ugrađenog implantata.

#### **1.2.4. Etiološki faktori**

Dva glavna etiološka faktora koja značajno doprinose nastanku periimplantatnog mukozitisa i resorpciji koronarnog dela koštanog tkiva su:

- a) bakterijska infekcija
- b) biomehanički faktori

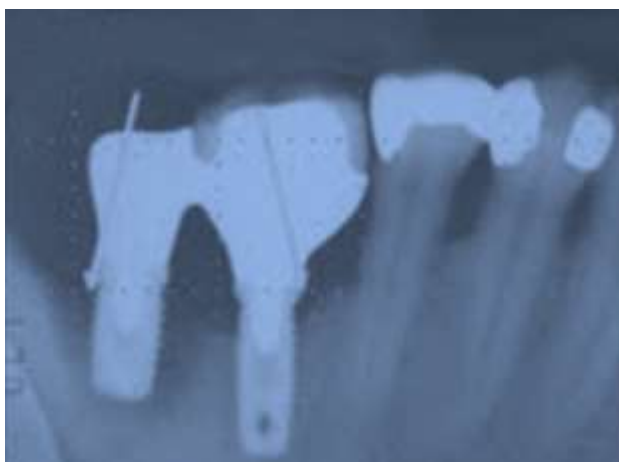
Postoje značajni dokazi koji dovode u vezu lošu oralnu higijenu, pušenje i prethodnu sklonost ka parodontopatiji u vezu sa nastankom periimplantitisa.

Postojali su pokušaji povezivanja dijabetesa i konzumiranja alkohola sa periimplantitisom međutim nema dovoljno podataka koji bi na to ukazali (Heitz-Mayfield, 2008). Kod osoba koje su prethodno bolovala od parodontopatije postoji rizik od nastanka periimplantitisa istim bakterijama kao i parodontopatija ali je tkivni odgovor u slučaju periimplantitisa jače izražen. Kod pacijenata koji su prethodno imali parodontopatiju javlja se veći gubitak marginalne kosti i manja stopu uspeha implantata (De Boever i sar., 2009).

#### **1.2.5. Bakterijska infekcija**

Mikroorganizmi usne šupljine, prvenstveno bakterije, se smatraju inicijatorom lokalnog upalnog procesa.

Prilikom bakterijske infekcije, ako se dentalni plak akumulira na implantatnoj površini, 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 (Slika 9).



**Slika 9.** Rengenološki nalaz periimplantitisa

Patogenost mikroorganizma zavisi od:

- Interakcije sa drugim mikroorganizmima
- Sposobnosti da reaguju sa provociranim odgovorom domaćina
- Oslobođanja 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:

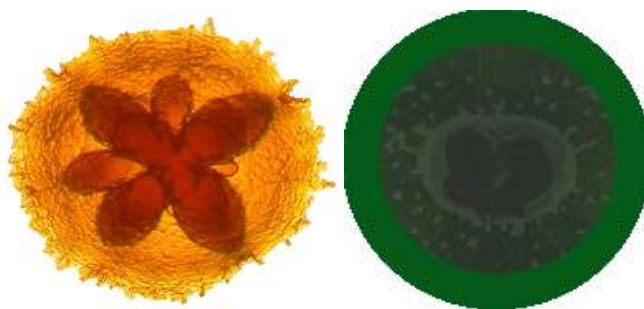
- Adherira na neku od ponuđenih površina
- Da se množi
- Da se uspešno nadmeće protiv drugih bakterijskih vrsta na području
- Da se brani mehanizmima odbrane domaćina

Bakterijski LPS može biti signal endotelnim ćelijama koje ispoljavaju leukocitne adhezione molekule koji iniciraju ekstravazaciju leukocita u oblast infekcije. Tom prilikom aktiviraju se i makrofage da produkuju nekoliko medijatora kao što su TNF $\alpha$  i IL1.

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.

Sastav biofilma u zdravim tkivima oko implantata (preovladavaju gram + štapići i koke) se razlikuje u odnosu na periimplantatne lezije. Dominantni mikroorganizmi izolovani iz subgingivalnog plaka u slučaju periimplantitisa su Gram-negativni bacili i spirohete (Slika 10). 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).





**Slika 10.** Slike najvažnijih patogena uzročnika periimplantitisa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Porphyromonas gingivalis*

Prve podatke vezane za mikrobiološku floru i neuspeh implantata prezentovali su Mombeli i Lang 1994. Mikrobiološki uzorci sa implantata koji su smatrani uspešno prihvaćenim od strane tkiva, dominantno su sadržavali mikroorganizme oblika koka, dok je kod neuspelih 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.

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.

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/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

komponentata 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 i
- 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.

Proporcija oštećenja uzrokovanih direktnim efektom bakterija i indirektno dejstvom posredovanim odgovorom domaćina još uvek nije utemeljena. Iako brojne bakterije mogu da degradiraju tkivo direktno, Birkedal-Hansen i sar., 1993. godine su ustanovili da je degradacija vezivnog tkiva domaćina uglavnom posledica mehanizama odbrane samog domaćina, odnosno pokušaj domaćina da se samozaštiti apikalnom proliferacijom spojnog epitela, sklanjajući se od toksičnih korenskih površina radi izbegavanja progresije lezija.

#### **1.2.6. Biomehanički faktori**

Odgovor periimplantatnog tkiva koji je povezan sa prekomernim opterećenjem implantata u funkciji može imati uticaja na resorpciju koštanog tkiva. Jake biomehaničke sile mogu dovesti do velikog opterećenja implantata i mikrofraktura u koronarnom kontaktu kost-implantat, što dovodi do gubitka oseintegracije oko vrata implantata. U biomehaničke faktore koji mogu uzrokovati periimplantitis ubrajaju se loš kvalitet kosti u koju je ugrađen implantat, statički loše planiran protetski rad, mehanička nestabilnost implantata, prevremeno opterećenje implantata i još mnogi drugi faktori.

Osim bakterijske infekcije nađena je povezanost između okluzalnog opterećenja i marginalnog koštanog gubitka kod periimplantitisa.

### **1.2.7. Faktori rizika**

Mnogobrojnim istraživanjima ustanovljeni su brojni faktori rizika koji dovode do nastanka i progresije periimplantitisa. U ove rizike se ubraja i prethodna sklonost ka parodontopatiji koja iako direktno ne utiče na preživljavanje implantata, utiče utoliko što je uočeno da većina ispitanika kod kojih je došlo do gubitka implantata prethodno su imali problem sa parodontopatijom (Schou i sar, 2006; Van der Weijden i sar, 2005) uz to, ti ispitanici su uglavnom bili pušači. Karoussis i sar., 2004 godine su poredili stopu uspeha, neuspeha i povećanog neuspeha implantata kod kojih je došlo do komplikacija zbog parodontopatije ili nekog drugog razloga. Grupa sa prethodno uzetom anamnezom parodontopatije je imala značajno veću incidencu periimplantitisa (28.6%) u odnosu na grupu koja nije imala istoriju parodontopatije (5.8%).

Kao još jedan faktor rizika ustanovljena je neadekvatna oralna higijena tj loša kontrola dentalnog plaka. Ustanovljeno je da postoji i povećan rizik za periimplantitis kod pušača. Klokkevold i sar., 2000-te godine su saopštili da 78% implantata ugrađenih pušačima ima dijagnozu periimplantitisa. Pacijenti sa dijabetisom imaju povećanu incidencu periimplantitisa. U poslednje vreme sve veći broj studija je ukazao na važnost genetskih faktora kao faktora rizika. Međutim uticaj pojedinih polimorfizama je i danas ostala nerazjašnjena u potpunosti.

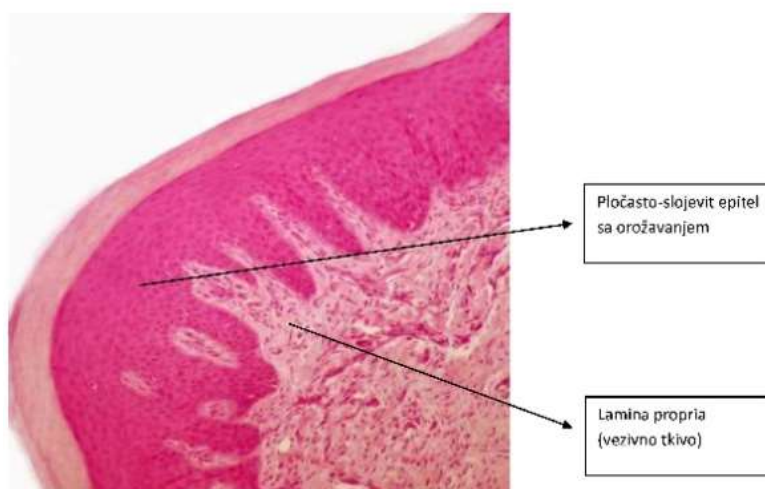
### **1.3. Imunski sistem**

Imunski sistem je odbrambeni sistem organizma koga čine ćelije i molekuli uključeni u imunski odgovor koji predstavlja zajednički i koordinisani odgovor imunskog sistema na strane agente (Kindt i sar., 2006). Funkcionalnost imunskog sistema se može posmatrati kroz dve komponente ovog sistema:

- a) Urođeni imunski sistem koji je odgovoran za inicijalno prepoznavanje patogena i nespecifični brzi odgovor bez razvijanja imunske memorije
- b) Adaptivni imunski sistem koji ima sposobnost prilagođavanja na patogene antigene i razvijanja imunske memorije za buduće kontakte sa patogenima.

### 1.3.1. Imunski odgovor na patogene usne šupljine

Održavanje fiziološkog integriteta mukoze je složen proces zavisian od lokalnih i sistemskih imunskih reakcija a predstavlja ključ očuvanja zdravlja oralne šupljine. Zdravlje usne duplje zavisi od integriteta oralne mukoze koja kada je zdrava ne dozvoljava prodor mikroorganizama i drugih štetnih toksina u organizam. Sposobnost oralne sluzokože da spreči prodor mikroorganizama pripada epitelnoj barijeri, granuliranom sloju kao i bazalnoj membrani (Lindhe i sar., 2008). Epitelne ćelije oralne sluzokože sintetiziraju peptide, defenzine koji se nalaze u granulama neutrofilnih leukocita i imaju ulogu prirodnih antibiotika (sprečavaju razvoj različitih patogenih bakterija) (Slika 11). U lamini propria koja se nalazi ispod bazalne membrane, postoje usamljeni limfociti kao poslednja odbrambena barijera.



**Slika 11.** Epitel oralne sluzokože

Najvažniji događaj u inicijaciji imunskog odgovora je prepoznavanje mikroorganizma i njihovih produkata. Ćelije urođenog imunskog sistema formiraju prvu liniju odbrane organizma, pri tome uništavajući ih ili ih prezentujući T i B limfocitima koji imaju centralno mesto u stečenom imunskom odgovoru. Komponente urođene imunosti prepoznaju strukture koje su zajedničke za klase mikroorganizama a nema ih na ćelijama domaćina. Takve strukture su označene kao molekularni obrasci patogena (PAMP) kako bi se naznačilo da pripadaju istom tipu patogena. Na površini različitih ćelija imunskog sistema najčešće makrofaga i dendritičnih ćelija nalaze se receptori za prepoznavanje obrazaca (PRPs). Aktivacijom ovih receptora stimuliše se transkripcija gena uključenih u inflamatorni odgovor (Garlet i sar., 2010).

Proinflamatorni citokini makrofaga (IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ ) snažno stimulišu limfocite. Aktivisani T limfociti proizvode niz citokina koji inhibiraju lučenje proinflamatornih citokina utičući na smanjenje aktivnosti osteoklasta i resorpciju kosti.

Zavisno od citokina koje stvaraju Th ćelije (pomoćničke T ćelije limfocita) se dele na Th1 i Th2 subpopulacije. Th1 ćelije sekretuju interleukin 2 (IL2) i interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) koji reagujući sa fagocitima pomažu u destrukciji intraćelijskih patogena. Th2 ćelije proizvode interleukine IL4, IL5, IL6 i IL10 i stimulišu B ćelije na produkciju antitela. Citokini iz Th1 ćelija inhibiraju aktivnosti Th2 ćelija i obrnuto. Regulatorne T ćelije (Treg) regulišu odgovor drugih T ćelija, a sve T ćelije deluju preko oslobođenih citokina ili direktnom interakcijom između ćelija.

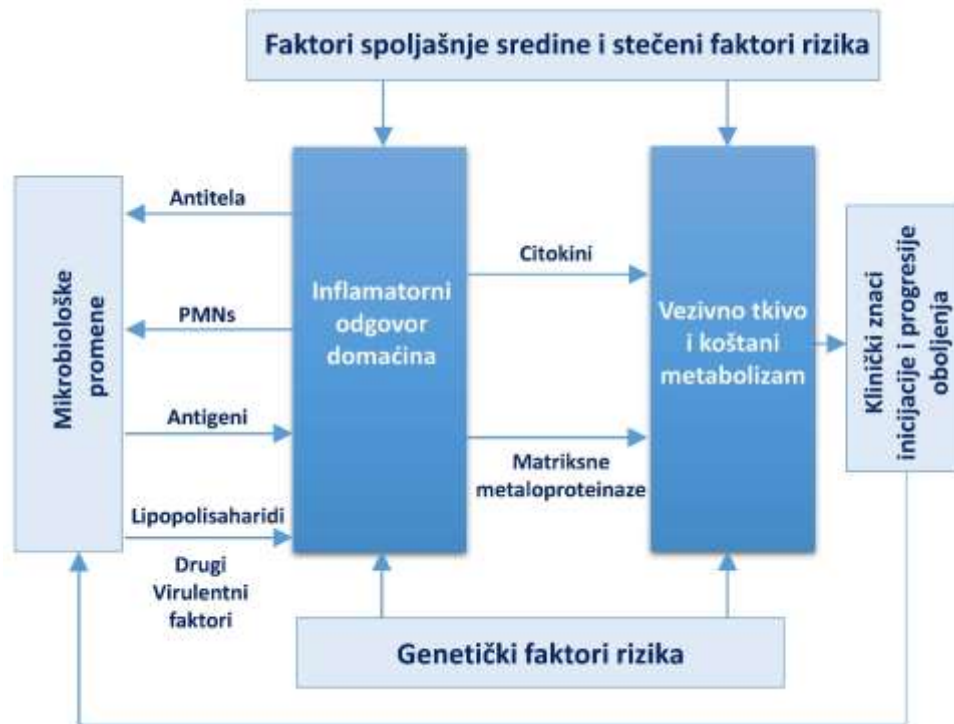
Mehanizmi odbrane koji interreaguju jedni sa drugim, reprezentuju odgovor domaćina na patogene. Kao odgovor na specifičnu stimulaciju dolazi do hemotakse inflamatornih ćelija na mesto gde je potrebno ukloniti oštećeno tkivo (Gemmell, 2002). Sintetišu se proinflamatorni citokini, interferon tipa I (IFN I), hemokini, antimikrobni proteini, proteini uključeni u modulaciju receptora kako bi se eliminisao patogen i stimulisao oporavak tkiva nakon inflamacije. Međutim ukoliko je produkcija citokina prenaplašena usled invazije patogena, dolazi do progresije inflamacije.

Polimorfonukleari napadaju subgingivalne bakterijske vrste na najmanje dva načina:

- a) fagocitozom i konačno ubijanjem bakterijskih ćelija
- b) otpuštanjem lizozomnih enzima u pukotinu ili džepnih fagocitnih ćelija koji podstiču eliminaciju patogenih uzročnika iz organizma

### **1.3.2. Patogeneza periimplantitisa**

Spoznavanje dinamičkog procesa između oralnih bakterija i imunskog odgovora domaćina je ključno u razumevanju patogeneze parodontopatije i periimplantitisa. Bez obzira što samo prisustvo patogena nije dovoljno da bi se razvilo oboljenje, bakterije se smatraju inicijatorom lokalnog upalnog procesa. Za indukciju destrukcije parodonticijuma, bakterije moraju da postignu kritičan prag i da nadjačaju bakterije antagoniste i odgovor domaćina. Potpuno zaceljenje ili progresija promena u klinički manifestnu bolest zavisi isključivo od domaćinovog imunskog odgovora (Slika 12).



**Slika 12.** Patogeneza periimplantitisa

Prisustvo samih patogenih subgingivalnih bakterija ne rezultira u destruktiji tkiva u većini slučajeva. Mada su bakterije esencijalne za inicijaciju parodontopatije i periimplantitisa, količina plaka i vrsta bakterija ne mora obavezno da korelira sa ozbiljnošću oboljenja. Svaka osoba može da ima individualnu dozu zavisnog odgovora na bakterijske promene koje determinišu njenu/njegovu podložnost ka parodontopatiji/periimplantitisu. Većina individua je otporna na oboljenje i neće ga razviti.

Aktivacijom intraepitelnih B-limfocita sintetišu se prirodna imunoglobulinska antitela M (IgM) koji imaju važnu ulogu u zaštiti organizma od bakterija sa kojima organizam nije ranije bio u kontaktu. Aktivacija T intraepitelnih limfocita praćena je sekrecijom citokina. Citokini aktivacijom fagocitnih ćelija podstiču eliminaciju patogenih uzročnika iz organizma.

Neutrofili, kao prva linija odbrane imaju protektivnu i destruktivnu ulogu. Individue koje pate od poremećaja neutrofila imaju veću podložnost tkivnoj destruktiji.

Matriksne metaloproteinaze i/ili proinflamatorni citokini doprinose tkivnoj destruktiji u periimplantatnom tkivu (Garlet, 2010).

U normalnim okolnostima imaju protektivnu ulogu u prvoj liniji odbrane. U protektivnom lokalnom imunskom odgovoru snage nespecifične i specifične imunosti harmonično vode eliminaciji infektivnog agensa i uspostavljanju ravnoteže, u kojoj nema oštećenja periimplantatnih tkiva.

U uslovima akutne inflamacije neutrofil i makrofage nisu sposobne da zaustave infekciju i dolazi do pogoršanja. Prisustvo velikog broja oralnih bakterija može da indukuje tkivnu destrukciju indirektno aktivacijom ćelija odbrane domaćina koji mogu osloboditi medijatore koje stimulišu efekte vezivno-tkivne destrukcije.

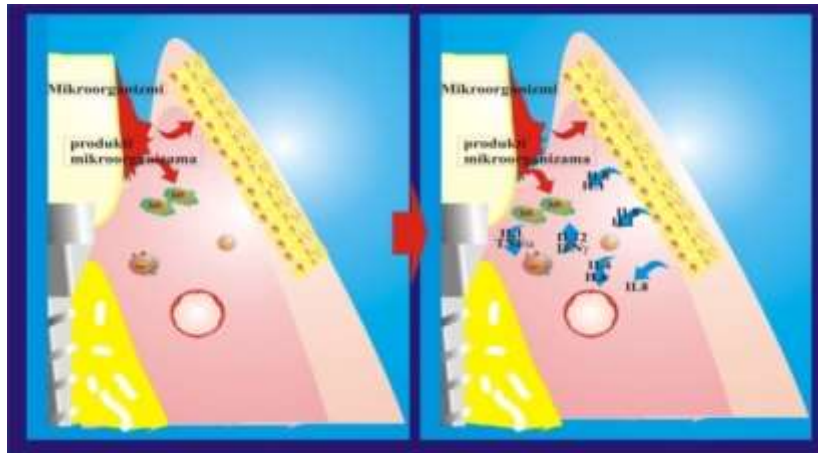
Tako, u periimplantitisu procesi inflamacije pokrenuti i kontrolisani specifičnim odgovorom posredovanim T limfocitima nisu efikasni u eliminaciji patogena i njihovih produkata. Ponavljani ciklusi inflamacije postepeno vode formiranju mikroprostora koje kolonizuju bakterije sa sledstvenim nekontrolisani lokalnim imunskom procesom i postepenim oštećenjem svih struktura periimplantatnog tkiva.

Zato se smatra da periimplantitis nastaje kao neregulisani (nekontrolisani) inflamatorni odgovor domaćina na antigene determinante bakterija iz dentalnog plaka.

Osnovu periimplantitisa čini kompleks interakcija koje se uspostavljaju između bakterijskih produkata, ćelija domaćina i lokalno produkovanih biološki aktivnih faktora.

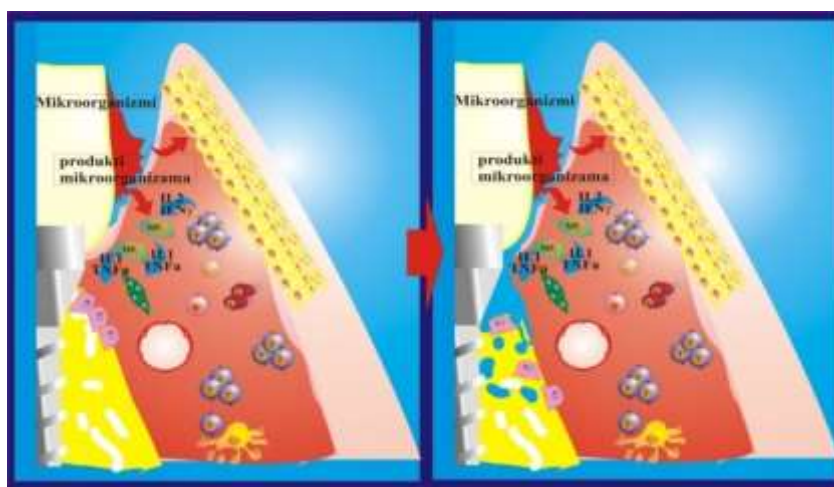
To znači da na lokalnom nivou priroda inflamatornog odgovora određuje stepen i ishod destruktivnih procesa. Destrukcija mekog i koštanog tkiva povezanog sa progresijom periimplantitisa je rezultat aktivacije domaćinovog imunskog odgovora na bakterijske promene i uglavnom je određen prirodom ovih inflamatornih odgovora.

Razumevanje kontakta između domaćina i oralnih bakterija je ključno za razumevanje patogeneze. Usled nagomilavanje dentalnog plaka neutrofil se regrutuju ka periimplantatnom džepu ili gingivalnoj pukotini zbog hemotaktičkih peptida koji se oslobađaju od strane bakterija (Slika 13).



**Slika 13.** Šematski prikaz aktivacije ćelija imunskog sistema prodorom bakterija u PICF

Bakterije oštećuju epitelne ćelije uzrokujući oslobađanje citokina koji privlače leukocite (predominantno neutrofile) ka pukotini. Neutrofilu unutar pukotine mogu da fagocituju i digestuju bakterije i tako ih uklone iz pukotine. Usled prevelike količine bakterija, dolazi do degranulacije neutrofila. Tom prilikom dolazi do tkivnog oštećenja od strane toksičnih enzima koji se oslobađaju iz neutrofila. Ovo ukazuje na činjenicu da ukoliko je prisutan prekomerni dentalni plak, neutrofil i barijera epitelnih ćelija neće biti dovoljna za kontrolisanje infekcije (Slika 14). U tom slučaju periimplantatno tkivo postaje inflamirano i to se klinički manifestuje kao mukozitis. Ako dođe do širenja inflamacije od marginalnog do potpornog tkiva dolazi do koštane destrukcije i gubitka pripoja što se označava kao periimplantitis (Heitz-Mayfield, 2008).



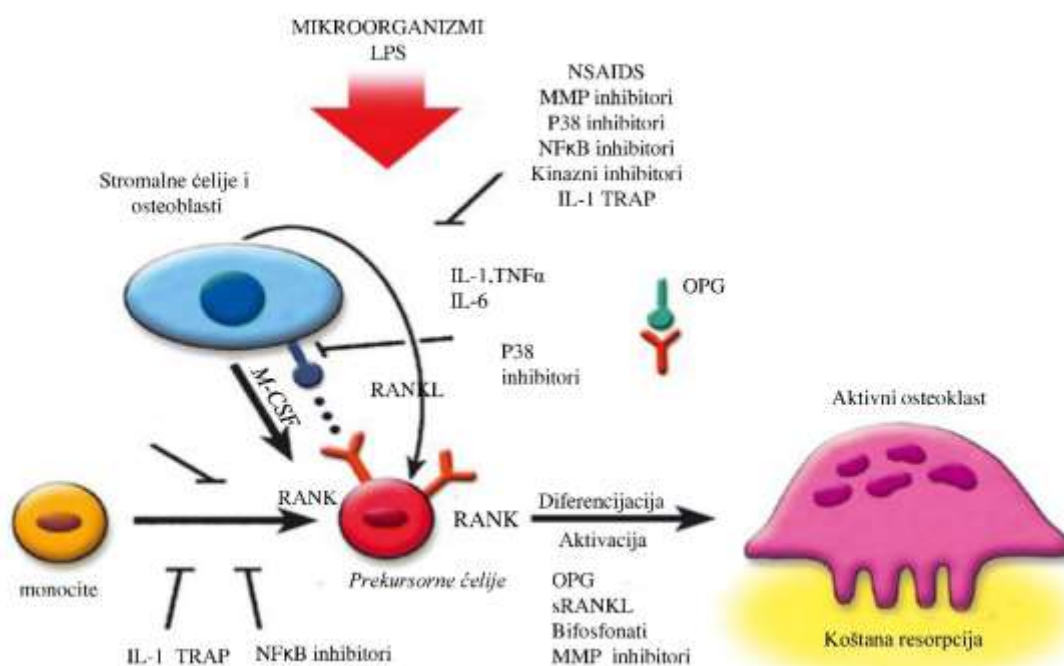
**Slika 14.** Šematski prikaz mehanizma nastanka tkivnog oštećenja



Promene unutar periimplantatnog tkiva imaju značajan uticaj na progresiju destrukcije. Dolazi do dinamičkog balansa između aktivnosti koštano formiranih osteoblasta i koštano resorbirajućih osteoklasta. Dok polimorfonuklearni limfociti (PMN) predstavljaju prvu liniju odbrane u zaštiti od patogena, povećani broj makrofaga u subepitelnom vezivnom tkivu je uključen u progresiju periimplantitisa.

Glavni patološki događaj u periimplantitisu je gubitak potporne kosti ugrađenog implantata u funkciji. Koštano tkivo karakteriše konstantna i dinamična remodelacija koja je posledica aktivnosti dve ćelijske populacije: osteoblasta i osteoklasta. Resorpcija koštanog tkiva je višefazni proces koji započinje proliferacijom nezrelih prekursora osteoklasta, njihovom diferencijacijom u osteoklaste i završava se razgradnjom neorganskog i organskog dela koštanog tkiva. Ovaj proces je zasnovan na inflamatornoj osteoklastogenezi koja ujedno predstavlja centralni patološki proces periimplantitisa.

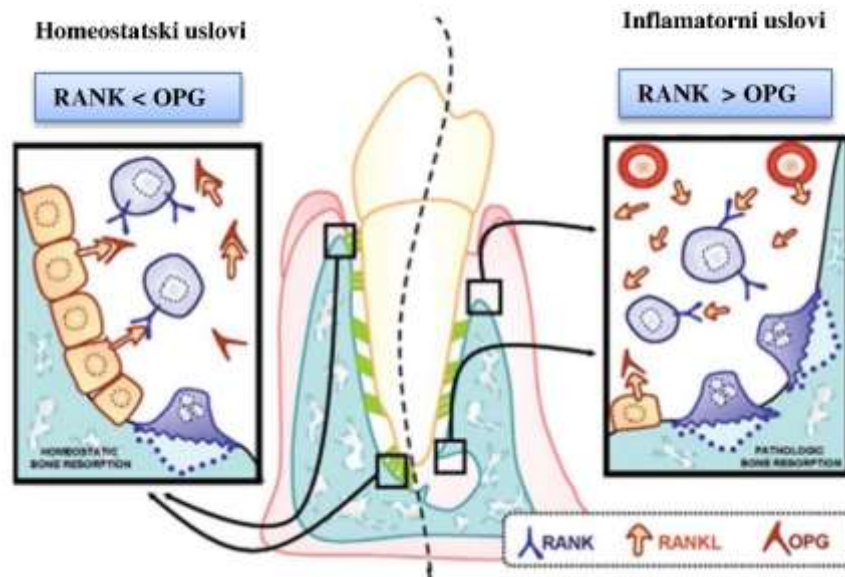
Inflamatorna osteoklastogeneza predstavlja proces sazrevanja preosteoklasta i pojačavanje aktivnosti zrelih osteoklasta pod uticajem kritičnih koncentracija proinflamatornih medijatora. Glavni regulatorni trougao kod ovog procesa je sistem koga čine *receptor aktivator nuklearni faktora kapa b* (RANK), njegov *ligand* (RANKL) i antagonist RANKL-a, *osteoprotežerin* (OPG), (Liu i sar., 2010) (Slika15).



**Slika 15.** Šematski prikaz inflamatorne osteoklastogeneze

Poslednjih godina dolazi do razvoja i ekspanzije oseoimunologije u kojoj su povezani imunološki procesi i procesi koštanog metabolizma, čak i same ćelije koštanog tkiva-osteoklasti nastaju fuzionisanjem monocita (Liu i sar. 2010). Agresivnost mikroorganizama se ogleda u njihovoj sposobnosti da zaobilaze fagocitoze kao najmanje štetnog oblika imunskog odgovora (Hajishengallis i sar., 2004) i dejstvom agresivnih enzima (Imamura, 2003) direktno oštećuju delovanje imuniteta stimulišući intezivan odgovor specifične imunosti (Graves i Cochran. 2003; Graves 2008). Ovi mikrororganizmi se odlikuju morfološkom i genetičkom rezistencijom, kao i specifičnim mehanizmima „skrivanja“ u tkivu, gde sve zajedno doprinosi kontinuiranoj infekciji koja rezultuje u dostizanju i održavanju visokih koncentracija pro-inflamatornih medijatora (Garlet i sar., 2006; Graves, 2008) što za posledicu daje pojačan imunski odgovor zbog nemogućnosti eliminacije infekcije a to rezultira oštećenjem tkiva.

Ključni momenat za aktivaciju osteoklastogeneze predstavlja dostizanje kritičnih koncentracija proinflamatornih citokina što predstavlja signal za diferencijaciju osteoklasta i pojačavanje njihove aktivnosti. Način na koji se to postiže je u odgovoru na stimulaciju faktorima virulencije patogena, povećanje ekspresije RANKL-a na membranama ćelija (Belibasakis i sar., 2007). To dalje dovodi do povećanja interakcije RANK-RANKL. Istovremeno, stimulacija lipopolisaharidom (LPS) dovodi do direktne aktivacije RANK-a (Otero i sar., 2010), gde kao krajnji ishod aktivacije RANK-a ligandom ili ligand-nezavisnim putem dolazi do proporcionalno intezivnog aktiviranja centralnog transkripcionog faktora, nuklearnog faktora kappa B (NF- $\kappa$ B) u regulaciji biosinteze proinflamatornih citokina i drugih medijatora uključenih u imunski odgovor (Nichols i sar., 2001). Kao posledica velikog broja interakcija RANK-RANKL dolazi do značajne produkcije proinflamatornih medijatora što predstavlja signal za diferencijaciju osteoklasta (Cochran, 2008), i sa druge strane drugi tip signala za auto-ligaciju RANK-a čime se proces dalje intezivira (Otero i sar., 2010) (Slika 16). Usled konstantnog delovanja stimulacije LPS, javlja se nemogućnost eliminacije patogena pa je dalja stimulacija kontinuirana i proces dobija konfiguraciju „začaranog kruga“.



**Slika 16.** Balans RANKL/OPG sistema u uslovima bez i sa prisustvom inflamacije

Centralni element reakcije između implantata i tkiva, osim inflamatorne osteoklastogeneze i površine oralnog implantata čine i fizički i hemijski sastav koji značajno utiču na lokalni metabolizam periimplantnog tkiva (Newman i sar., 2007). Titan je opšte usvojen kao visoko biokompatibilni materijal. Istraživanja su pokazala da različite površine izazivaju drugačiji odgovor tkiva mereno na nivou RANKL/OPG sistema (Mamalis i sar., 2011). Dodatno, imunohistochemijski je pokazano da karakteristike površine implantata utiču na progresiju periimplantitisa (Albouy i sar., 2012). Faktor koji se nadovezuje na uticaj površine implantata je nivo regenerativnog potencijala tkiva u koji se implantira.

Svi ovi faktori doprinose intenzivnom i drugačijem odgovoru periimplantnih tkiva u odnosu na parodontalna tkiva. Nowzari sa saradnicima 2010. je pokazao da je koncentracija proinflamatornih citokina značajno veća u periimplantnoj tečnosti zdravih periimplantnih tkiva u odnosu na gingivalnu tečnost zdravih zuba. Berglundh i sar., 2011 su potvrdili da, uprkos kliničkim i etiološkim sličnostima periimplantitisa i parodontopatije, postoji velika histopatološka razlika.

### 1.3.3. Citokini i imunski odgovor kod periimplantitisa

Mehanizmi odbrane gingive sinhronizovano upravljaju komunikacijom putem ćelijskih signala (citokina) povezujući različite grupe ćelija. Citokini predstavljaju veliku familiju proteinskih molekula koji funkcionišu kao medijatori i regulatori ćelijskih komunikacija kako u fiziološkim tako i u patološkim uslovima.

Na osnovu dejstva citokini se dele na :

- Citokine koji stimulišu nespecifični imuni odgovor (produkuju ih ćelije mononuklearnog fagocitnog sistema, dendritične ćelije i makrofagi a u manjoj meri i T limfociti.) Predstavnici ove grupe su IL1,IL6,IL10,IL12,IL15,IL18
- Citokine koji stimulišu specifični imuni odgovor (produkuju ih dominantno T limfociti koji prepoznaju antigen specifičan za ćelije). Najvažniji predstavnici ove grupe su IL2, IL4, IL5, IL13, intereferon gama (INF $\gamma$ ), transformišući faktor rasta beta (TGF $\beta$ ), limfotoksin (LT)
- Citokini koji stimulišu hematopoezu (produkuju se od strane stromalnih ćelija kosne srži a ispoljavaju stimulatorni efekat na rast i diferencijaciju nezrele leukocitarne loze

Citokini učestvuju u svim etapama inflamacijskog procesa. Neophodni su za odvijanje svih faza imunskog odgovora i značajan su faktor regulacije tipa, jačine i dužine imune reakcije. Nema imunskog odgovora u organizmu bez produkcije citokina tako da oni regulišu i specifični i nespecifični imuni odgovor. Citokini mogu biti i pozitivni i negativni regulatori imunskog odgovora. Deluju preko receptora koji se nalaze u samoj ćeliji ili na ćelijskoj membrani. Nakon vezivanja za receptor na ciljnoj ćeliji dolazi do transkripcije gena sa funkcionalnim ili fenotipskim promenama ciljne ćelije. Sintezu i otpuštanje citokina mogu zaustaviti razni inhibitori modulirajući biološku aktivnost citokina ili inhibirajući sposobnost odgovora ciljne ćelije.

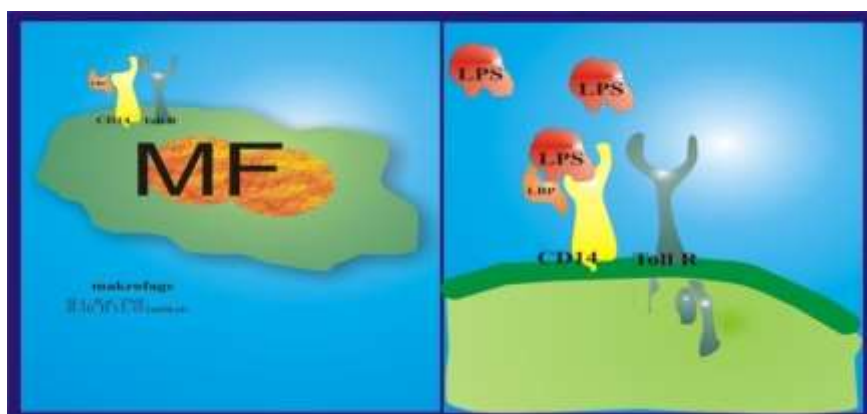
Citokini su grupa solubilnih, niskomolekularnih proteina, nespecifičnih medijatora zapaljenske reakcije. Prenose brojne međućelijske signale koji su potrebni za integrisani odgovor ćelije na različite spoljašnje stimulse. Produkcija citokina zajedno sa produkcijom ostalih medijatora su u direktnoj vezi sa koštanom destrukcijom i vezivno tkivnom degradacijom. Shodno tome odgovor domaćina može biti protektivan i destruktivan. Specifični geni mogu da determinišu stepen u kome će individualni odgovor biti protektivan ili destruktivan (Garlet, 2010).

Na samom početku bakterijske invazije na periimplantatno tkivo, endotoksini bakterijskog zida utiču na monocite, makrofage i lokalne ćelije stimulišući ih na ekspresiju gena i sintezu citokina. Oslobođeni citokini potom ispoljavaju svoje efekte vezujući se za specifične receptore na površini ćelija. Odmah na početku sintetišu se

neki od proinflamatornih citokina i hemokini  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL1}\beta$ ,  $\text{IL6}$ ,  $\text{IL8}$  koji su uključeni u nastanak zapaljenske reakcije.  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{IL12}$  su citokini koji stimuliraju proliferaciju i aktivaciju NK ćelija dok su  $\text{IL10}$ ,  $\text{TGF}\beta$  citokini koji lokalizuju zapaljenski proces.

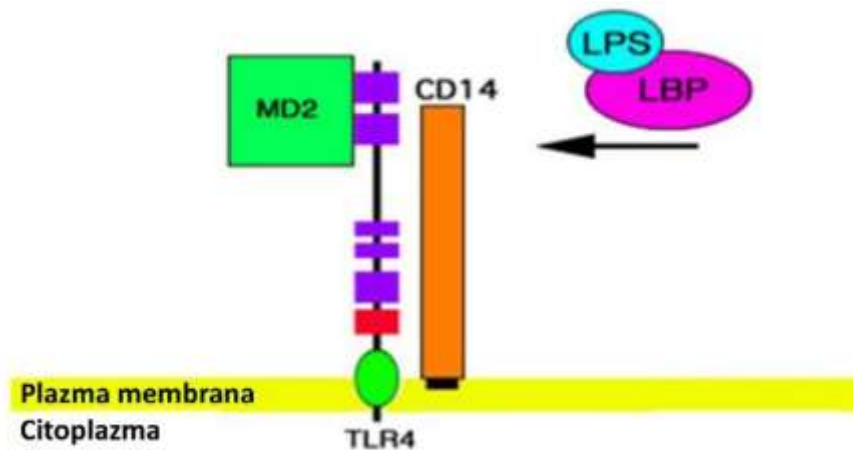
### 1.3.3.1 CD14

CD14 (Engl. Cluster of Differentiation) predstavlja receptor za veoma širok opseg mikrobioloških produkata i ima značajnu ulogu u inflamatornoj kaskadi. Učestvuje u prepoznavanju lipopolisaharida (LPS ili endotoksina) Gram (-) bakterija, lipoteihoične kiseline i peptidoglikana Gram (+) i Gram (-) bakterija, mikobakterija i virusa. Učestvuje u iniciranju urođenog imunog odgovora na bakterijsku invaziju. CD14 postoji u membranskoj-glikoproteinskoj formi na površini monocita, makrofaga i neutrofila (Slika 20), ali i u solubilnoj proteinskoj formi u serumu (sCD14). Solubilna forma CD14 omogućava ćelijama koje konstitutivno ne ekspimiraju CD14 na svojim membranama da se aktiviraju na prisustvo patogena. Na ovaj način se pojačava odgovor kako na LPS tako i na peptidoglikane LPS kao antigensku determinantu bakterija, što predstavlja aktivator monocita i makrofaga.



**Slika 17.** Aktivacija monocita/makrofaga preko CD14 i Toll-like receptora

Lipopolisaharid (LPS) Gram-negativnih bakterija se po oslobađanju iz bakterije u prvom koraku vezuje za LPB (Engl. Lipopolsaccharid Binding Protein) čime se stvara LPS-LPB kompleks. Receptor za LPS-LPB kompleks je membranski CD14. On zatim omogućava prebacivanje LPS iz ovog kompleksa na Toll-like receptor 4 (TLR 4) koji predstavlja važan molekul u signalnoj transdukciji u odgovoru na infekciju. Dodatni ekstracelularni protein MD2 se takođe vezuje za kompleks CD14. Ovi koraci omogućavaju aktivaciju mehanizama odbrane urođene imunosti koja je praćena i sekrecijom citokina (Slika 21).



**Slika 18.** Vezivanje kompleksa LPS-LPB za CD14 receptor

Ovaj signal pokreće produkciju i otpuštanje velikog broja medijatora kao što je IL1 $\beta$  i TNF $\alpha$  koji amplifikuju signal i prenose ga do drugih ćelija i tkiva sa ciljem uništenja mikroorganizama. Ovi citokini dovode do adhezije neutrofila za endotelnu ćeliju, aktivacija koagulacije, generisanja brojnih sekundarnih inflamatornih medijatora, tj drugih citokina, prostaglandina, leukotrijena i proteaza. Migracija neutrofila na mestu infekcije dovešće do eradikacije mikroorganizama i ukoliko se ovaj proces ne zaustavi doći će do teških oštećenja tkiva.

### 1.3.3.2. Interleukin 6 (IL6)

Interleukin 6 je plejotropni citokin, kao i IL1 $\beta$  i TNF $\alpha$ , koji se sekretuje u ranoj fazi imunološkog odgovora (Kishimoto, 2005.). Aktiviraju ga brojni citokini uključujući IL1 $\beta$  i TNF $\alpha$ , a produkuje ga široki spektar imunokompetentnih ćelija i to aktivisani T limfociti, B limfociti i mijeloidne ćelije, pre svih makrofagi i dendritske ćelije i neke ćelije koje ne pripadaju imunskom sistemu kao npr. keratinociti, endotelne ćelije i fibroblasti (Taylor, 2005). Sem sistemskih, IL6 ispoljava brojne aktivnosti vezane za lokalni imunski odgovor karakterističan za parodontopatiju. Pre svega on je regulator proliferacije i diferencijacije B limfocita (Kishimoto, 2005), a takođe je važan za diferencijaciju dendritskih ćelija (Park i sar., 2004). Sekretuju ga i osteoblasti stimulišući resorpciju kosti i razvoj osteoklasta (Taylor, 2005). IL6 je stimulator diferencijacije T limfocita i ima centralnu ulogu u balansu različitih subpopulacija ovih ćelija a posebno u aktivaciji T pomoćničkih ćelija koje sekretuju IL17 promovišući Th17 odgovor.

### **1.3.3.3. Interleukin 10 (IL10)**

Interleukin 10 (IL10) je antiinflamatorni citokin koga proizvode monocite/makrofage, B ćelije i T helper ćelije. On je supresor imunskog odgovora i samim tim uključen u kontrolu urođenog i stečenog imunskog odgovora. Biološke funkcije ovog citokina zasnovane su na inhibiciji aktivnosti makrofaga, inhibiciji oslobađanja citokina od strane makrofaga, inhibiciji prezentacije antigena od strane makrofaga kao i povećanje koncentracije IL1 receptor antagonista. Smatra se da je IL10 najvažniji antiinflamatorni citokin imunskog odgovora. On je potentni inhibitor Th1 grupe citokina. IL10 indirektno inhibira sintezu citokina od strane aktiviranih T i Nk ćelije što znači da je limfocitni citokin. Ima značajnu ulogu u inhibiciji monocitno/makrofagne sinteze citokina, proinflamatorne efekte slične onima koje ima IL4. U sinergiji sa IL2 deluje kao faktor rasta za B i T ćelije.

Interleukin 10 suprimira ćelijski odgovor na zapaljenje čime utiče i na tok periimplantitisa oboljenja.

Iako gen koji kodira IL10 nije izraženo polimorfan do danas je otkriveno nekoliko njegovih varijacija. Među njima se posebno ističe polimorfizam na poziciji -1082 koji dovodi do smanjenja produkcije funkcionalnog proteina, a učestaliji je kod obolelih od parodontopatije. Zbog antiinflamatorne uloge u razvoju parodontopatije postoje nagoveštaji da bi IL10 mogao imati važnu ulogu u patogenezi ovog oboljenja.

### **1.3.3.4. Faktor nekroze tumora (TNF $\alpha$ )**

Faktor nekroze tumora (Engl. Tumour Necrosis Factor-TNF) se smatra osnovnim medijatorom zapaljenja i prvim citokinom koji se oslobađa kao reakcija na endotoksine pa je njegova vrednost kao markera ograničena, a njegov značaj se ogleda u tome što on pokreće kaskadu stvaranja drugih proinflamatornih citokina koji doprinose razvoju oboljenja.

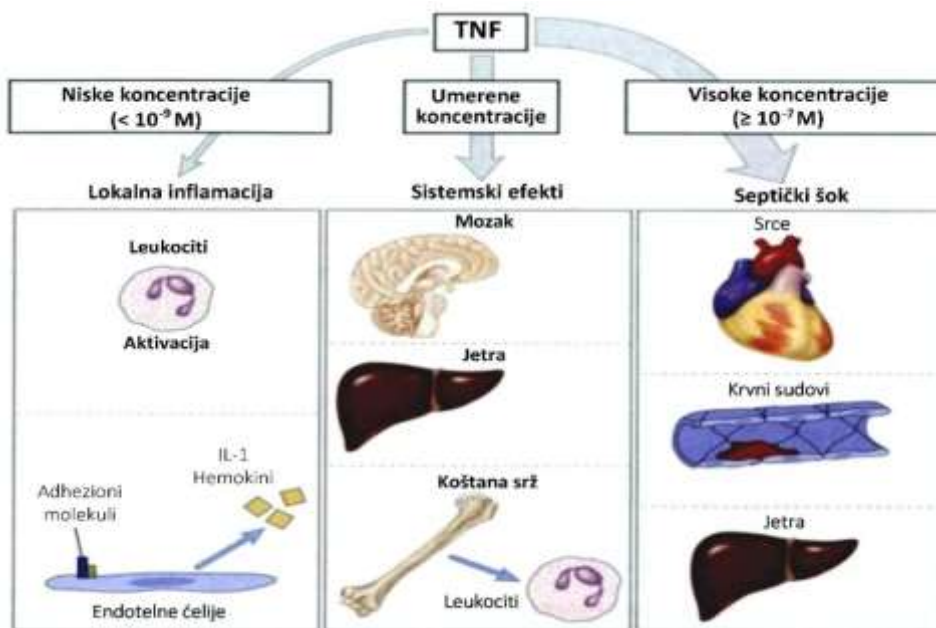
Faktor nekroze tumora je glavni medijator akutnog inflamatornog odgovora na Gram-negativne bakterije i druge infektivne agense i odgovoran je za mnoge sistemske komplikacije kod ozbiljnih infekcija. On je proinflamatorni citokin koga proizvode veliki broj ćelija (monociti/makrofagi, limfociti, NK ćelije, neutrofili, mastociti). Originalno je identifikovan kao supstanca prisutna u serumu životinja tretiranih

bakterijskim endotoksinom (LPS) koji uzrokuju nekrozu tumora *in vivo*. Ovaj efekat je posledica uslova delovanja u visokoj koncentraciji TNF-a.

TNF $\alpha$  proizvode predominantno aktivirani makrofagi, T i B limfociti i fibroblasti. On stimuliše hemotaksu neutrofila, aktivira inflamatorne ćelije i reguliše akutnu fazu inflamatorne reakcije stimulacijom sekrecije drugih citokina, među njima i IL8. Osnovna fiziološka funkcija TNF je stimulisanje regrutovanja neutrofila i monocita na mesto infekcije i aktiviranje ovih ćelija u uklanjanju mikroorganizama. TNF deluje na vaskularne endotelne ćelije u pravcu ekspresije adhezionih molekula, što ih čini adhezivnim za leukocite, prvenstveno za neutrofile, a zatim i za monocite i limfocite. TNF stimuliše endotelne ćelije i makrofage na sekreciju hemokina što pojačava afinitet leukocitnih integrina za njihove ligande i indukuje hemotaksu i regrutovanje leukocita. TNF indukuje apoptozu pojedinih ćelijskih tipova. Biološka aktivnost TNF zavisna je i od same koncentracije prisutnog TNF u organizmu (Slika 19). Tako pri niskim koncentracijama TNF deluje kao medijator akutne lokalne zapaljenske reakcije i učestvuje u procesima modelovanja tkiva u uslovima tkivne reparacije. Pri visokim koncentracijama TNF dospeva u cirkulaciju gde deluje kao endokrini hormon na udaljene ćelije i tkiva, ispoljavajući sistemske efekte. U visokoj koncentraciji može delovati kao endogeni pirogen na regulatorne regione hipotalamusa izazivajući groznicu. Osnovna fiziološka funkcija TNF je da stimuliše migraciju neutrofila i monocita na mesto infekcije i da ih aktivira da uklone mikroorganizme. TNF indukuje ekspresiju adhezionih molekula (selektina i liganda za integrine leukocita) na endotelijalnim ćelijama i time omogućuje adheziju prvo neutrofila, a zatim i monocita i limfocita. TNF stimuliše endotelijalne ćelije i makrofage da sekretuju hemokine koji indukuju hemotaksu i nakupljanje leukocita. Pod dejstvom TNF mononuklearni fagociti sekretuju IL1. TNF indukuje apoptozu nekih vrsta ćelija.

Opisani efekti se dešavaju lokalno tokom imunskog odgovora na mikroorganizme . U teškim infekcijama TNF se produkuje u velikim količinama i dovodi sistemskih kliničkih i patoloških poremećaja (produkovani TNF ulazi u krvotok i deluje na udaljenim mestima u organizmu kao endokrini faktor).

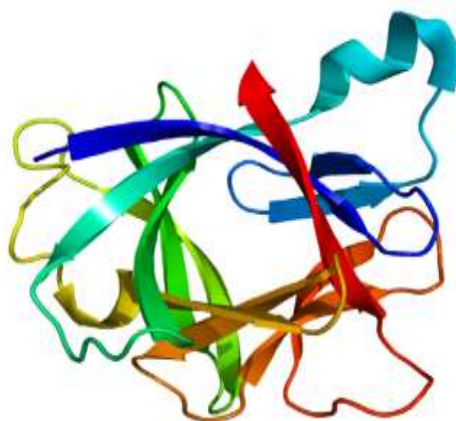




**Slika 19.** Uticaj različitih koncentracija TNF na organizam

### 1.3.3.5. Interleukin 1 beta ( IL1 $\beta$ )

Interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) je citokin sa proinflamatornim delovanjem, medijator akutnog inflamatornog delovanja (Slika 17). Uglavnom ga proizvode mononuklearni fagociti (makrofage), ali i druge ćelije u odgovoru na inflamatorne stimule. Osnovna funkcija IL1 (slično kao i TNF) je u nespecifičnoj imunosti i inflamaciji. Obe forme IL1 ( $\alpha$  i  $\beta$ ) se sintetiziraju kao prekursori veće molekulske mase (33kDa) koje podležu proteolitičkoj degradaciji pomoću enzima koji se nalaze u monocitima / makrofagama nakon čega nastaju niskomolekularni produkti (oko 17 kDa).

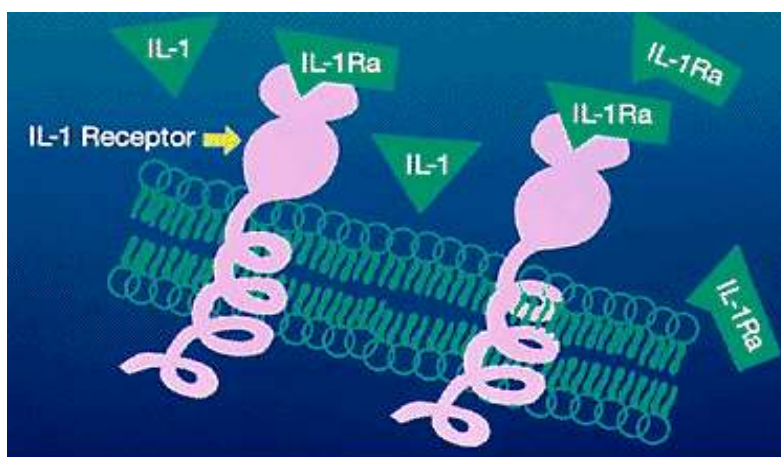


**Slika 20.** Kristalna struktura IL1  $\beta$

Biološki efekti IL1 zavise od stepena njihove produkcije. Pri niskim koncentracijama IL1 funkcioniše kao medijator lokalne zapaljenske reakcije. Deluje na endotelne ćelije pojačavajući ekspresiju površinskih molekula koji posreduju u adheziji leukocita kao što su ligandi za integrine. U većim koncentracijama dospeva u cirkulaciju i ispoljava sistemske efekte. Za razliku od  $TNF\alpha$  (sa kojim IL1 ima preklapajuće efekte), IL1 ne dovodi do tkivnog oštećenja, čak i u visokim koncentracijama nije letalan, ne deluje na tumore, stimuliše hematopoezu. Mononuklearni fagociti proizvode prirodni inhibitor IL1 koji je strukturalno homolog citokin i vezuje se za iste receptore samo što je biološki inaktivan pa je kompetitivni inhibitor IL1 (IL1ra). On je endogeni regulator dejstva IL1 (Dinnarello, 1998).

### 1.3.3.6. Antagonist interleukin 1 receptora (IL1 ra)

Mononuklearni fagociti proizvode prirodni inhibitor IL 1 koji je strukturalno homologan i vezuje se za iste receptore, ali je biološki inaktivan, pa je kompetitivni inhibitor IL1 (Slika18 ). On je endogeni regulator dejstva IL1.



**Slika 21.** Blokada vezivanja IL-1 za receptor vezivanjem IL-1 ra

Postoji nekoliko molekularnih formi IL1 ra. Jedna je veličine 17 kDa označena kao IL1 ra1, solubilna je i sadrži signalnu sekvencu, a druga i treća označena su kao IL 1 ra2 i IL1 ra3 ne sadrže signalnu sekvencu, ne napuštaju ćeliju i imaju ulogu u unutarćelijskoj inhibiciji.

IL1 ra funkcioniše kao kompetitivni inhibitor IL1 receptora, koji vezujući se za njega onemogućava vezivanje i time i aktivnost  $IL1\alpha$  i  $IL1\beta$ . Vezujući se za receptor, IL1 ra blokira inicijaciju unutarćelijske signalne transdukcije koja se ostvaruje vezivanjem IL1 za isti receptor.

#### **1.3.4. Lokalni odgovor periimplantatnog tkiva na bakterijsku infekciju**

Vezivanje struktura mikroorganizama za receptore epitelnih ćelija (Toll Like Receptor i NOD like receptor) pokreće signalne puteve i procese koji se završavaju indukcijom gena neophodnih za produkciju i sekreciju antimikrobnih peptida (Graves, 2008). Vezivanje bakterijskih produkata najčešće identifikovanih u ustima za TLR i NLR receptore epitela uzrokuje produkciju antimikrobnih peptida (defenzina, katepsina), slobodnih radikala, leukotriena, prostaglandina, hemokina i citokina (IL1, IL6, TNF $\alpha$ ) (Leber 2008). Sa druge strane, aktivacija lokalnih, rezidentnih ćelija koje prikazuju antigene (APC) u takvom mikrokruženju, uz lokalno produkovane slobodne radikale i hemokine uzrokuje produkciju IL6, IL12 i IL23, citokina ključnih za aktivaciju i diferencijaciju lokalno aktiviranih T limfocita. Pod uticajem ovih citokina, funkcionalno neopredeljeni T limfociti će se po aktivaciji diferencirati u Th1, Th17 i Th22 funkcionalne podgrupe, čija će lokalna sekretorna aktivnost upravljati eliminacijom infektivnog agensa i uspostavljanjem protektivnog odgovora.

Lokalna produkcija citokina može zavisiti od interakcije specifičnih mikroorganizama sa tkivom gingive, ali i funkcije rezidentnih i infiltrišućih ćelija. Krajnji efektori oštećenja periimplantatnog tkiva su agresivni enzimi, metaloproteinaze, čija je lokalna aktivnost regulisana citokinima. Inflamatorni citokini (IL1, IL6, TNF $\alpha$ ), kao i citokini Th1/Th17 puta koji ih indukuju (IFN $\gamma$ , IL17, IL12, IL23), povećavaju lokalnu sekreciju i aktivnost metaloproteinaza, što rezultuje oštećenjem struktura perimplantatnog tkiva i stimulacijom mehanizama resorpcije kosti (Queiroz-Junior, 2008). Lokalna produkcija antiinflamatornih citokina, IL10 i TGF $\beta$ , umanjuje oštećenje perimplantatnog tkiva indukcijom tkivnih inhibitora metaloproteinaza (TIMP) i indukcijom inhibitora osteoklastogeneze.

Sa progresijom periimplantitisa koncentracije proinflamatornih citokina u PICF se povećavaju (Petkovic i sar., 2010), stoga su novija istraživanja usmerena na ispitivanja individualnih razlika u stepenu povećanja produkcije ovih medijatora zapaljenja.

Lokalni balans ovih medijatora, koji odražava lokalnu aktivnost ćelija koje ih proizvode, određuje stepen tkivne destrukcije. Patohistološki supstat oboljenja čini mononuklearni ćelijski infiltrat, čiji se sastav značajno menja u zavisnosti od stepena progresije procesa. Naime, predominaciju T limfocita u ranim lezijama, postepeno

smenjuju infiltrati B limfocita u kasnim, hroničnim ili aktivnim lezijama (Gemmel, 2002).

Centralna uloga T ćelija u etiopatogenezi parodontopatije, je prepoznata u radovima Seymour i sar., 1993. Uočeno je da su T ćelije uključene u homeostazu parodontalnog tkiva, modulaciju inflamatorno/imunog odgovora i prilikom posredovanja kod koštanog gubitka koji se javlja u parodontopatiji.

T ćelije su shodno njihovoj funkciji klasifikovane kao: Helper (Th) ćelije, citotoksične (Tc) ćelije, regulatorne (Treg) ćelije. Th ćelije igraju ključnu ulogu u procesu produkcije antitela pomoću B ćelija. Prisustvo dva različita subseta Th ćelija Th1 i Th2 su opisali

Dennison i sar 1997 i to je poslužilo u razjašnjenju patogenih mehanizama uključenih u parodontopatiju.

Pokazana je znatno veća heterogenost Th ćelija. Th17 i Treg ćelije su pridodate Th liniji, i drugi subsetovi kao što su Th22 i Th9 ćelije su identifikovane kao fenotipski različite u odnosu na postojeće Th ćelije. Pokazano je da Th ćelije ispoljavaju plastičnost, sposobnost da se transformišu iz jednog subseta u drugi. Veruje se da Th1 ćelije evoluirale u pravcu da pruže zaštitu protiv intracelularnih patogena. Ove ćelije proizvode interferone koje su uključene u aktivaciju makrofaga, što igra važnu ulogu u fagocitozi, fiksaciji komplementa i opsonizaciji.

Pod uticajem brojnih inductivnih signala koji pokreću kaskadu intraćelijskih događaja dolazi do diferencijacije naivnih T ćelija u Th1 ćelije. Ova polarizacija ka Th1 je indukovana citokinima IL12 i IFN $\alpha$  koji su prisutni u inflamatornom miljeu. Th1 citokini su normalno proizvodjeni od strane dendritskih ćelija (Dc) ili NK ćelija. U parodontopatiji Dc infiltracija je strogo povezana sa gingivalnom inflamacijom. Ove ćelije imaju TLR na površini što im omogućava da odgovore na LPS, na patogene.

Th2 ćelije su evoluirale kao zaštita protiv parazitskih helminta. Ove ćelije proizvode IL4 koji je dodat na IL5 i IL13, koji su uključeni u patogenezu parodontopatije. Th2 razvoj je indukovano pomoću produkcije IL4, koji je proizvodjen pomoću naivnih T ćelija ili mastocita /makrofaga.

Th1/Th2 subsetovi vrše supresivni efekat jedan na drugi kroz različite mehanizme. Specifičan i nespecifičan odgovor domaćina određuje neuspjeh infekcije i da li će

inflamacija progredirati ka bolesti ili će biti kontrolisana. Th2 ćelije su povezane sa neprotektivnim odgovorom At i progresivnim parodontalnim lezijama a Th1 sa stabilnim lezijama (indikovan pomoću inhibitornih znakova protiv progresije bolesti (Gemmel i sar., 2004). Za Th1 ćelije se smatralo da deluju protektivno kroz IL12/IFN $\gamma$  stimulisanu ćelijski posredovnu imunost i pomoću inhibicije osteoklastogeneze.

Proinflamatorni citokini i hemokini su vrlo eksprimirani u periimplantatnom tkivu u ranim stadijumima inflamacije kod ugradnje dentalnog imlantata (Petkovic i sar., 2011). Tako su Panagacos, 1996 i Salcetti, 1997, određivanjem vrednosti IL1 $\beta$  u tečnosti periimplantatnog sulkusa pokazali da se koncentracija ovog citokina povećava sa progresijom periimplantitisa. Hemokini i citokini obezbeđuju kompleksnu mrežu signala koji mogu da aktiviraju ili suprimiraju inflamatorni odgovor.

Na osnovu brojnih radova moguće je sumirati ulogu proinflamatornih citokina (IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) u periimplantitisu:

- omogućavaju migraciju inflamatornih ćelija u tkivo (uključeni su u akutno fazni odgovor protiv infekcije i patogenezu periimplantatne destrukcije);
- stimulišu procese inflamacije i tkivne destrukcije;
- indukuju i pojačavaju koštanu resorpciju;
- stimulišu oslobađanje matriksnih metaloproteinaza koji degradiraju proteine ekstraćelijskog matriksa, osim lokalnih, utiču i na sistemske manifestacije inflamacije.

Inflamatorne ćelije mogu da oslobađaju različite hemokine koji stimulišu kretanje leukocita i regulišu migraciju leukocita iz krvi u tkivo i postoje dokazi da infekcija određenim bakterijama i virusima može da stimuliše ćelije domaćina na produkciju karakterističnih setova imunskih ćelija.

Kao što je ranije istaknuto u patogenezi periimplantitisa važnu ulogu imaju Th1, Th2 i Th17 citokini, čija uloga još nije dovoljno poznata.

Aktivacija Th1 subpopulacije ćelija pomoću IL12 dovodi do produkcije IL2 i IFN $\gamma$ . Ovi citokini stimulišu predominantno ćelijski imunski odgovor posredovan citotoksičnim T ćelijama, makrofagama i NK ćelijama. Sa druge strane, aktivacija Th2 subpopulacije ćelija je praćena produkcijom IL4, IL5, IL6 i IL10, što stimuliše predominantno humoralni imunski odgovor a inhibira ćelijski imunski odgovor. Th17 je novi podtip

CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T ćelija koji je značajan za imunitet prema bakterijama ali i za patogenezu autoimunskih procesa. Nivo IL17, kao najpoznatijeg predstavnika ovog citokinskog tipa, je povećan u toku gingivitisa i parodontopatije. Za sada nije ispitan u periimplantitisu.

Detekcija citokina kao validnih biomarkera patološkog procesa može biti veoma korisna, jer obezbeđuje preciznija objašnjenja za sam patofiziološki mehanizam oboljenja. Takođe merenje citokinske produkcije može poslužiti kao koristan monitor imunskog statusa organizma.

#### **1.4. Sklonost (genetička predispozicija) ka periimplantitisu**

Periimplantitis je oboljenje multifaktorijalne etiologije koje se javlja kao rezultat interakcije pre svega mikroorganizama i imunskog sistema samog organizma uz uticaj naslednih faktora. Citokini kao solubilni medijatori imunske reakcije su važni faktori regulacije imunskog odgovora na infekciju. Varijacije u genima imunskog sistema evoluirale su kako bi se omogućila koegzistencija domaćina i patogena. Geni koji kontrolišu zapaljenski odgovor domaćina imaju važnu ulogu u modulaciji stadijuma periimplantitisa (Schafer i sar., 2011).

Savremeni pristup izučavanja patogeneze periimplantitisa podrazumeva razjašnjenje genetičke osnove kako bi se stvorile osnove za jednostavnije lečenje i prevenciju nastanka oboljenja. To bi moglo da omogući bolje razumevanje etiologije bolesti što bi dovelo do boljeg izbora pacijenata kojima bi se ugrađivali dentalni implantati. Poslednjih godina se došlo do saznanja da je prisustvo određenih polimorfizama asocirano sa izmenjenom ekspresijom gena za citokine.

Većina genetičkih istraživanja u oralnoj medicini je fokusirana na genetičke polimorfizme koji imaju ulogu u imunskom odgovoru, procesima tkivne destrukcije ili metaboličkim mehanizmima. U nekim slučajevima genetički polimorfizmi mogu da uzrokuju promene u proteinima ili njihovoj ekspresiji, verovatno izazivajući promene u urođenoj i stečenoj imunosti i samim tim su važne determinante progresije oboljenja.

S druge strane mogu da deluju kao protektivni ili destruktivni faktor progresije parodontopatije/periimplantitisa (Vaz i sar., 2012). Grupa autora je ustanovila da je disregulacija u ekspresiji citokina odgovorna za ponovljene cikluse inflamacije u

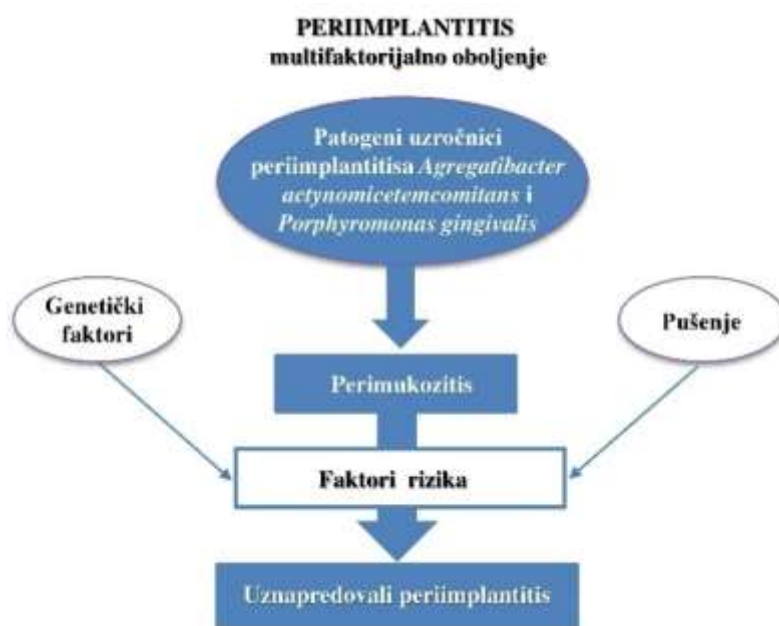
parodontopatiji. Naime, alelska varijacija u genima za citokine i faktorima koji regulišu njihovu ekspresiju mogu da utiču na klinički ishod, podložnost i progresiju parodontopatije (Tai i sar., 2002).

Vezivanje delova mikroorganizama za receptore epitelnih ćelija (TollLike Receptor, NODlike receptor) pokreće signalne puteve i procese koji se završavaju indukcijom gena neophodnih za produkciju i sekreciju antimikrobnih peptida. Pokazano je da se sa progresijom periimplantitisa menja koncentracija citokina, ali postoje individualne razlike u stepenu produkcije ovih medijatora.

Genetička osnova proučavana kroz različite studije svakako predstavlja prvu važnu kariku u razrešenju faktora koji uzrokuju ili doprinose razlikama u inflamatornim odgovorima između pojedinaca.

Različiti polimorfizmi citokinskih gena mogu dovesti do promena u ekspresiji gena (povećana ili smanjena). Patogeni koji uzrokuju periimplantitis mogu dovesti do produkcije izmenjenog genskog produkta tako da nije jednostavno odgovoriti u kojoj meri su pojedinačni polimorfizmi u jednom genu povezani sa odgovorom na infekciju.

Dok se za mikrobiološke faktore i faktore spoljašnje sredine smatra da iniciraju i moduliraju progresiju oboljenja, danas postoje jasni dokazi koji ukazuju na to da geni igraju važnu ulogu u predispoziciji i progresiji parodontopatije (Michalowicz, 1994; Hassel i Harris, 1995; Hodge i Michalowicz, 2001) (Slika 22).



**Slika 22.** Modifikovani primer uticaja različitih faktora na razvoj periimplantitisa

Različite forme gena (alelske varijante) mogu da uzrokuju razlike u tkivnim strukturama (specifična imunost) i u inflamatornim medijatorima (nespecifična imunost). Pokazano je da alesičke varijante na multipnim genskim lokusima verovatno utiču na podložnost parodontopatiji (Kinane, 2003)

Imajući u vidu da osobe iz različitih populacija mogu na različite načine odgovarati na patogene, moglo bi se pretpostaviti da polimorfizmi nukleotidne sekvence u pojedinim kandidat genima mogu doprinostiti postojanju navedenih razlika. Sa tim u vezi, pretpostavlja se da postojanje takvih interindividualnih razlika može imati značajnu ulogu u predispoziciji za nastanak i progresiju periimplantitisa. Svakako, pored genetičke komponente, ne treba zanemariti i značajnu ulogu faktora rizika.

Genotipizacija odgovarajućih polimorfizama kandidat gena u dijagnostičkim procedurama pre planiranja implantološkog tretmana, mogla bi olakšati buduću procenu smera procesa oseointegracije i perioda zarastanja nakon ugradnje implantata što bi olakšalo predviđanje ishoda protetske rehabilitacije kod pacijenata sa ugrađenim dentalnim implantatima.

#### **1.4.1. Polimorfizam nukleotidne sekvence**

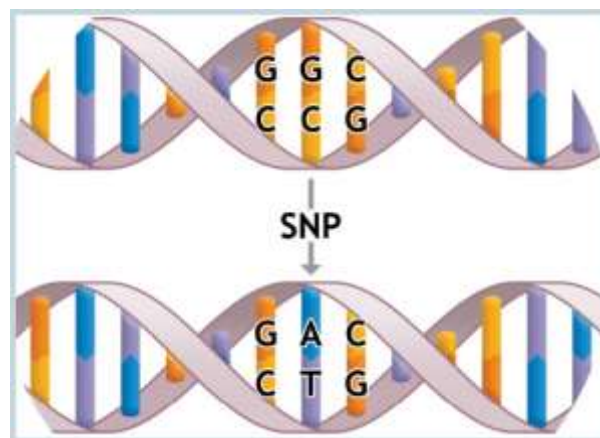
Pod pojmom polimorfizma u genomu čoveka podrazumevaju se varijacije u naslednoj osnovi koje se javljaju u humanim populacijama. Da bi određena varijacija bila proglašena

polimorfizmom neophodno je da se određena alesička forma javlja sa učestalošću većom od 1%. Varijabilnost među jedinkama ili grupama jedinki u populaciji može se posmatrati na morfološkom nivou, na nivou proteina, hromozoma i konačno na nivou DNK sekvenci. Analizama populacione genetike utvrđeno je da postoji velika genetička varijabilnost u ljudskim populacijama, pri čemu najveći deo varijabilnosti odlazi na individualne razlike unutar lokalne populacije (oko 85%) dok na nivou cele ljudske populacije postoji genetička uniformnost (Chakravarthi, 2001). Genetička varijabilnost populacije se može proceniti parametrima proporcije polimorfničkih lokusa i heterozigotnosti.

Genetički polimorfizmi predstavljaju razlike u DNK sekvenci u jednom od četiri nukleotida u genomu koje se javljaju između individua, grupa ili populacija. Tu spadaju:



- Polimorfizmi nukleotidne sekvence (Engl. *Single Nucleotide Polymorphism-SNP*)
- Varijabilni broj tandemskih ponovaka (Engl. *Variable Number of Tandem Repeats-VNTR*)
- Del/Ins polimorfizmi – nastaju kao rezultat insercije ili delecije određenog dela DNK
- U humanom genomu su najzastupljeniji polimorfizmi nukleotidne sekvence (Slika 23).



**Slika 23.** Polimorfizam nukleotidne sekvence (preuzeto: <http://www.ibbl.lu/personalised-medicine/what-is-personalised-medicine/dna-genes-snps/>)

Interesovanje istraživača je posebno fokusirano na SNP-ove pronađene unutar kodirajuće sekvence, zato što je verovatnije da oni menjaju biološku funkciju proteina. SNP-ov unutar introna imaju verovatno manji biološki efekat. Polimorfizmi nukleotidne sekvence unutar promotorskog regiona su najčešći (Holmes, 2003).

SNP aleli koji su česti u jednoj etničkoj grupi mogu biti mnogo ređi u drugoj.

Genetičke varijacije se u humanoj populaciji dele na česte i retke kako bi se akcent stavio na učestalost najmanje zastupljenog alela (Engl. *Minor Allele Frequency-MAF*) u populaciji. Učestalost najređeg alela kod čestih polimorfizama je veća od 1% u populaciji, dok je za retke varijante manja od 1%. Procenjuje se da se jedan SNP sa učestalošću *minor* alela javlja na svakih 200-300 bp u genomu (Salisbury i sar., 2003). Ispitivani genetički polimorfizmi mogu dati značajne podatke o nivou genetičke varijabilnosti u populacijama. Ove varijacije čine DNK sekvencu svake osobe jedinstvenom i predstavljaju normalne varijacije u naslednoj osnovi. Dosadašnja

istraživanja su pokazala da polimorfizmi nukleotidne sekvence mogu biti asocirani sa razvojem nekih oboljenja, odgovorom na patogene, hemikalije, lekove. Samim tim je interesantno povezivanje prisustva određenih SNP-ova sa sklonošću ka različitim bolestima. Različiti geni su u različitom stepenu polimorfni i u takozvanim studijama asocijacije se ispituje učestalost pojedinih genetičkih polimorfizama u grupi obolelih i upoređuje se sa podacima u zdravoj populaciji. I pored ovih opsežnih istraživanja još uvek postoji mali broj polimorfizama sa jasno potvrđenom ulogom genetičkog markera predispozicije za proučavane bolesti.

Postoji veliki broj istraživanja i studija koje su proučavale eventualno postojanje povezanosti nekog određenog polimorfizma sa izučavanim fenotipom u cilju boljeg razumevanja genetičke osnove u razvoju različitih oboljenja (Albert, 2011). GWAS studija (Engl. Genome Wide Association Study) je najrasprostranjenija studija koja se bavi utvrđivanjem eventualnog postojanja asocijacije između genetičke varijabilnosti i fenotipske raznovrsnosti (Frazer i sar., 2009). Da bi se došlo do ovakve informacije potrebno je definisati da li je polimorfizam funkcionalan, tj. da li utiče na promenu funkcije datog gena ili seta gena, ili njegove ekspresije. Demmer i sar., 2012 godine su analizirali celokupan humani genom da bi pokazali postojanje različite genske ekspresije kod zdravih i obolelih parodontalnih tkiva. Identifikovali su brojne gene koji su uključeni u regulaciju apoptoze, angiogeneze, odgovoru na patogene, antigenu prezentaciju, regulaciju metabolizma i signalnu transdukciju.

Pojedinačni SNP-ovi blisko locirani na hromozomu se mogu nalaziti u tzv. neravnoteži vezanosti (Engl. Linkage Disequilibrium-LD) koja označava neslučajnu asocijaciju alela/genotipova na različitim lokusima i njihovu zajedničku segregaciju u gamete (Frazer i sar., 2009).

Smatra se da bi SNP-ovi mogli zauzeti značajno mesto u proceni individualne terapije, pa se u današnje vreme povećava broj istraživačkih radova koji imaju za cilj determinaciju određenih polimorfizama koji bi potencijalno mogli imati važnu ulogu prognostičkih faktora.

#### **1.4.2. Polimorfizmi gena za citokine**

Postojanje polimorfizama nukleotidne sekvence u genima koji imaju značajnu ulogu u razvoju imunske reakcije se mogu potencijalno dovesti u vezu sa podložnošću

razvijanja upale tkiva oko ugrađenog implantata. Detaljnije će biti predstavljeni polimorfizmi u genima za CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra koji su proučavani u ovoj doktorskoj disertaciji.

#### **1.4.3. Polimorfizmi gena za CD14**

Gen za CD14 receptor se nalazi na hromozomu 5, regionu q23-21 i sadrži 3 900 bp organizovanih u dva egzona i kodira protein koji se sastoji od 375 amino kiselina. U promotorskom regionu CD14 gena, identifikovana je tranzicija citozina u timin na poziciji 159 (C-<sub>159</sub>T) uzvodno od glavnog mesta transkripcije (Holla i sar., 2002).

Polimorfizam unutar CD14 gena bi potencijalno mogao izmeniti zapaljenski odgovor. Pored polimorfizma na 159 mestu, identifikovana su još četiri SNP-a do 2 kb i to na pozicijama: -1619, -1359, -1145, -809 (Nikolopoulos i sar., 2008).

Izvesne promene u sekvenci gena koji kodira ovaj receptor bi mogle rezultirati u smanjenju/povećanju ekspresije gena pa samim tim i smanjenju/povećanju količine produkta, promeni funkcije receptora i slično, te dovesti do značajnih promena u prvom koraku odbrane organizma na invaziju bakterija ili drugih mikroorganizama. Proučavanjem polimorfizama gena koji kodira ovaj receptor i druge bitne učesnike u transdukciji signala, može biti ključno za razumevanje genetičke podložnosti periimplantitisu.

U dve studije Kavkaske populacije je ispitivana povezanost polimorfizma CD14 gena na poziciji -260 i parodontopatije, ali nije nađena asocijacija (Holla i sar., 2002; Folwaczny i sar., 2004). U studijama na populaciji Japanaca takođe nije uočena statistička značajnost u ispitivanju ovog polimorfizma (Yamazaki i sar., 2003). Treba naglasiti da su Holla i sar. , u narednim istraživanjima našli tendenciju povećane učestalosti jednog od alela u slučaju agresivne forme parodontopatije u odnosu na hroničnu u slučaju polimorfizma na poziciji -159 (Holla i sar., 2002). U literaturi nisu pronađeni podaci o povezanosti polimorfizama CD14 gena sa periimplantitisom.

#### **1.4.4 Polimorfizmi gena za IL6**

IL6 je multifunkcionalan citokin koji se ne eksprimira konstitutivno već je veoma inducibilan i produkuje se nakon dejstva različitih stimulusa kao što su IL1, PDGF, TNF $\alpha$ , bakterijski produkt (endotoksin) i virusna infekcija. Može delovati i

proinflamatorno i antiinflamatorno. Gen koji kodira IL6 se nalazi na poziciji 7p21 i sastoji se od 5 egzona i 4 introna. Najčešće proučavan polimorfizam IL6 gena je identifikovan na poziciji 174 u promotorskom regionu.

Kao deo odgovora na inflamaciju dolazi do povećane sinteze glukokortikoida koji potenciraju neke efekte IL6 kao što je sinteza proteina akutne faze, ali smanjuju ekspresiju gena za IL6 čime se uspostavlja negativna povratna sprega u okviru inflamatornog odgovora. Transkripcija gena za IL6 je regulisana transkripcionim faktorima (NF IL6, Nf k B Fos/Jun, CRBP) i glukokortikoidnim receptorom.

Postoji mali broj studija u kojima je rađena povezanost polimorfizma gena za IL6 sa periimplantitisom. Casado i sar., 2013, su ispitali povezanost između IL6-174 genskog polimorfizma kao faktora rizika za razvoj periimplantitisa ili hronične parodontopatije u populaciji Brazila. CC genotip je bio prisutan približno uniformno i u grupi zdravih i u grupi sa periimplantitisom. Međutim individue sa GG genotipom su imale 1.53 puta, odnosno nosioci G alela 1.43 puta povećan rizik za nastanak periimplantitisa.

Pojedine studije su našle povezanost između polimorfizma IL6 na poziciji -174 i parodontopatije u različitim populacijama uključujući belu brazilsku populaciju, severnu Nemačku i druge populacije (Trevilatto, 2003; Meiser 2003). Dobijeni rezultati između različitih studija se razlikuju najverovatnije zbog etničkih razlika pomenutih populacija. Trevilatto i sar., su još 2003 u studiji urađenoj na brazilskoj populaciji ispitali povezanosti polimorfizma IL6-174 sa nastankom parodontopatije uočili da je GG genotip značajno povezan sa rizikom za razvoj oboljenja. Kalburgi i sar., 2010 godine u populaciji Indije ispitivanjem postojanja asocijacije parodontopatije i IL6-174 polimorfizma uočili da je rizik za nosioce G alela bio čak 9.04 puta viši. U novijoj studiji rađenoj na Brazilskoj populaciji (Teixeira i sar 2014) došlo se do zaključka da je IL6-174 polimorfizam, povezan sa parodontopatijom ukoliko se poredi distribucija genotipova ispitanika sa parodontopatijom i zdravih. GC genotip se javlja kao protektivni faktor parodontopatije. Većina ovih studija dovode u vezu GG genotip sa povišenim rizikom za razvoj parodontopatije (Franch-Chillida, 2010).

#### **1.4.5. Polimorfizmi gena za IL10**

Interleukin 10 (IL10) je antiinflamatorni citokin koji suprimira ćelijski odgovor na zapaljenje čime utiče i na tok oboljenja. Povećana koncentracija ovog citokina može da indukuje imunosupresiju. Gen za IL10 je smešten na hromozomu 1q31-q32 u klasterima sa bliskim genima za citokine IL19, IL20 i IL24. Do sad je opisano nekoliko promotorskih polimorfizama u IL10 genu na pozicijama -1082, -819 i -592.

Iako gen koji kodira IL10 nije izraženo polimorfan do danas je otkriveno nekoliko njegovih varijacija. Među njima se posebno ističe -1082, a koji dovodi do smanjenja produkcije funkcionalnog proteina, a zastupljeniji je kod ispitanika sa prisutnom parodontopatijom. Genski polimorfizam za IL10 na poziciji -1082 (supstitucija guanina adeninom) modifikuje sekreciju IL10. A alel je najčešće povezan sa smanjenom produkcijom, a G alel sa povećanom produkcijom IL10 (Donati, 2008).

Polimorfizmi u IL10 genu na poziciji -1087,-819 i -592 se dovodi u vezu sa izmenjenom sintezom IL10 u odgovoru na inflamatorne stimulse (Scarel-Caminaga i sar., 2004).

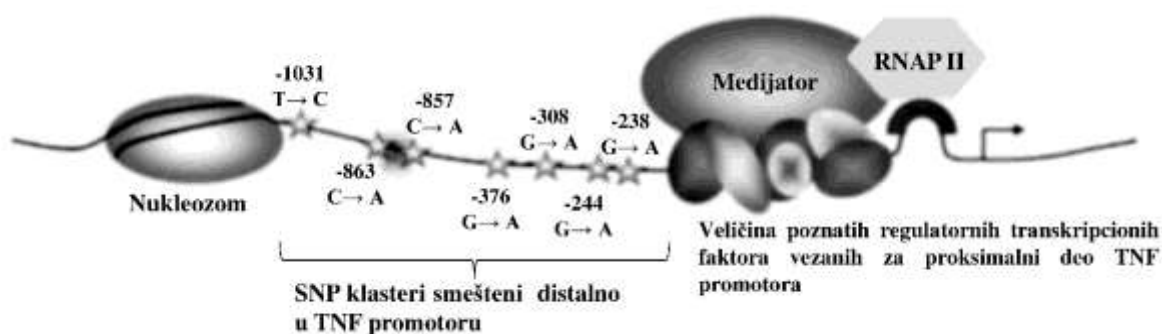
#### **1.4.6. Polimorfizmi gena za TNF $\alpha$**

TNF $\alpha$  lokus se sastoji od tri funkcionalna gena. Nalazi se između gena za limfotoksin beta koji je ushodno od njega i limfotoksin alfa koji je nishodno. Genetičke varijacije unutar gena za TNF $\alpha$  su retke s obzirom da je ovaj region kroz evoluciju bio jako konzerviran i nije bilo promena, naročito u kodirajućem regionu. Gen koji kodira TNF $\alpha$  je polimorfan, a najviše ispitivane varijacije su identifikovane u promotorskom regionu, pri čemu je najčešće ispitivan polimorfizam na poziciji -308. Iako ima i suprotnih zaključaka (Schulz i sar., 2012) mnoga dosadašnja istraživanja ukazala su na povezanost polimorfizama TNF $\alpha$  gena sa kliničkom slikom parodontopatije i periimplantitisa. Naime, značajna razlika u distribuciji polimorfizama kod pacijenata sa periimplantitisom u poređenju sa pacijentima bez periimplantitisa, ukazuje na povezanost TNF $\alpha$  polimorfizma sa stepenom inflamacije tkiva oko implantata odnosno težinom nastalog periimplantitisa (Campos i sar., 2005).

Najviše su ispitivane varijacije na nivou promotora i to na poziciji -308 (Slika 24).

Polimorfizmi TNF $\alpha$  gena na pozicijama -1031/-863 i -857 su povezani sa parodontopatijom u populaciji Japana. TNF  $\alpha$  -308, -238, -1031, -863 i -857

polimorfizmi su proučavani u većoj populaciji Japanaca i uočeno da utiču na povišenu produkciju TNF $\alpha$ . TNF- $\alpha$  -308 dovodi do pojačane transkripcione aktivnosti kod pacova *in vitro* (Soga i sar., 2003). Haplotipska kombinacija (c.-308G > A and c.-238G > A) bi mogla biti nezavisan faktor rizika u parodontopatiji. Takođe nije pronađen uticaj promotorskih polimorfizama (c.-1031T > C, c.-863C > A, c.-857C > A) na nastanak parodontopatije (Schulz i sar., 2012). U radu Schulz i sar., iz 2012 godine ustanovljeno je da se TNF $\alpha$  može smatrati važnim modulatorom kliničkih karakteristika parodontopatije kod pacijenata sa srčanim oboljenjem.



**Slika24.** Promotorski region TNF $\alpha$  gena

#### 1.4.7. Polimorfizmi gena za IL1 ra

Gen koji kodira IL1 ra, čiji se proteinski produkt sastoji od 152 amino kiseline, označen je kao MG50. Kod čoveka MG50 ima četiri egzona, nalazi se na 2q13-14.1 u blizini dva gena za dve izoforme IL1 (IL1 $\alpha$  i IL1 $\beta$ ). IL1 ra se sintetiše kao prekursor proteina i sadrži signalnu sekvencu od 25 amino kiselina, što omogućava sekreciju preko endoplazmatičnog retikuluma i Goldžijevog aparata. Miš, čovek i pacov pokazuju 75% homologije u amino-kiselinskoj sekvenci produkta ovog gena, a čak 30% homologije sa IL1 $\beta$  u amino-kiselinskoj sekvenci.

Genetički profili bilo koje dve individue su različiti usled postojanja polimorfizama nukleotidne sekvence, kao i usled različite dužine pojedinih sekvenci. Upravo ta različita dužina sekvenci bazirana na različitom broju umnoška jedne sekvence, veličine 10-100 baznih parova (bp), predstavlja VNTR. Ponovci su tandemski, grupisani u klasterne.

VNTR polimorfizam (rs380092) je zastupljen u intronu 2 IL1ra gena i predstavlja umnožak sekvence od 86 bp. U zavisnosti od broja umnoška ove sekvence od 86 bp, javljaju se sledeći aleli:

A1 - 4 x 86bp, tj. A1= 410bp;

A2 - 2 x 86bp, tj. A2= 240bp;

A3 - 5 x 86bp, tj. A3= 500bp;

A4 - 3 x 86bp, tj. A4= 325bp;

A5 - 6 x 86bp, tj. A5= 595bp.

Pokazano je da IL1, TNF i IL1ra imaju značajnu ulogu u inflamatornom procesu tako da bi funkcionalni polimorfizmi u njihovim genima mogli imati značajnu ulogu u imunskom odgovoru kod gubitka implantata. Genetičke varijacije su uključivale promene na pozicijama IL1 $\alpha$ -889 C/T i IL1 $\beta$ + 3053 C/T koje su povezane sa povećanom produkcijom IL1 (Dominici i sar., 2002). Nekoliko studija je pokazalo povezanost IL1 i IL1ra polimorfizama sa periimplantitisom (Laine, 2006), implantatnim neuspehom (Jansson, 2005; Montes, 2009) i periimplantatnim koštanim gubitkom ( Shimpuku, 2003).

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**



## **HIPOTEZA**

Prisustvo mutiranih genotipova ispitivanih gena za citokine (IL1ra, TNF $\alpha$ -308, IL10-1082, IL6-174, CD14-159) je udruženo sa povećanim rizikom za nastanak periimplantitisa kod ispitanika sa ugrađenim dentalnim implantatima.

Lokalna produkcija citokina je povezana sa mutiranim genotipovima i povećanom sklonošću ka periimplantitisu kod ispitanika sa ugrađenim dentalnim implantatima.

**Ciljevi istraživanja** su bili sledeći:

1. Utvrditi učestalost genotipova i alela polimorfizama gena za citokine: IL1ra, TNF $\alpha$ -308, IL10-1082, IL6-174 i CD14-159 u grupi ispitanika sa implantatima sa periimplantitisom i u grupi kontrola u kojoj se nalaze ispitanici sa implantatima bez periimplantitisa
2. Utvrditi postojanje povezanosti između učestalosti genotipova i alela polimorfizama gena za IL1ra, TNF $\alpha$ -308, IL10-1082, IL6-174 i CD14-159 sa razvojem i progresijom periimplantitisa
3. Utvrditi postojanje povezanosti genotipova ispitivanih polimorfizama sa faktorima rizika, kao i sa sklonošću za razvoj periimplantitisa
4. Odrediti lokalnu produkciju citokina (IL12, IFN $\gamma$ , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) u uzorcima tečnosti periimplantatnog sulkusa u grupi ispitanika sa periimplantitisom i u grupi ispitanika bez periimplantitisa
5. Utvrditi postojanje povezanosti između detektovanih koncentracija citokina u uzorcima PICF i faktora rizika za sklonost ka razvoju periimplantitisa
6. Ispitati da li postoji povezanost između polimorfizama ispitivanih gena i koncentracije citokina u uzorcima PICF

### **3. MATERIJAL I METODE**

Eksperimentalni deo istraživanja je realizovan u Laboratoriji za Molekulsku genetiku i u Laboratoriji za Kliničku imunologiju Instituta za medicinska istraživanja VMA.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta VMA u skladu sa Helsinškom deklaracijom (2008). Pacijenti su potpisali informisani pristanak za korišćenje biološkog materijala u istraživačke svrhe.

### **3.1. Studijska grupa**

Istraživanjem je oduhvaćeno 98 pacijenata sa Odeljenja za implantologiju, Klinike za stomatologiju VMA. Ispitanici su bili starosti između 18 i 70 godina sa ugrađenim dentalnim implantatima podeljeni u dve grupe: grupa sa zdravim periimplantantnim tkivom, kao i ona sa dijagnostikovanim periimplantitisom. U studiju su uključeni isključivo implantati koji imaju protetski rad, tj. koji su u funkciji. Protetski rad je bio stabilan, da bi se eliminisao eventualni drugi etiološki faktor periimplantitisa, biomehanički faktor.

### **3.2. Uzimanje anamneze ispitanika**

Učesnicima studijske grupe je prvo uzeta anamneza, čime su dobijene informacije o njihovom pušačkom statusu i prethodnoj sklonosti ka parodontopatiji. Kao bivši pušači su definisane osobe koje su prestale sa pušenjem najmanje godinu dana pre postavljanja dijagnoze. Osobe koje su svakodnevno pušile, godinu dana ili duže pre postavljanja dijagnoze su klasifikovani kao pušači. Kod svih ispitanika određivani su sledeći klinički i laboratorijski parametri:

- Praćenje kliničkih parametara (indeks krvarenja, plak indeks, gingivalni indeks i dubina periimplantatnog džepa) i dodatni parametri kao što su navika pušenja, sklonost ka parodontopatiji
- Određivanje citokina iz periimplantatne tečnosti
- Detekcija polimorfizama gena za citokine i CD14 gena iz uzoraka periferne krvi.

### 3.3 Klinički pregled

Nivo oralne higijene i kliničko stanje periimplantatnih tkiva je determinisano kliničkim parametrima. Kod ispitanika obe grupe registrovani su i dodatni parametri kao što su navika pušenja, sklonost ka parodontopatiji i konzumiranje alkohola. Pacijenti uključeni u studiju su morali biti sistemski zdravi i beleženo je da li su u prethodna tri meseca koristili antibiotike.

Kod ispitanika su praćeni i beleženi klinički parametri prisustva ili odsustva zapaljenja tkiva oko implantata.

Indeksi za procenu stanja periimplantatnog tkiva bave se procenom stanja i stepena destrukcije tkiva.

**Indeks krvarenja** odlikava jedan od prvih i najznačajnijih znakova inflamacije gingive. Proverava se da li je krvarenje spontano ili se javlja na provokaciju.

**Plak indeks** po Silnes-Lou (Silness-Löe) je veoma precizan indeks kojim se utvrđuje prisustvo dentalnog plaka. Pri merenju plaka korišćena je stomatološka sonda. Ovim indeksom određivana je debljina dentalnog plaka na gingivalnim trećinama: vestibularne, oralne i vestibularnog dela mezijalne i distalne površine krunica svih prisutnih zuba ili implantata.

Bodovanje je vršeno na sledeći način:

- 0 – Nema dentalnog plaka na gingivalnoj trećini krunice zuba
- 1 – Dentalni plak se nalazi u tankom sloju na ivici gingive i susednoj površini zuba. Ne može se otkriti golim okom, već samo uz pomoć sonde na čijem se vrhu zadrži u maloj količini
- 2 – Umerena količina dentalnog plaka u gingivalnom sulkusu ili gingivalnom džepu kao i na ivici gingive i susednoj površini zuba. Dentalni plak se može otkriti i golim okom.
- 3 – Velika količina dentalnog plaka koja potpuno ispunjava gingivalni sulkus ili gingivalni džep i potpuno prekriva ivicu gingive i susednu površinu zuba. Interdentalni prostor je takođe ispunjen dentalnim plakom.

**Gingivalni indeks** po Lou i Silnesu (Löe-Silness) je indeks koji se najčešće koristi za ocenu stanja gingive. Njegovim korišćenjem stanje gingive se ocenjuje sa vestibularne,

mezijalne, oralne i distalne strane svakog prisutnog zuba ili implantata. Procena se bazira na promeni boje, otoku i krvarenju gingive.

Bodovanje je od 1 do 3 i vršeno je na sledeći način:

0 – Zdrava gingiva

Gingiva je bledoružičasta, čvrsta i sitnozrnaste površine. Papile su u interdentalnom prostoru i ne prominiraju van njega.

1 - Blaga inflamacija

Ivica gingive je nešto crvenija od normalne. Postoji blag edem. Povećano je izlučivanje gingivalnog eksudata iz sulkusa. Gingiva ne krvari na blagu provokaciju sondom.

2 – Umerena inflamacija

Gingiva je crvena. Izražen je edem i uvećanje slobodne gingive. Postoji krvarenje na blag pritisak sondom.

3 – Jaka inflamacija

Gingiva je izrazito crvena i uvećana. Izražena je tendencija ka spontanom krvarenju. Postoje ulceracije na gingivi.

Smatra se da gingivalni indeks u najvećoj meri odslikava stanje gingive u poređenju sa prethodno pomenutim parametrima.

Plak indeksom se utvrđuje prisustvo kao i debljina dentalnog plaka na gingivalnim trećinama implantata. Ovaj indeks najčešće prati vrednost gingivalnog indeksa i obično je u korelaciji sa vrednostima gingivalnog indeksa, ali ne odražava uvek kliničko stanje gingive.

U ovom istraživanju korišćeni gingivalni indeks je vrednovan od 0 do 2 s obzirom da su te kliničke manifestacije od praktičnog značaja. Naime gingivalni indeks 3 oko implantata u kliničkom i praktičnom smislu izjednačava se sa gubitkom implantata pa samim tim nije stepenovan sa stepenom 3.

Od svakog ispitivanog pacijenta uzeta je periferna krv (za ispitivanje polimorfizama kandidat gena) i periimplantatna tečnost (PICF) iz gingivalnog sulkusa za detekciju lokalne produkcije citokina.

### **3.4. Uzimanje uzoraka**

Na osnovu anamneze, kliničkog pregleda i analize ortopana definisana su mesta uzorkovanja. Uzorci periimplantatne tečnosti (PICF) su uzimani papirnim poenima (The Hygenic Corporation / Akron, Ohio 44310, SAD). Uzorci periimplantatne tečnosti su uzimani od ispitanika sa zdravim i sa inflamiranim periimplantatnim tkivom iz periimplantatnog sulkusa pomoću papirnog absorbent "poena". Količina absorbovane tečnosti određivana je pomoću aparata Periotrona.

Uzorci uzeti od ispitanika, natopljeni sadržajem periimplantatne tečnosti stavljeni su u sterilne epruvete u koje je dodavano 0.5ml fiziološkog rastvora. Sadržaj iz papirnog "poena" je izdvojen nakon centrifugiranja datog uzorka.

Posle navedenog vremenskog intervala papirni poeni su eliminisani, a uzorak je zamrzavan na  $-20^{\circ}\text{C}$  i čuvan do momenta analiziranja. Iz odmrznutih uzoraka određivana je koncentracija sledećih citokina: IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, IFN $\gamma$ , TNF  $\alpha$  i TNF $\beta$ . Koncentracija citokina detektovana je komercijalnim citofluorimetrijskim testom (Bender Medsystems flowcitomix multiplex test kit, BMS 810 FF, SAD). Nakon dodavanja neophodnih reagenasa prema uputstvu proizvođača, uzorci su analizirani određivanjem intenziteta fluorescence na protočnom citofluorimetru.

### **3.5. Određivanje detektabilnosti citokina iz periimplantatne tečnosti**

Prema uputstvu proizvođača testa, uzorci periimplantatne tečnosti inkubirani su sa mikrosferama različitih spektralnih svojstava, konjugovanih anticitokinskim monoklonskim antitelima. Nakon neophodnih koraka ispiranja i dodavanja sekundarnih specifičnih monoklonskih antitela konjugovanih fluorohromom, uzorci su analizirani određivanjem intenziteta fluorescence (srednjeg log intenziteta MFI) na protočnom citofluorimetru (Bekman Coulter XL-MCL, SAD).

Nakon dodavanja neophodnih reagenasa prema uputstvu proizvođača, uzorci su analizirani određivanjem intenziteta fluorescence na protočnom citofluorimetru.

Za analizu intenziteta fluorescence (*medium fluorescente intensitete*-MFI) korišćen je protokol za čitanje, formiran prema uputstvu proizvođača, optimizovan za citometre ovog tipa. Dobijene MFI vrednosti za svaki pojedinačni uzorak prenošene su u adekvatnom elektronskom obliku u formi *Imd* dokumentacije. Koncentracije citokina

obrađivane su uz pomoć komercijalnih softvera za preračunavanje koncentracije citokina (Bender flowcitomix softwaew 2.0), u odnosu na poznate koncentracije komercijalnih standarda i u ovom testu.

### **3.6. Detekcija polimorfizama gena za citokine i CD14 gena**

#### **3.6.1. Biološki uzorci i izolacija DNK**

Uzorci krvi ispitanika uzimani su pri prvom pregledu ispitanika. Genomska DNK izolovana je iz uzoraka periferne krvi, koja je nakon dodavanja antikoagulansa zamrzavana na -20° C do izolacije DNK. Za izolaciju DNK korišćena je metoda isoljavanja. Ova metoda je jednostavna i netoksična procedura, koja se zasniva na upotrebi visokih koncentracija soli koje razdvajaju DNK od proteina.

Liziranje eritrocita se postiže primenom hipotoničnog pufera koji sadrži nejonski deterđent Triton X 100 (Engl. Erythrocyte Leasing Buffer – ELB). Po centrifugiranju eritrociti se uklanjaju sa supernatantom. Potom se dodaju: LLB (Engl. Leukocyte Leasing Buffer) koji se koristi za liziranje membrane ćelija; jonski deterđent SDS (sodijum-dodecil sulfat) koji degraduje membrane ćelija i jedra i denaturiše proteine i proteinaza K koja vrši digestiju ćelijskih proteina i oslobađa DNK iz nukleoproteinskog kompleksa. Po inkubaciji, dodavanjem natrijum-hlorida i centrifugiranjem postiže se razdvajanje DNK od proteina. Po ekstrakciji, DNK se precipitira apsolutnim etanolom, a DNK talog se ispira od zaostalih soli 70% etanolom.

#### **3.6.2. Provera kvaliteta i koncentracije genomske DNK**

U cilju određivanja količine uzorka koja se stavlja u smešu za PCR reakciju, neophodno je odrediti koncentraciju genomske DNK u uzorku kao i njenu čistoću nakon izolacije. Kvalitet izolovane genomske DNK je proveravan na 1% agarozni bojenoj etidijum bromidom. Elektroforeza se odvijala pri struji od 40 mA i naponu od 80V u 0.5 TBE puferu u trajanju od 20 minuta. Kvalitet i intaktnost genomske DNK je analizirana pod UV svetlošću transiluminatora. (Slika 24) ( Pharmacia LKB, Švedska).

Koncentracija izolovane genomske DNK određivana je spektrofotometrijskom metodom korišćenjem Gene Quant spektrofotometra (Pharmacia LKB, Švedska). Uzorak DNK je razblažen 100 puta rastvaranjem 5µl uzorka u 495µl sterilisane

destilovane vode. Apsorbanca datog rastvora je merena na talasnoj dužini od 260nm (što odgovara maksimumu apsorpcije molekula DNK). Kao referentni rastvor (slepa proba) korišćena je sterilna destilovana voda. Koncentracija DNK u uzorku izražena u  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  izračunata je po formuli:

$$c[\mu\text{g}/\mu\text{L}] = \frac{A_{260} \times R \times OP \times 50}{1000},$$

gde je :

R - razblaženje

$A_{260}$  - apsorbanca na 260 nm

OP - optički put

50 - faktor za genomsku DNK

( $A_{260}$  50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rastvora čiste dvolančane DNK je 1 ako je OP 1cm).

Čistoća izolovane DNK je procenjena odnosom apsorbanaci (R) merenih na 260nm i 280nm. U ovim ispitivanim uzorcima je bio u rasponu od 1.6-2.0 što ukazuje na relativno visok stepen čistoće izolovane DNK u uzorku.

### 3.6.3. Lančana reakcija polimerizacije (PCR)

Lančana reakcija polimerizacije (Engl. Polymerase Chain Reaction = PCR) je *in vitro* amplifikacija određene DNK sekvence i predstavlja imitaciju procesa DNK replikacije koji se odvija u ćeliji. Ovom reakcijom su amplifikovani ciljni regioni gena za citokine i za CD14 gen koji sadrže polimorfizam nukleotidne sekvence od interesa. Sekvence korišćenih prajmera su prikazane tabelom 1.

**Tabela 1.** Sekvence prajmera za amplifikaciju ciljnih regiona gena genotipiziranih RFLP metodom

	Polimorfizam nukleotidne sekvence (SNP)	Sekvence <i>forward</i> i <i>reverse</i> prajmera	Dužina fragmenata
1.	CD14 <sub>-159</sub> (rs2569190)	f.: 5'- tgc cag gag aca cag aac cc -3' r: 5'- tgt cat tca gtt ccc tcc tc -3'	166 bp
2.	TNF $\alpha$ <sub>-308</sub> (rs1800629)	f.: 5-ggc aat agg ttt tga ggg cca t-3' r: 5-gag cgt ctg ctg gct ggg tg-3'	345 bp
3.	IL1ra	f.: 5-ctc agc aac act cct at-3' r: 5- tcc tgg tct gca ggt aa-3'	A1: 410 bp ,A2 : 240 bp, A3: 500 bp A4: 325 bp, A5 595



U PCR reakciju je dodavano 200ng izolovane genomske DNK. Korišćen je PCR 2xMaster Mix prema uputstvu proizvođača, 1μl svakog prajmera („forward“ i „reverse“) u reakcionu smešu ukupne zapremine 25 μl. Temperature hibridizacije prajmera su se razlikovale u zavisnosti od analiziranih polimorfizama (Tabela 2). Uspešnost amplifikacije ciljnog regiona je proveravana na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu.

**Tabela 2.** Uslovi za PCR amplifikacijugena genotipiziranih RFLP metodom

Geni	Početna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija	Ekstenzija	Finalna ekstenzija	Broj ciklusa
CD14-159	96° C, 3 min	96° C, 40 sek	56° C, 40 sek	72° C, 50 sek	72° C, 10 min	38
TNFα-308	94°C/4 min	94°C/1 min	60° C, 1 min	72°C/1 min	72°C/5 min	30
IL1ra	95°C/3 min	95°C/30 sek	62°C/30 sek	72°C/50 sek	72°C/4 min	35

#### 3.6.4. Analiza polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata- RFLP

U cilju utvrđivanja genotipa analiziranih polimorfizama nukleotidne sekvence, nakon amplifikacije gena uzorci su tretirani odgovarajućim restrikcionim enzimima prema uputstvu proizvođača. Potom je urađena provera veličine produkata digestije na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu u cilju utvrđivanja genotipa analiziranih polimorfizama nukleotidne sekvence. Za određivanje veličine restrikovanih fragmenata su korišćeni molekularni markeri (BioRad, SAD).

U slučaju polimorfizma C-159T CD14 gena, restrikcioni enzim *Hae III* (*BsuRI*) prepoznaje sekvencu 5'- GGCC -3' *wild type* (*wt*) i takvu sekvencu seče između guanina i citozina. Ukoliko je citozin zamenjen timinom, navedeni restrikcioni enzim neće prepoznati sekvencu i samim tim je neće ni seći.

Reakciona smeša za digestiju je sadržavala sledeće (prema preporuci proizvođača (Fermentas, Litvanija): PCR smešu (10 μl), dH<sub>2</sub>O (18 μl), 10x R pufer (2μl), BsuRI (0.5 μl). Inkubacija je vršena tokom noći na 37°C, nakon čega su uzorci elektroforetski

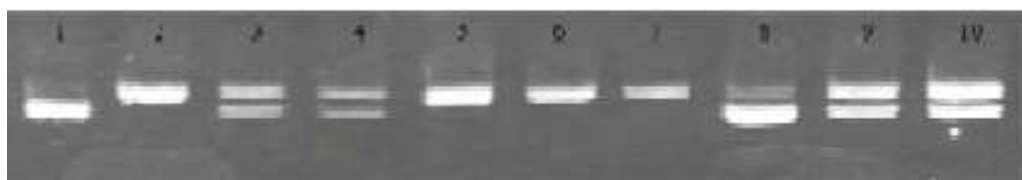
razdvajani na poliakrilamidnom gelu i vizuelizovani bojenjem gela srebro-nitratom prema sledećoj opisanoj proceduri (Slika 26).

Procedura bojenja poliakrilamidnog gela: Nakon završene elektroforeze gel se fiksira 10% etanolom, a zatim se vrši obezbojavanje 1% azotnom kiselinom. Nakon toga se ispira u destilovanoj vodi, a onda boji 0.2% rastvorom srebra nitrata (za razvijanje boje koristi se 0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sa 0.02% formaldehidom) u kome stoji 20 minuta na tamnom. Nakon ispiranja destilovanom vodom, gel se fiksira sa sirćetnom kiselinom. Genotip analiziranog fragmenta je određivan na osnovu dužine restrikcionih fragmenata. Dužina amplifikata se nalazi na visini od 166 bp.



**Slika 25.** Genotipizacija polimorfizma u genu za CD14

U slučaju polimorfizma TNF $\alpha$ -308 dobijeni amplifikati se stavljaju na digestiju sa NcoI enzimom u reakcionoj smeši koju čini NcoI (Fermentas, Litvanija), 10x Tango buffer (Fermentas, Litvanija), sterilna redestilovana voda i amplifikat. Smeša se zatim stavlja u termal blok na temperaturu od 37° 4-8 sati. Ukoliko enzim NcoI prepozna mesto na DNK amplifikatu, doći će do isecanja fragmenata i nastaće dva fragmenta od po 325 i 20 baznih parova što odgovara TNF1 alelu, a ukoliko ne dođe do isecanja javiće se fragment od 345 baznih parova što odgovara TNF2 alelu. Digestovana DNK je analizirana na 10% poliakrilamidnom gelu nakon elektroforeze i bojenja u srebru. Na prisustvo G alela na poziciji 308 ukazuje 2 trake (325 i 20 baznih parova), dok je alel A na poziciji 308 uočen kao traka na poziciji od 345 baznih parova.



**Slika. 26.** Genotipizacija polimorfizma u genu za TNF $\alpha$

Kad je u pitanju detekcija polimorfizama nukleotidne sekvence gena za IL1ra, polimorfna regija unutar IL1 ra gena sadrži varijabilan broj ponovaka od 86 baznih parova. Alel 1 je predstavljen sa 4 ponovaka (amplifikovani fragment veličine 410

bp), A2 sa 2 ponovka (amplifikovani fragment veličine 240 bp), A3 sa 5 ponovaka (amplifikovani fragment veličine 500 bp), A4 sa 3 ponovka (amplifikovani fragment veličine 325 bp) i A5 sa 6 ponovaka (amplifikovani fragment veličine 595 bp) (Slika 27).

### 3.6.5. Real-time PCR alelska diskriminacija

Real Time PCR je tehnika koja omogućuje da se kontinuirano prati amplifikacija ciljne sekvence kroz svaki ciklus. Na taj način se ne dobija samo informacija da li je ciljna sekvenca prisutna ili ne, već i u kojoj količini je prisutna, zbog čega je ovo istovremeno i kvantitativni PCR (qPCR). Tokom odvijanja PCR-a u realnom vremenu meri se promena intenziteta fluorescence boje kojima su probe obeležene.

Alelska diskriminacija je metod određivanja genetičke varijante pojedinačnog nukleotidnog polimorfizma određene sekvence. Predstavlja brz i osetljiv način za genotipizaciju poznatih SNP polimorfizama. Kombinuje PCR metodu i detekciju polimorfizama u jednom koraku.

Polimorfizmi u genu za citokine IL6 (rs1800795) i IL10 (rs 1800896) su genotipizirani alelskom diskriminacijom na Real-Time PCR 7300 (Applied Biosystems, SAD). Korišćeni su komercijalno dostupni eseji: TaqMan SNPs Genotyping Assay (Applied Biosystems, SAD) u koncentraciji 40x i 2x Universal TaqMan Master Mix.

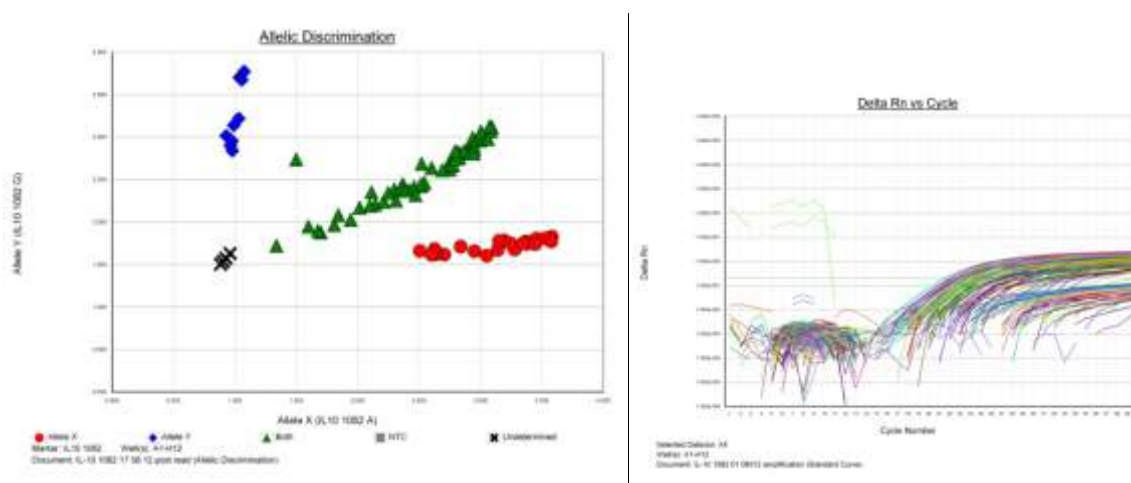
U reakcionoj smeši se nalaze dve probe, komplementarne sa ciljnom sekvencom genomske DNK koja sadrži SNP od interesa. Ove dve probe se razlikuju samo u nukleotidu koji je komplementaran divljem, odnosno mutiranom alelu. Jedna proba hibridizuje sa *wild type* sekvencom (odnosno sa sekvencom koja sadrži *wild type* nukleotid na određenoj poziciji), a druga hibridizuje sa sekvencom koja sadrži varijantni nukleotid na istoj poziciji.

Svaka fluorescentna proba sadrži oligonukleotid obeležen reporterskim molekulom na 5'-kraju, koji emituje fluorescentni signal i „quencher“, na drugom 3'-kraju, koji prigušuje (suprimira) fluorescentni signal. Tokom PCR reakcije, kada se proba veže za specifičnu sekvencu polimeraza svojom 5'-egzonukleaznom aktivnošću, uklanja jedan po jedan nukleotid oligonukleotida i razdvaja reporterski molekul od „quencher“-a. Reporterski molekul se oslobađa prigušujućeg dejstva „quencher“-a i emituje

fluorescenciju koja može da se detektuje u toku svakog ciklusa. Intenzitet fluoresciranja odgovara količini amplifikata u reakciji. Tokom odvijanja Real-time PCR-a meri se promena intenziteta fluorescence boje kojima su probe obeležene. Na ovaj način, i uz prisustvo kontrola, jasno mogu da se identifikuju tri genopita: homozigot za *wt* alel, homozigot za varijantni alel i heterozigot. Prisustvo divljeg ili mutiranog homozigota rezultira detektovanjem samo jedne fluorescentne boje u uzorku, dok se u slučaju heterozigota registruju obe fluorescentne boje.

Najčešće se za reporterski molekul koriste boje VIC, FAM, HEX ili JOE, dok se za „quencher“ molekul najčešće biraju MGB, TAMRA ili NFQ.

Alel specifične fluorescentne krive su detektovane i analizirane korišćenjem 7300 System SDS softvera (Applied Biosystems, SAD) (Slika 28).



**Slika 27.** Fluorescentne krive analiziranih polimorfizama

### 3.7. Statistička obrada rezultata

Dobijeni rezultati su obrađeni statističkim programom SPSS (verzija 17.00 IBM SPSS Inc, SAD). Nakon prikupljanja podataka formirana je baza podataka. Za opis parametara od značaja u zavisnosti od njihove prirode korišćene su mere deskriptivne statistike: učestalosti, procenti, srednje vrednosti, medijana, standardna devijacija. U cilju ispitivanja statistički značajnih razlika između aritmetičkih sredina numerički izraženih varijabli korišćen je Studentov T test i Mann Whitney test. Određivanje postojanja razlike u distribuciji polimorfizama za analizirani gen kod različitih grupa ispitanika vršeno je Pirsonovim Hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testom. Vrednosti

dobijene  $\chi^2$  testom interpretirane su primenom intervala poverenja od 95% ( $p < 0,05$  je statistički značajno)

U cilju provere postojanja relativnog rizika za razvoj sklonosti ka periimplantitisu u odnosu na genotipske varijante analiziranih polimorfizama, određivan je odds ratio (OR) sa intervalom poverenja od 95% (Engl. Confidence Interval- CI 95%), uz korišćenje *wild type* genotipa kao referentne grupe. Razlike u učestalosti genotipova između ispitanika sklonih periimplantitisu i kontrolne grupe, kao i odstupanja učestalosti genotipova u kontrolnoj grupi od očekivane koja je dobijena testiranjem Hardy-Weinberg-ove ravnoteže je procenjivano Pearsonovim ili ukoliko je zahtevao uzorak Fisherovim testom.

Za identifikaciju faktora od značaja za razvoj sklonosti ka periimplantitisu (svi ispitivani faktori rizika i polimorfizmi gena) korišćena je logistička regresiona analiza.

## **4. REZULTATI**

## 4.1. Određivanje detektabilnosti i koncentracija citokina

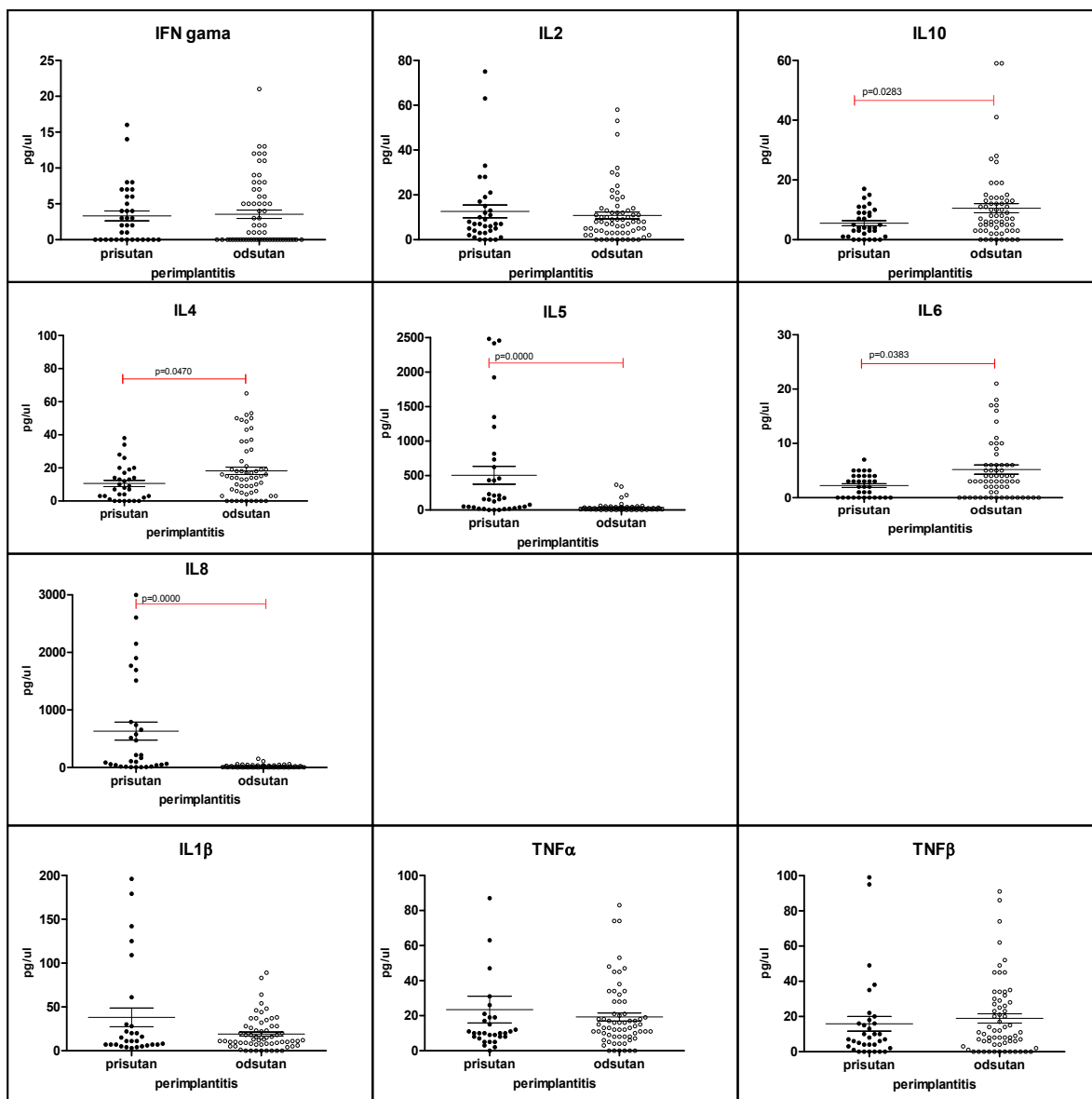
### 4.1.1. Određivanje koncentracija citokina u periimplantatnoj tečnosti

Vrednosti citokina određivane su u uzorcima PICF 64 ispitanika bez znakova perimplantitisa i u PICF 34 ispitanika sa manifestnim perimplantitisom (P). Analiza vrednosti citokina je pokazala da su prosečne vrednosti IFN $\gamma$  bile približno jednake u obe ispitivane grupe (Tabela 3). Nađeno je da su prosečne vrednosti interelukina 2 bile povećane u grupi ispitanika sa P u odnosu na ispitanike bez P, ali bez značajnih razlika. Interesantno je uočiti da su prosečne vrednosti IL10 bile značajno povećane u uzorcima PICF ispitanika bez manifestnog P (MW test,  $p=0.0283$ ). U grupi ispitanika bez manifestnog P (MW test,  $p=0.0470$ ) zapaža se i značajno povećanje prosečnih vrednosti IL4. Nasuprot prethodnom nalazu, prosečne vrednosti IL5 bile su značajno povećane u PICF ispitanika sa PI (MW test,  $p=0.0000$ ). U toj grupi ispitanika sa periimplantitisom značajno su povećane i prosečne vrednosti IL6 u PICF (MW test,  $p=0.0383$ ). Kada je u pitanju jedini određivani hemokin IL8, njegove prosečne vrednosti bile su značajno povećane, skoro 30 puta veće u PICF ispitanika sa PI, u odnosu na vrednosti detektovanih u grupi ispitanika bez PI (MW test,  $p=0.0000$ ).

Prosečne vrednosti IL1 $\beta$  bile su skoro dvostruko veće u grupi ispitanika sa PI u odnosu na ispitanike bez manifestnog perimplantitisa, ali bez značajne statističke razlike. Za razliku od toga, prosečne vrednosti TNF $\alpha$  kao i vrednosti TNF $\beta$  bile su praktično izjednačene u obe ispitivane grupe.

**Tabela 3.** Prosečne vrednosti određivanih citokina (pg/uL) u uzorcima PICF bolesnika sa PI i ispitanika bez PI ( $x \pm SD$ )

PI $x \pm SD$	prisutan	odsutan
IFN $\gamma$	3 $\pm$ 4	4 $\pm$ 5
IL2	13 $\pm$ 17	11 $\pm$ 12
IL10	6 $\pm$ 5	11 $\pm$ 10*
IL8	632 $\pm$ 866***	20 $\pm$ 23
IL6	2 $\pm$ 2	5 $\pm$ 4*
IL4	11 $\pm$ 11	18 $\pm$ 13*
IL5	503 $\pm$ 455***	37 $\pm$ 67
IL1 $\beta$	38 $\pm$ 56	19 $\pm$ 19
TNF $\alpha$	20 $\pm$ 24	20 $\pm$ 18
TNF $\beta$	24 $\pm$ 43	19 $\pm$ 18



**Grafikon 1.** Vrednosti odredivanih citokina (IFN $\gamma$ , IL2, IL10, IL4, IL5, IL6, IL8, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) u PCIF pacijenata sa PI i ispitanika bez PI (pg/ul PCIF,  $\bar{x}$ ±SE)

#### 4.1.2. Lokalni imunski odgovor, tip implantata i periimplantitis

Vrednosti ispitivanih citokina odredivane su u uzorcima PICF 51 pacijenta sa tipom 1 implantata i 44 pacijenta sa tipom 2 implantata. Iz ispitivanja su isključeni ispitanici sa drugim tipovima implantata isključivo zbog malog broja, nepodesnog za statističke analize.

Unutar grupe ispitanika sa implantatima tipa 1, znake periimplantitisa (PI+) ispoljavalo je njih 23 (45%), za razliku od grupe ispitanika sa tipom 2 implantata, gde



su znaci perimplantitisa ustanovljeni u značajno manjoj učestalosti, kod u 10 ispitanika (23%,  $p=0.0010$ , Hi kvadrat test).

Prosečne vrednosti svih ispitivanih citokina prikazane su u tabeli 4. Na tabeli se uočava da su prosečne vrednosti IFN $\gamma$  bile približno jednake kod ispitanika bez znakova perimplantitisa, bez obzira na tip implantata. Međutim, kod ispitanika sa manifestnim perimplantitisom došlo je do porasta prosečnih vrednosti IFN $\gamma$ , izraženijeg u grupi sa implantatima tipa 2. Poređenjem vrednosti IFN $\gamma$  unutar grupa ispitanika sa istim tipom implantata pokazano je da je u grupi sa tipom 2 implantata perimplantitis indukovao značajan rast IFN $\gamma$  ( $p=0.0048$ , MW test).

**Tabela.4.** Prosečne vrednosti određenih citokina (pg/uL) u uzorcima PCIF bolesnika sa PI i ispitanika bez PI u odnosu na tip implantata ( $\bar{x}\pm SD$ )

Tip implantata ( $\bar{x} \pm SD$ )	TIP 1		TIP 2	
	PI -	PI +	PI -	PI +
IFN $\gamma$	3 $\pm$ 4	5 $\pm$ 6	3 $\pm$ 4	7 $\pm$ 4 *
IL2	14 $\pm$ 22	10 $\pm$ 9	11 $\pm$ 11	12 $\pm$ 10
IL10	8 $\pm$ 11	16 $\pm$ 14 *	10 $\pm$ 13	8 $\pm$ 5
IL8	205 $\pm$ 449	406 $\pm$ 729 *†	145 $\pm$ 504	41 $\pm$ 69
IL6	3 $\pm$ 5	4 $\pm$ 5	4 $\pm$ 5	3 $\pm$ 3
IL4	14 $\pm$ 16	20 $\pm$ 25	14 $\pm$ 14	27 $\pm$ 21 *
IL5	203 $\pm$ 540	254 $\pm$ 472	142 $\pm$ 417	127 $\pm$ 165
IL1 $\beta$	13 $\pm$ 10	27 $\pm$ 24 *	20 $\pm$ 21	30 $\pm$ 28
TNF $\alpha$	18 $\pm$ 37	30 $\pm$ 49	27 $\pm$ 35 †	26 $\pm$ 20
TNF $\beta$	13 $\pm$ 17	39 $\pm$ 52 *	19 $\pm$ 20	31 $\pm$ 52

(\* =  $p<0.05$ , u odnosu na pacijente sa istim tipom implantata)

(† =  $p<0.05$ , u odnosu na pacijente sa istim tipom implantata)

Daljom analizom se može ustanoviti da su prosečne vrednosti IL2 bile praktično izjednačene u obe grupe ispitanika, bez obzira na tip implantata. Manifestni perimplantitis je ipak indukovao relativno sniženje vrednosti IL2 u grupi 1, a povećanje vrednosti u grupi 2 ispitanika. Navedene razlike nisu dostigle statističku značajnost.

Prosečne vrednosti IL10 bile su izjednačene u obe grupe ispitanika, bez obzira na tip implantata. Uočeno je da je manifestni perimplantitis ipak indukovao relativno

sniženje vrednosti IL10 u grupi 2 implantata, a značajno povećanje vrednosti u grupi 1 ispitanika, u odnosu na tip 1 ispitanika bez znakova PI ( $p=0.0310$ , MW test).

Prosečne vrednosti IL4 nisu se razlikovale u odsustvu PI bez obzira na tip implantata. Kao i u slučaju merenja IFN $\gamma$ , manifestni perimplantitis indukuje porast prosečnih vrednosti IL4, izraženiji u grupi sa implantatima tipom 2. Dalje, poređenje vrednosti IL4 unutar grupa pacijenata sa istim tipom implantata, pokazuje da je u grupi sa tipom 2 perimplantitis indukovao značajan rast IL4 ( $p=0.0206$ , MW test).

Prosečne vrednosti IL5 bile su veće u grupi bolesnika sa tipom 1 implantata, kako bez tako i u prisustvu perimplantitisa. Perimplantitis indukuje različitu dinamiku promene vrednosti IL5 u zavisnosti od tipa implantata. Kod ispitanika sa implantatima tipa 1 periimplantitis povećava prosečne vrednosti, dok u grupi sa implantatima tipa 2 PI snižava prosečne vrednosti.

Prosečne vrednosti IL6 nisu se značajno razlikovale između ispitanika sa različitim tipim implantata. U grupi pacijenata sa tipom 1 periimplantitis je indukovao porast vrednosti, dok je u grupi sa tipom 2 periimplantitis indukovao relativno sniženje prosečnih vrednosti IL6.

Prosečne vrednosti jedinog određivanog hemokina, IL8, nisu se značajno razlikovale u odsustvu periimplantitisa, bez obzira na tip implantata. Manifestni periimplantitis indukovao je značajan porast prosečnih vrednosti IL8 kod ispitanika sa tipom 1 implantata, kako u odnosu na ispitanike iste (1) grupe bez PI ( $p=0.0142$ , MW test), tako i u odnosu na ispitanike sa tipom 2 i periimplantitisom ( $p=0.0386$ , MW test).

Kada su u pitanju proinflamatorni citokini, prosečne vrednosti IL1 $\beta$  bile su nešto veće u grupi ispitanika sa tipom 2 implantata, kako u odsustvu tako i sa manifestnim PI. U obe grupe, kod ispitanika sa PI detektovane su veće prosečne vrednosti nego kod ispitanika bez PI i istim tipom implantata. Vrednosti IL1 $\beta$  značajno su bile veće u grupi ispitanika sa tipom 1 implantata i manifestnim PI u odnosu na ispitanike bez PI ( $p=0.0317$ , MW test).

Izmerene prosečne vrednosti TNF $\alpha$  bile su niže u grupi ispitanika sa tipom 1 implantata u odnosu na grupu sa tipom 2, kako u odsustvu PI tako i kod manifestnog PI. Perimplantitis u grupi ispitanika sa tipom 1 rezultuje porastom prosečnih vrednosti, dok su vrednosti ovog citokina u grupi sa tipom 2 praktično jednake, bez

obzira na prisustvo ili odsustvo PI. Prosečne vrednosti TNF $\alpha$  u odsustvu PI su značajno veće u grupi 2 u odnosu na grupu 1 (p=0.0129, MW test).

Prosečne vrednosti vrednosti TNF $\beta$  bile su približno jednake u obe ispitivane grupe u odsustvu periimplantitisa. Kod ispitanika sa manifestnim PI prosečna koncentracija TNF $\beta$  bila je veća u odnosu na ispitanike iste grupe bez PI. Kod ispitanika sa tipom 1 ova razlika bila je značajna (p=0.0100, MW test).

Kada se analiziraju svi ispitivani citokini detektovani u uzorcima PCIF ispitanika sa različitim tipom implantata u odnosu na periimplantitis, uočljiv je potpuno drugačiji tip lokalnog odgovora na nastalu inflamaciju.

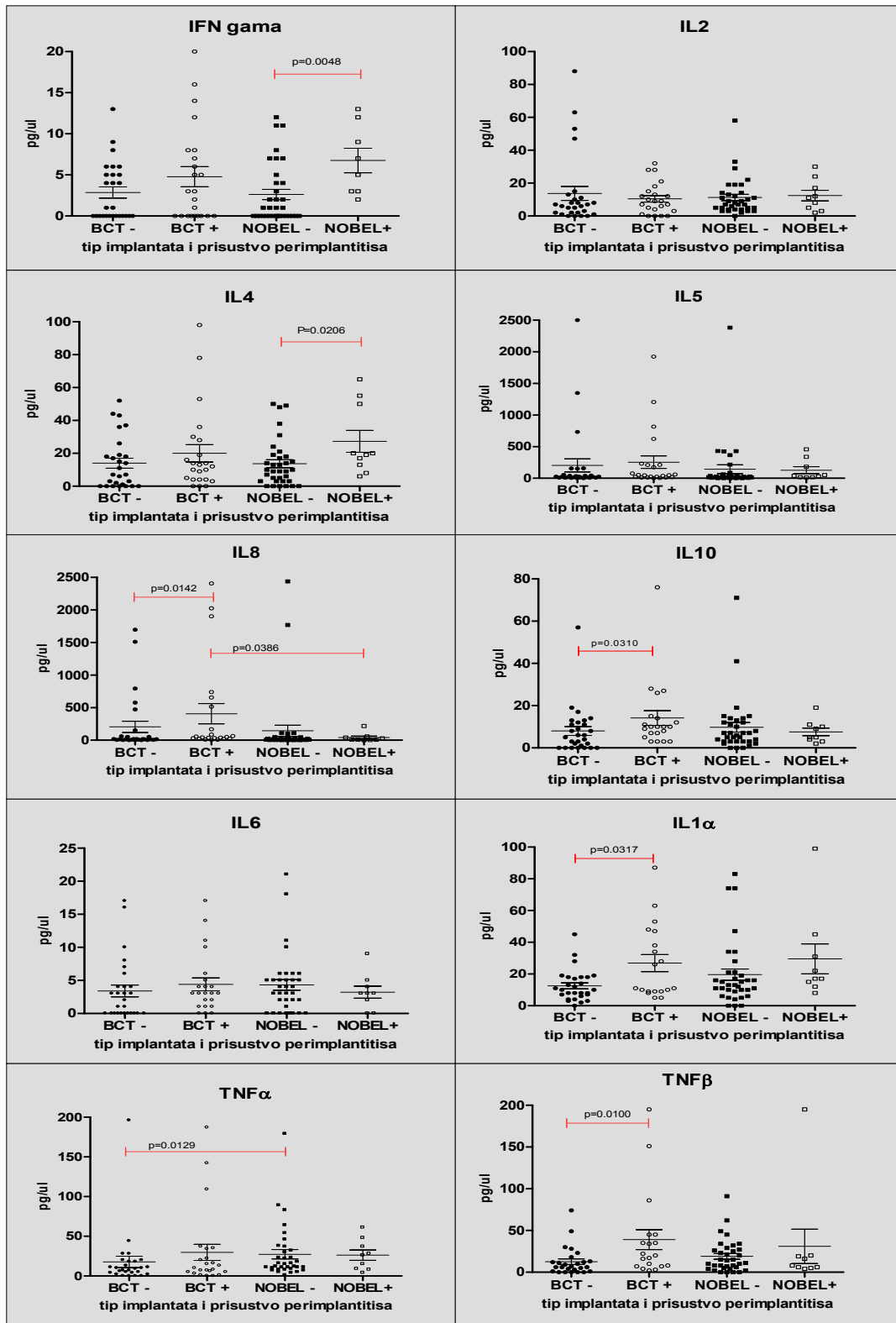
Naime, u grupi ispitanika sa tipom 1 implantata, manifestni periimplantitis se povezuje sa povećanjem prosečnih vrednosti svih ispitivanih citokina (IFN $\gamma$  IL10, IL8, IL6, IL4, IL5, IL1 $\beta$  TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) sem IL2, čije se vrednosti snižavaju.

U grupi ispitanika sa tipom 2 implantata, manifestni periimplantitis povezan je sa porastom IFN $\gamma$ , IL2, IL4, IL1 $\beta$  i TNF $\alpha$ , dok su prosečne vrednosti IL5, IL6, IL8, IL10 i TNF $\alpha$  niže u odnosu na ispitanike bez PI.

Kada se posmatraju samo citokini kod kojih su detektovane značajne promene koncentracija povezane sa manifestnim periimplantitisom, dobija se još jasnija slika (Tabela 5, Grafikon 2). U grupi ispitanika sa tipom 2 implantata periimplantitis je povezan sa značajnim porastom IFN $\gamma$  i IL4, dok je u grupi ispitanika sa tipom 1, periimplantitis povezan sa značajnim porastom vrednosti IL10, IL8, IL1 $\beta$  i TNF $\beta$ .

**Tabela 5.** Prosečne vrednosti određivanih citokina (pg/uL) u uzorcima PCIF bolesnika sa P i ispitanika bez P u odnosu na tip implantata (x $\pm$ SD)

	TIP 1 P + vs -	TIP 2 P + vs -
IFN $\gamma$	p>0.05	<b>p=0.0048</b>
IL2	p>0.05	<b>p&gt;0.05</b>
IL10	p=0.0310	<b>p&gt;0.05</b>
IL8	p=0.0142	<b>p&gt;0.05</b>
IL6	p>0.05	<b>p&gt;0.05</b>
IL4	p>0.05	<b>p=0.0206</b>
IL5	p>0.05	<b>p&gt;0.05</b>
IL1 $\beta$	p=0.0317	<b>p&gt;0.05</b>
TNF $\alpha$	p>0.05	<b>p&gt;0.05</b>
TNF $\beta$	<b>p=0.0100</b>	<b>p&gt;0.05</b>



**Grafikon 2.** Vrednosti odredivanih citokina (IFN $\gamma$ , IL2, IL10, IL4, IL5, IL6, IL8, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) u PCIF pacijenata sa P i ispitanika bez P u odnosu na tip implantata (pg/ul PIC F,  $\bar{x}$ ±SE)

### 4.1.3. Lokalni imunski odgovor u odnosu na vrednosti gingivalnog indeksa

Kod svih ispitanika određivane su vrednosti gingivalnog indeksa (GI) i ispitanike podelili u grupe prema GI. Prosečne vrednosti svih ispitivanih citokina prikazane su u tabeli 6.

**Tabela 6.** Prosečne vrednosti određivanih citokina (pg/uL) u uzorcima PCIF bolesnika sa različitim gingivalnim indeksom ( $\bar{x} \pm SD$ )

GI	0	1	2
IFN $\gamma$	2 $\pm$ 3	4 $\pm$ 4	3 $\pm$ 4
IL2	14 $\pm$ 14	10 $\pm$ 9	13 $\pm$ 18
IL10	10 $\pm$ 14	9 $\pm$ 8	11 $\pm$ 20
IL8	20 $\pm$ 22	49 $\pm$ 141	586 $\pm$ 886
IL6	5 $\pm$ 5	4 $\pm$ 5	3 $\pm$ 3
IL4	14 $\pm$ 16	21 $\pm$ 17	11 $\pm$ 9
IL5	43 $\pm$ 85	43 $\pm$ 51	497 $\pm$ 752
IL1 $\beta$	27 $\pm$ 36	25 $\pm$ 33	25 $\pm$ 45
TNF $\alpha$	20 $\pm$ 16	21 $\pm$ 20	17 $\pm$ 23
TNF $\beta$	23 $\pm$ 23	17 $\pm$ 19	11 $\pm$ 11

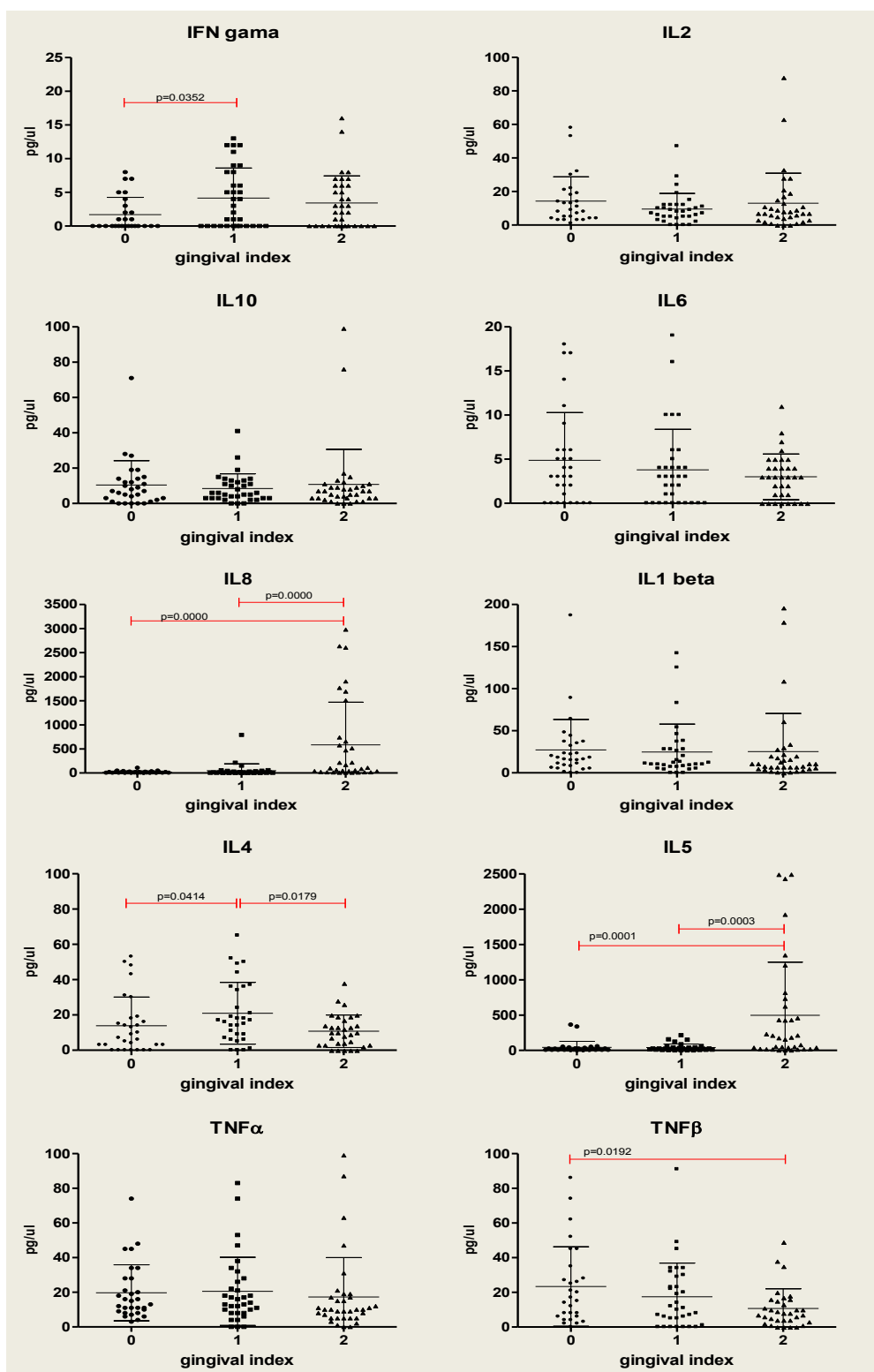
Najveće prosečne vrednosti IFN $\gamma$  detektovane su u grupi ispitanika sa srednjom vrednosti GI. Vrednosti IFN $\gamma$  bile su značajno veće u grupi ispitanika sa GI=1 u odnosu na ispitanike sa GI=0 (0.0352) (Grafikon 3.).

Za razliku od IFN $\gamma$ , najveće prosečne vrednosti IL2 detektovane su grupi sa najmanjim GI. Vrednosti IL2 nisu se značajno razlikovale u grupama sa različitim GI.

Vrednosti IL10 bile su približno jednake u svim ispitivanim grupama, bez značajnih međusobnih razlika. Vrednosti IL8 značajno su rasle od grupe sa najmanjim GI do najvećih vrednosti GI, dostižući skoro 30 puta veći porast. Koncentracije IL8 izmerenih u grupi sa najvećim GI bile su značajno veće odnosu na ispitanike sa GI=1 (0.0000) i GI=0 (0.0000).

Vrednosti IL6 bile su najveće u grupi sa najmanjom vrednosti GI. Vrednosti IL6 pokazuju tendenciju smanjenja sa povećavanjem vrednosti GI. Vrednosti IL6 nisu se značajno međusobno razlikovale.

Uočeno je da su prosečne vrednosti IL4 bile najveće u grupi sa srednjom vrednosti GI, GI=1. Dobljene vrednosti IL4 bile su značajno veće u grupi ispitanika sa srednjim GI (PI=1) u odnosu na ispitanike sa GI=0 (0.0414) i GI=2 (0.0179)



**Grafikon 3.** Vrednosti određivanih citokina (IFN $\gamma$ , IL2, IL10, IL4, IL5, IL6, IL8, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) u PCIF pacijenata sa različitim vrednostima GI

Kada su u pitanju vrednosti IL5, bile su značajno veće u grupi ispitanika sa najvećim GI u odnosu na ispitanike sa GI=1 (0.0003) i GI=0 (0.0001). Prosečne vrednosti IL5 bile su najveće u grupi sa najvećim GI.

Što se tiče proinflammatoryh citokina, prosečne vrednosti IL1 $\beta$  bile su praktično izjednačenih, značajnih bioloških koncentracija u svim ispitivanim grupama, bez značajnih razlika. Vrlo slično, uočava se da su prosečne vrednosti TNF $\alpha$  bile praktično izjednačenih, značajnih bioloških koncentracija u svim ispitivanim grupama, bez značajnih razlika.

Za razliku od toga, vrednosti TNF $\beta$  bile su najveće kod ispitanika sa sa najmanjom vrednosti GI, sa značajnim padom vrednosti u grupama sa GI=2 (p=0.0192).

Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da je najmanji GI povezan sa visokim koncentracijama IL2, IL1 $\beta$  i TNF $\beta$ . Povećanje vrednosti GI povezana je sa visokim koncentracijama IFN $\gamma$ , IL4 i TNF $\alpha$ , dok su najveće vrednosti GI povezane sa visokim koncentracijama IL10, IL8 i IL5

#### 4.1.4. Lokalni imunski odgovor i vrednosti plak indeksa

Kod svih ispitanika odredili smo vrednosti plak indeksa (PI) i ispitanike podelili u grupe prema PI. Prosečne vrednosti svih ispitivanih citokina prikazane su u tabeli 7.

**Tabela 7.** Prosečne vrednosti određivanih citokina (pg/uL) u uzorcima PCIF bolesnika sa različitim plak indeksom (x $\pm$ SD)

PI	0	1	2
IFN $\gamma$	3 $\pm$ 5	4 $\pm$ 4	<b>6 <math>\pm</math> 4</b>
IL2	17 $\pm$ 14	9 $\pm$ 7	<b>8 <math>\pm</math> 6</b>
IL10	11 $\pm$ 12	9 $\pm$ 9	<b>6 <math>\pm</math> 4</b>
IL8	23 $\pm$ 27	312 $\pm$ 673	<b>460 <math>\pm</math> 745</b>
IL6	7 $\pm$ 6	3 $\pm$ 3	<b>2 <math>\pm</math> 2</b>
IL4	11 $\pm$ 11	22 $\pm$ 30	<b>39 <math>\pm</math> 71</b>
IL5	55 $\pm$ 105	218 $\pm$ 55	<b>519 <math>\pm</math> 776</b>
IL1 $\beta$	38 $\pm$ 60	20 $\pm$ 33	<b>33 <math>\pm</math> 47</b>
TNF $\alpha$	23 $\pm$ 18	17 $\pm$ 17	<b>23 <math>\pm</math> 32</b>
TNF $\beta$	<b>29 <math>\pm</math> 27</b>	<b>14 <math>\pm</math> 17</b>	<b>14 <math>\pm</math> 12</b>

Najveće prosečne vrednosti detektovane su u grupi ispitanika sa sa najvećom vrednosti PI. Sa povećavanjem vrednosti PI vidljiva je tendencija povećanja prosečne

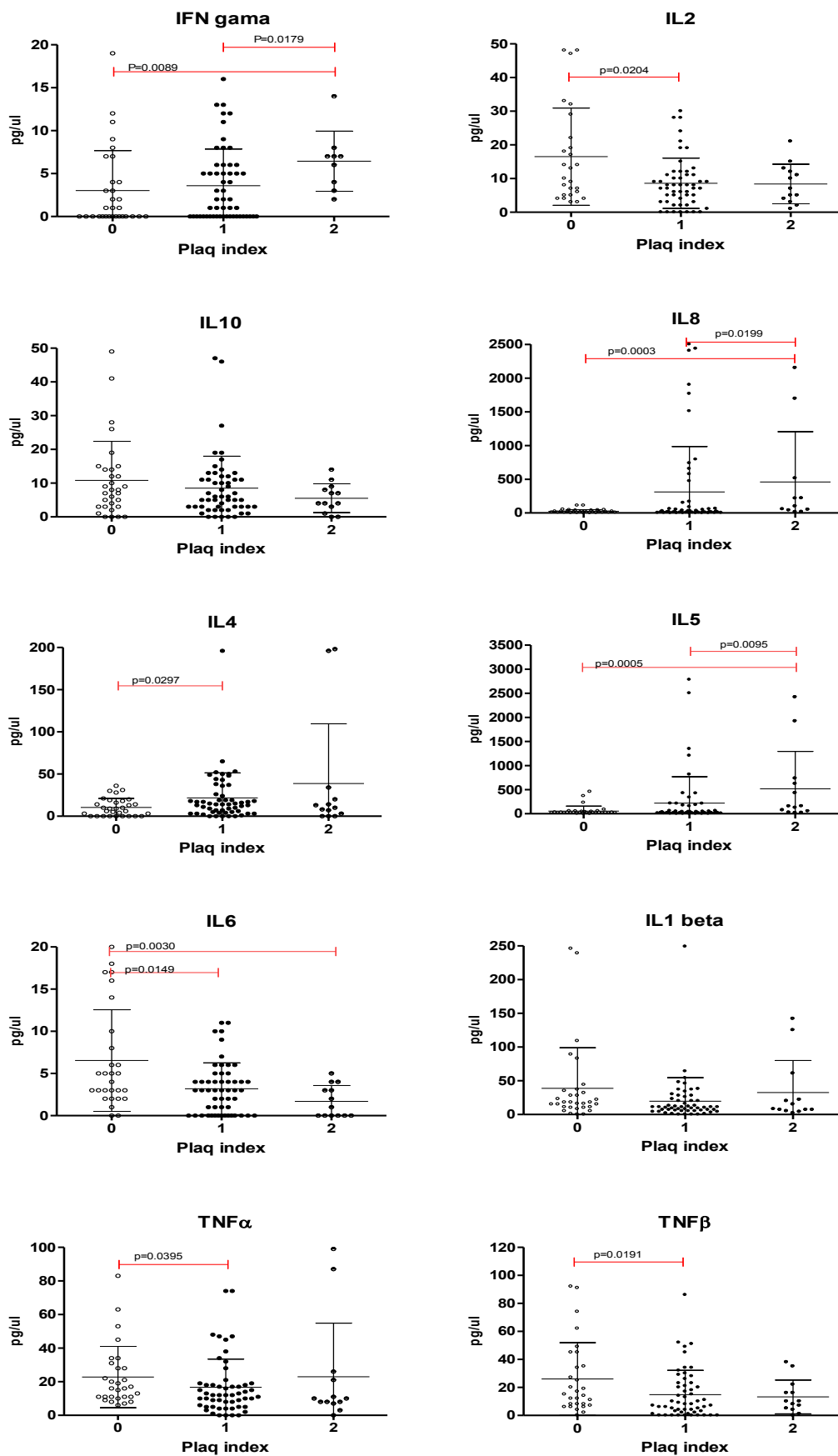
koncentracije IFN $\gamma$ . Vrednosti IFN $\gamma$  bile su značajno veće u grupi ispitanika sa najvećim PI u odnosu na ispitanike sa PI=1 (0.0179) i PI=0 (0.0089) (Grafikon 4.)

Za razliku od IFN $\gamma$ , najveće prosečne vrednosti IL2 detektovane su u grupi sa najmanjim PI, odnosno, odsutnim plakom. Vrednosti IL2 pokazivale su jasnu tendenciju smanjenja u odnosu na povećanu prisutnost plaka. Tako su vrednosti IL2 bile značajno veće u grupi ispitanika sa PI=0 u odnosu na grupu PI=1 (0.0204). Tokom ovog ispitivanja uočava se da je profil prosečnih koncentracija IL10 sličan profilu IL2. Naime, najveće prosečne koncentracije izmerene su u grupi ispitanika sa najmanjim PI. Vrednosti IL10 smanjivale su se sa povećanjem vrednosti PI. Vrednosti IL8 značajno su rasle od grupe sa najmanjom plakom do najvećih vrednosti PI, dostižući skoro 20 puta veći porast. Koncentracije IL8 izmerenih u grupi sa najvećim PI bile su značajno veće u odnosu na ispitanike sa PI=1 (0.0199) i PI=0 (0.0003). Vrednosti IL6 bile su najveće u grupi sa najmanjom vrednosti PI. Daljom analizom uočava se da su vrednosti IL6 bile značajno veće u grupi ispitanika sa najmanjim PI u odnosu na ispitanike sa PI=1 (0.0149) i PI=2 (0.0030). Slično ovome, prosečne vrednosti IL4 bile su najmanje u grupi sa odsutnim plakom i rasle su do najvećih detektovanih, u grupi sa PI 2. Vrednosti IL4 bile su značajno veće u grupi ispitanika sa najmanjim PI (PI=0) u odnosu na ispitanike sa PI=1 (0.0297). Prosečne vrednosti IL5 imale su isti trend kao i vrednosti IL4, sa značajnim porastom od grupe sa najmanjim PI, odnosno, sa najvećim detektovanim vrednostima PI u grupi ispitanika sa najvećim plakom. Kada se posmatraju vrednosti IL5 uočava se da su bile značajno veće u grupi ispitanika sa najvećim PI u odnosu na ispitanike sa PI=1 (0.0095) i PI=0 (0.0005).

Prosečne vrednosti proinflammatoryh citokina IL1 $\beta$  bile su značajnih bioloških koncentracija u svim ispitivanim grupama, a najviše detektovane u grupi PI=0, plakom. Vrednosti TNF $\alpha$  u grupi PI=0 bile su značajno veće od vrednosti u grupi PI=1 ( $p=0.0395$ ). Uočene vrednosti TNF $\beta$  bile su najveće u ispitanika sa sa najmanjom vrednosti plaka, sa značajnim padom vrednosti u grupama sa PI=1 ( $p=0.0191$ ) i PI=2.

Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da je odsustvo plaka povezano sa visokim koncentracijama IL2, IL10, IL6 i TNF $\alpha$ , dok je razvoj plaka povezan sa visokim koncentracijama IFN $\gamma$ , IL8, IL4 i IL5 u PCIF. Vrednosti IL1 $\beta$  i TNF $\alpha$  detektovani su u PICF kod svih grupa, uglavnom nezavisno od vrednosti PI.





**Grafikon 4.** Vrednosti odredivanih citokina (IFN $\gamma$ , IL2, IL10, IL4, IL5, IL6, IL8, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) u PCIF pacijenata sa razlicitim vrednostima PI

#### 4.1.5. Lokalni imunski odgovor i dubina periimplantatnog sulkusa

Kod svih ispitanika odredili smo dubinu perimplantnog sulkusa i ispitanike podelili u grupe prema veličini dubine periimplantatnog sulkusa DPIS. Prosečne vrednosti svih ispitivanih citokina prikazane su u tabeli 8.

Prosečne vrednosti IFN $\gamma$  bile su na donjoj granici detektabilnosti metode. Ipak, najveće prosečne vrednosti detektovane su u grupi ispitanika sa 2 mm DPIS. Interesantno je da postoji tendencija smanjenja prosečne koncentracije IFN $\gamma$  sa povećavanjem dubine DPIS.

Kao i u slučaju IFN $\gamma$ , najveće prosečne vrednosti IL2 detektovane su u grupi koja je imala 2 i 3 mm DPIS. S druge strane, vrednosti IL2 bile su najmanje u grupi ispitanika sa najdubljim DPIS.

U ovom istraživanju uočeno je da je profil prosečnih koncentracija IL10 bio sličan profilu IFN $\gamma$  i IL2. Naime, najveće prosečne koncentracije izmerene su u grupama ispitanika sa 2 i 3 mm DPIS, što je bilo značajno veće od vrednosti izmerenih u ispitanika sa DPIS 4 i 5 mm (DPIS 2/5  $p=0.0337$ , DPIS 2/4  $p=0.0195$ , MW test).

Profil detektovanih koncentracija IL8 imao je potpuno drugačiji izgled od profila utvrđenih za prethodno opisane citokine. Naime, vrednosti IL8 značajno su rasle od grupe sa najmanjom dubinom do najvećih vrednosti DPIS, dostižući skoro 50 puta veći porast. Koncentracije IL8 izmerenih u grupi DPIS 1 mm bile su značajno niže u odnosu na DPIS 4 mm ( $p=0.0024$ ) i DPIS 5 mm ( $p=0.0007$ ). Takođe, vrednosti IL8 u grupi ispitanika sa DPIS 2 mm bile su značajno niže u odnosu na DPIS 4 mm ( $p=0.0060$ ) i DPIS 5 mm ( $p=0.0009$ ). Konačno, vrednosti IL8 bile su značajno niže u grupi ispitanika sa DPIS 3 mm u odnosu na grupu DPIS 5 mm ( $p=0.0272$ ).

Izmerene vrednosti IL6 bile su najveće u grupama sa najmanjom vrednosti DPIS, kod ispitanika koji su imali dubinu 1 i 2 mm.

Prosečne vrednosti IL4 bile su najveće u grupama ispitanika koji su imali DPIS 2 i 3 mm. Uočava se da kod ispitanika sa većom dubinom džepa se mogu detektovati niže prosečne koncentracije IL4, sa skoro dvostruko manjom vrednosti u grupi DPIS 5 mm u odnosu na prethodne grupe. Navedene razlike nisu bile značajne.

Prosečne vrednosti IL5 imale su isti trend kao i vrednosti IL8, sa značajnim porastom od grupe koje su imale najmanju vrednost DPIS, odnosno, sa najvećim detektovanim

vrednostima u grupi ispitanika koji su imali dubinu veću od 5 mm. Vrednosti IL5 detektovane u grupi ispitanika sa najvećim DPIS bile su značajno veće u odnosu na vrednosti detektovane u grupi DPIS 3 mm ( $p=0.0399$ ), DPIS 2 mm ( $p=0.063$ ) i DPIS 1 mm ( $p=0.0094$ ).

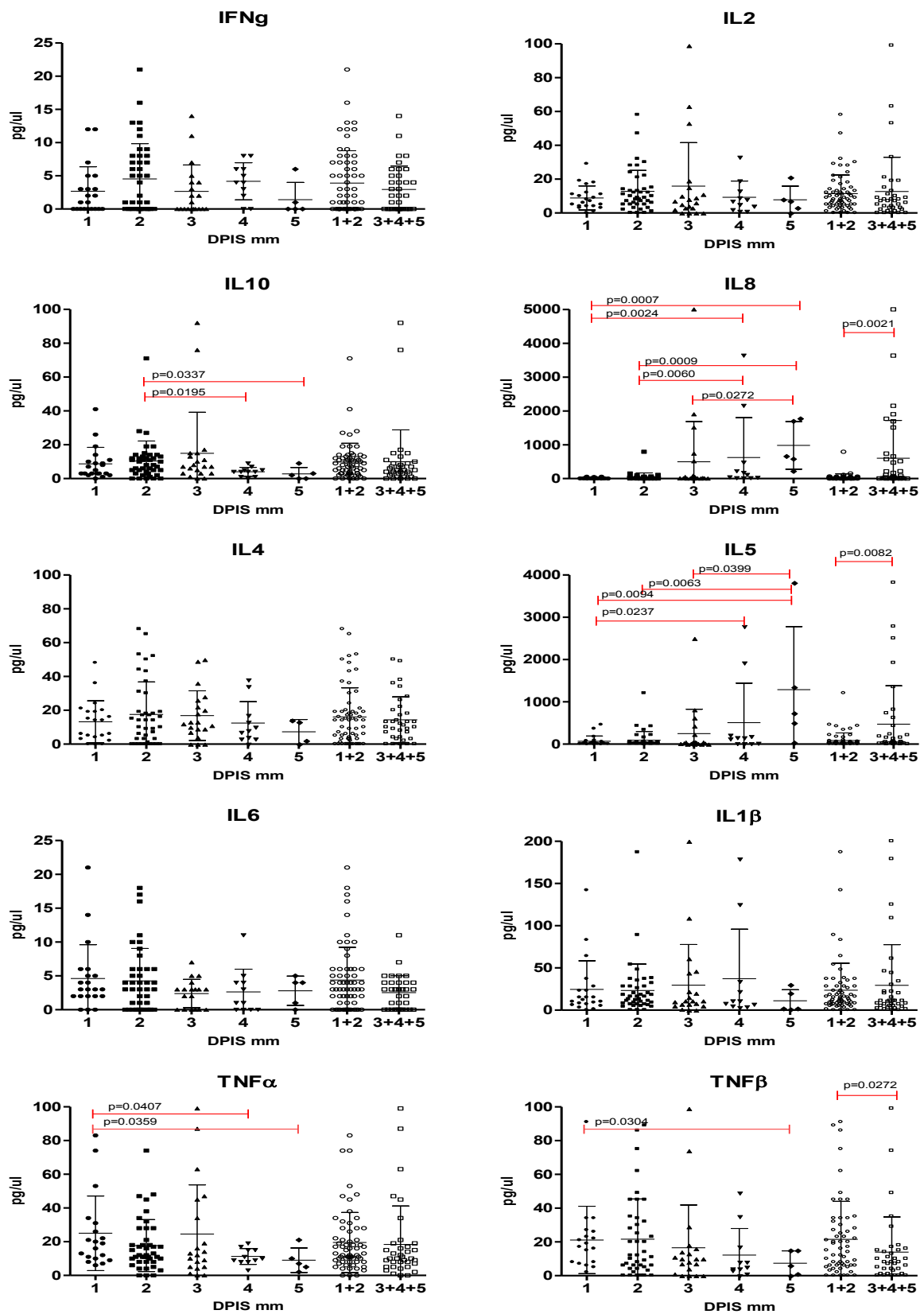
Kada se razmatraju proinflamatorni citokini, prosečne vrednosti IL1 $\beta$  bile su značajnih bioloških koncentracija u svim ispitivanim grupama, a najviše u grupi DPIS 4 mm, bez značajnih razlika.

Prosečne vrednosti TNF $\alpha$  bile su najveće u grupama DPIS 1mm i 3 mm, grupama sa najplićim sulkusom. Vrednosti TNF $\alpha$  u grupi DPIS bile su značajno veće od vrednosti DPIS 4 mm ( $p=0.0407$ ) i DPIS 5 mm ( $p=0.0359$ ).

I na kraju, vrednosti TNF $\beta$  bile su najveće kod ispitanika sa najplićim sulkusom, u grupama DPIS 1, 2 i 3 mm, sa značajnim padom vrednosti u grupi ispitanika koji su imali DPIS 5 mm (DPIS 1/5 mm,  $p=0.0304$ ).

**Tabela 8.** Prosečne vrednosti određivanih citokina (pg/uL) u uzorcima PCIF bolesnika sa različitom dubinom periimplantnog sulkusa ( $\bar{x}\pm SD$ )

DPIS $\bar{x} \pm SD$	1 mm	2 mm	3 mm	4 mm	5 mm	< 3 mm	> 3 mm
IFN $\gamma$	3 $\pm$ 4	5 $\pm$ 5	3 $\pm$ 5	4 $\pm$ 3	2 $\pm$ 3	4 $\pm$ 5	3 $\pm$ 4
IL2	9 $\pm$ 7	13 $\pm$ 12	16 $\pm$ 26	9 $\pm$ 10	8 $\pm$ 8	12 $\pm$ 11	13 $\pm$ 20
IL10	9 $\pm$ 10	10 $\pm$ 12	15 $\pm$ 24	4 $\pm$ 3	3 $\pm$ 4	10 $\pm$ 11	10 $\pm$ 19
IL8	20 $\pm$ 19	45 $\pm$ 125	497 $\pm$ 1187	623 $\pm$ 1179	982 $\pm$ 704	36 $\pm$ 102	603 $\pm$ 1116
IL6	5 $\pm$ 5	5 $\pm$ 5	2 $\pm$ 2	3 $\pm$ 3	3 $\pm$ 2	4 $\pm$ 5	3 $\pm$ 3
IL4	14 $\pm$ 13	18 $\pm$ 19	17 $\pm$ 15	13 $\pm$ 13	7 $\pm$ 7	16 $\pm$ 17	14 $\pm$ 14
IL5	68 $\pm$ 122	91 $\pm$ 208	249 $\pm$ 576	508 $\pm$ 939	1484 $\pm$ 1645	83 $\pm$ 183	472 $\pm$ 912
IL1 $\beta$	25 $\pm$ 34	23 $\pm$ 31	30 $\pm$ 48	37 $\pm$ 59	11 $\pm$ 13	24 $\pm$ 32	29 $\pm$ 48
TNF $\alpha$	25 $\pm$ 22	18 $\pm$ 15	25 $\pm$ 29	11 $\pm$ 5	9 $\pm$ 7	20 $\pm$ 18	18 $\pm$ 23
TNF $\beta$	21 $\pm$ 20	22 $\pm$ 24	17 $\pm$ 25	12 $\pm$ 16	7 $\pm$ 7	22 $\pm$ 22	14 $\pm$ 21



**Grafikon 5.** Vrednosti određivanih citokina (IFN $\gamma$ , IL2, IL10, IL4, IL5, IL6, IL8, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) u PCIF pacijenata sa različitom dubinom DPIS

U predstojećem poglavlju su prezentovani rezultati dobijeni ovom doktorskom disertacijom. Poglavlje rezultati je podeljeno u nekoliko celina koje su definisane na osnovu prethodno postavljenih ciljeva studije. U ovom delu predstavljena je analiza proučavanih polimorfizama u grupi ispitanika sa i bez prisutnog periimplantitisa. Zatim su predstavljeni rezultati polimorfizama sa etiološkim i kliničko patološkim odlikama grupe ispitanika. U poslednjem segmentu ovog dela date su asocijacije proučavanih polimorfizama sa rizikom za razvoj periimplantitisa kao i povezanost polimorfizama gena za citokine IL6, IL10 i TNF $\alpha$  sa lokalnom produkcijom citokina u ispitivanoj grupi ispitanika sa ugrađenim dentalnim implantatima.

## **4.2. Određivanje polimorfizama gena za citokine i CD14gen**

### **4.2 1. Distribucija genotipova i alela ispitivanih polimorfizama u IL1ra, TNF $\alpha$ , IL10, IL6 i CD14 genima**

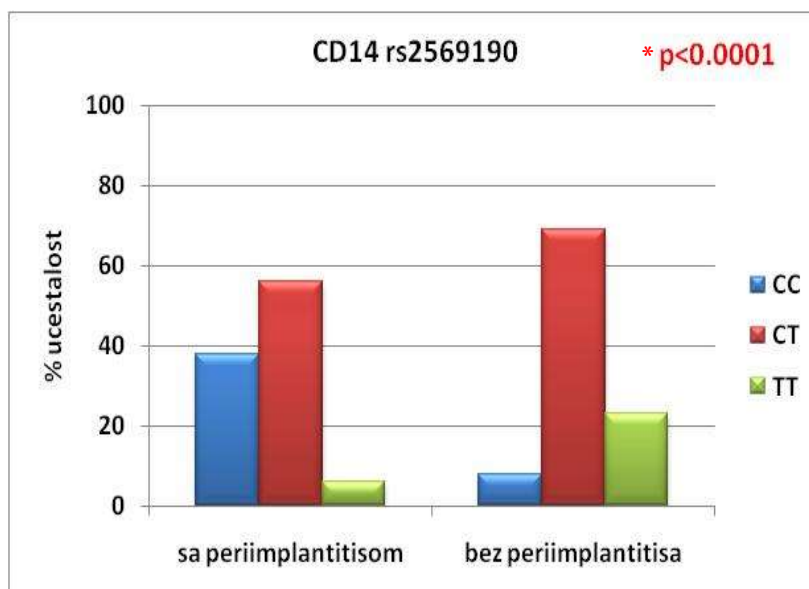
Učestalosti genotipova i alela analiziranih polimorfizama u CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra genima u grupi ispitanika sa periimplantitisom i u grupi ispitanika koji nisu imali periimplantitis su predstavljeni tabelarno i/ili grafički. Učestalosti genotipova analiziranih polimorfizama u CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra genima su predstavljeni na tabeli 9.

Na osnovu dobijenih rezultata proučavanih polimorfizama uočeno je postojanje statistički značajne razlike u distribuciji genotipova za analizirani polimorfizam rs2569190 u CD14 genu ( $p < 0.001$ ) (Tabela 9, Grafikon 6) U obe ispitivane grupe je zabeležena najviša učestalost heterozigotnog genotipa. Uočili smo da je *wild type* CC genotip zastupljeniji u grupi ispitanika sa periimplantitisom (38%) u odnosu na ispitanike bez periimplantitisa (8%). Istovremeno, mutirani TT genotip se javljao sa većom učestalošću u grupi ispitanika bez periimplantitisa u odnosu na grupu sa periimplantitisom (23% odnosno 6%) (Tabela 9, Grafikon 6).

**Tabela 9.** Zastupljenost genotipova proučavanih polimorfizama u grupi ispitanika sa periimplantitisom

Gen/SNP	Genotip	Ispitanici sa periimplantitisom	Ispitanici bez periimplantitisa	p*
		N (34)	N (64)	
CD-14 rs2569190	CC (wt)	13	5	<0.0001
	CT	19	44	
	TT	2	15	
IL-6 rs1800795	GG (wt)	34	43	<0.0001
	GC	0	21	
	CC	0	0	
IL-10 rs1800896	AA (wt)	6	25	<0.0001
	AG	28	17	
	GG	0	22	
TNF- $\alpha$ rs1800629	AA	1	1	<0.0001
	AG	18	7	
	GG (wt)	15	56	
IL-1ra	A1A1	22	25	0.042
	A1A2	5	28	
	A1A3	1	1	
	A1A4	1	0	
	A2A2	4	7	
	A3A2	1	3	

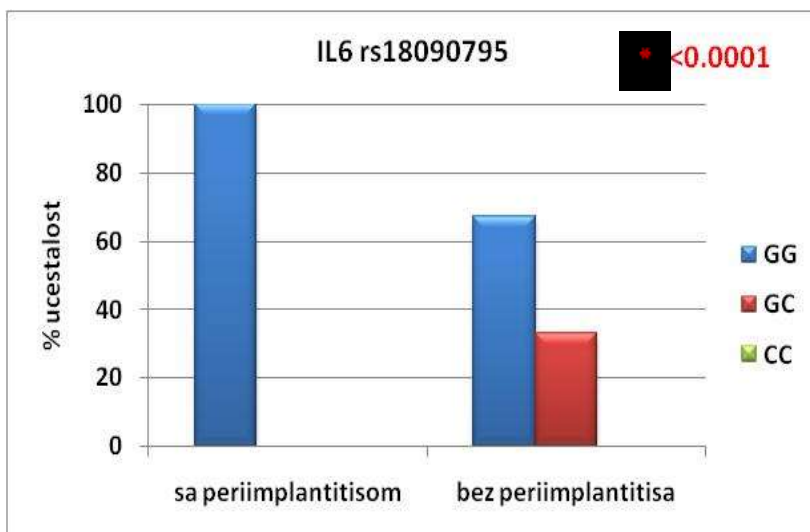
N-ukupan broj pacijenata/kontrola  
p\* < 0.05



**Grafikon 6.** Procentualna zastupljenost genotipova polimorfizma rs2569190 CD14 gena u grupi ispitanika sa i bez periimplantitisa

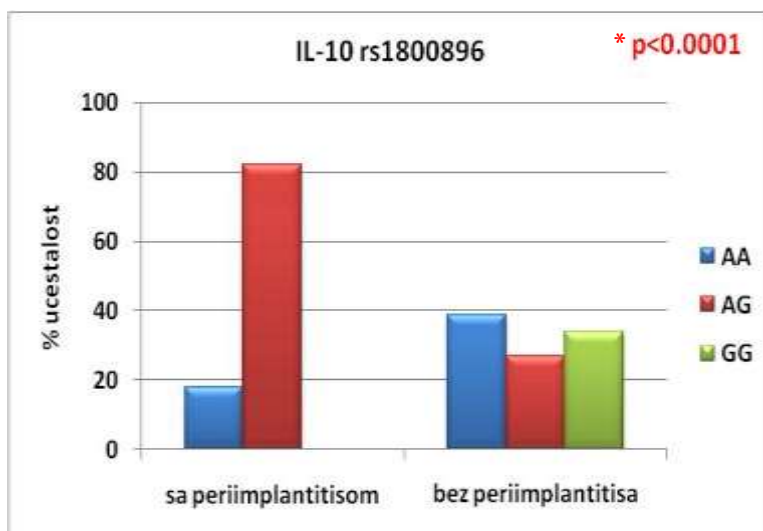
Za proučavani polimorfizam rs18090795 u IL6 genu, uočeno je postojanje statistički značajne razlike u distribuciji genotipova između dve grupe ispitanika (p < 0.0001) (Tabela 9, Grafikon 7). Zabeleženo je odsustvo heterozigotnog i mutiranog genotipa u

grupi ispitanika sa periimplantitisom, dok je u grupi ispitanika bez periimplantitisa zabeleženo samo odsustvo mutiranog genotipa.



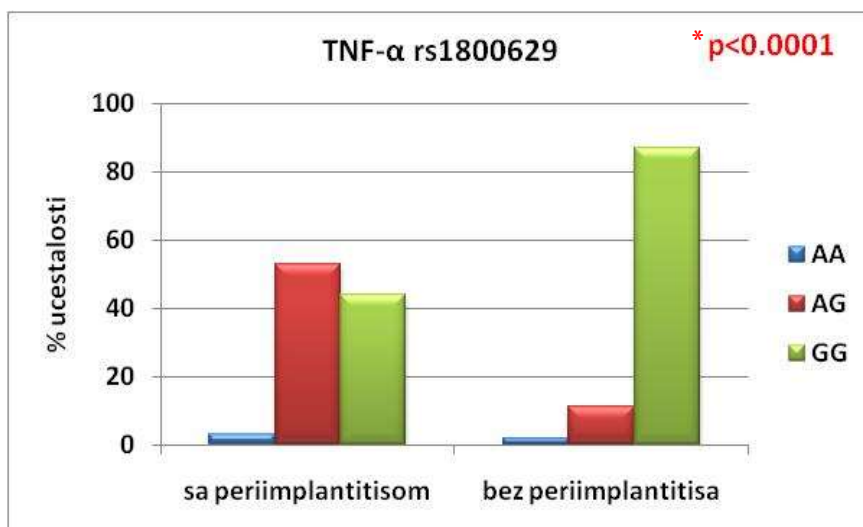
**Grafikon 7.** Procentualna zastupljenost genotipova polimorfizma rs18090795 IL6 gena u grupi ispitanika sa i bez periimplantitisa

Proučavanjem polimorfizama u IL10 genu, zapaženo je postojanje razlike u distribuciji genotipova između dve grupe ispitanika ( $p < 0.0001$ ). U grupi pacijenata sa periimplantitisom, najzastupljeniji je bio heterozigotni AG genotip (82%), a potom *wild type* AA (18%), dok nije zabeleženo postojanje GG genotipa (Grafikon 8). Sa druge strane, u grupi ispitanika bez periimplantitisa, *wild type* AA genotip se javljao sa najvišom učestalošću (39%), za kojim sledi mutirani GG (34%) i heterozigotni AG genotip (27%) (Grafikon 8).



**Grafikon 8.** Procentualna zastupljenost genotipova rs1800896 polimorfizma IL-10 gena u grupi sa i bez periimplantitisa

Za analizirani polimorfizam rs1800629 u TNF $\alpha$  genu, utvrđeno je postojanje razlike u učestalosti genotipova između grupe ispitanika sa i bez periimplantitisa ( $p < 0.0001$ ) (Tabela 9, Grafikon 9). Dok je u grupi pacijenata sa periimplantitisom najvišu učestalost imao heterozigotni genotip (53%), u grupi ispitanika bez periimplantitisa je najviša zastupljenost bila zabeležena u slučaju mutiranog genotipa (87%) (Grafikon 9). *Wild type* genotip je u obe grupe bio detektovan samo kod jednog ispitanika.

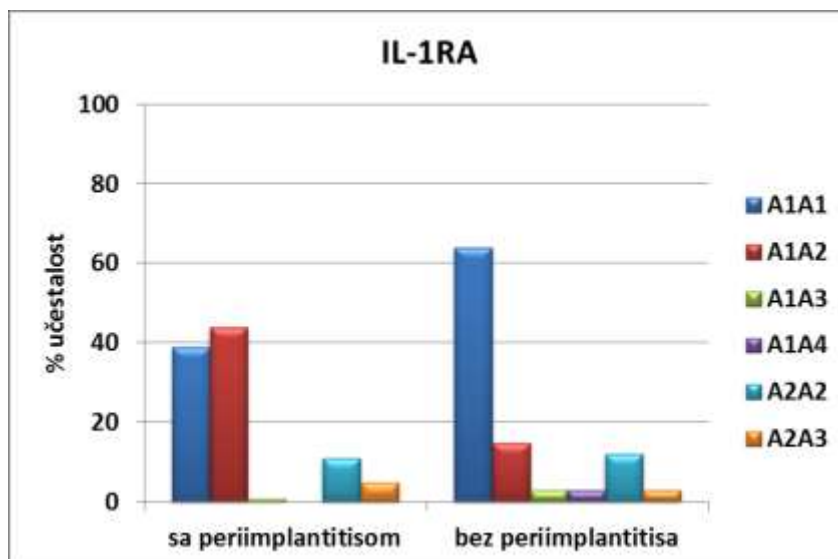


**Grafikon 9.** Procentualna zastupljenost genotipova polimorfizma rs1800629 TNF- $\alpha$  gena u grupi ispitanika sa i bez periimplantitisa

Za proučavani polimorfizam u IL1ra genu, uočeno je postojanje statistički značajne razlike u distribuciji genotipova (varijabilni broj tandemskih ponovaka) između dve grupe ispitanika ( $p = 0.042$ ) (Tabela 9). Na grafikonu 10 je prikazana procentualna zastupljenost analiziranih genotipova. U grupi ispitanika sa periimplantitisom zabeležena je najviša učestalost A1A1 genotipa, dok je u grupi ispitanika bez periimplantitisa zastupljeniji A1A2 genotip.

Postojanje statističke razlike u distribuciji alela je zabeleženo za sve analizirane polimorfizme, osim u slučaju ispitivanog polimorfizma u IL10 i IL1ra genima (Tabela 10).





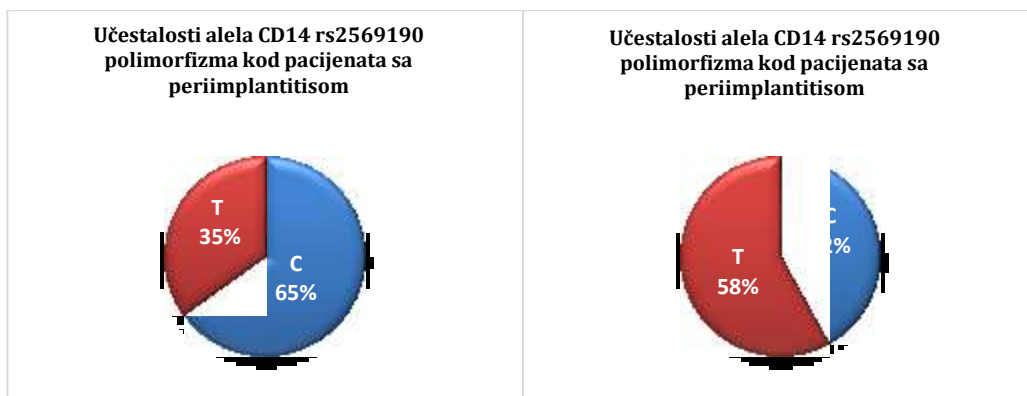
**Grafikon 10.** Procentualna zastupljenost genotipova polimorfizma IL 1ra gena u grupi ispitanika sa i bez periimplantitisa

**Tabela 10.** Učestalosti alela proučavanih polimorfizama u CD14 genu, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra kod pacijenata sa periimplantitisom i u kontrolnoj grupi kod pacijenta bez periimplantitisa

Gen/SNP	Aleli	Ispitanici sa periimplantitisom	Ispitanici bez periimplantitisa	p
		N	N	
CD-14 rs2569190	C	44	54	0.003
	T	24	74	
IL-6 rs1800795	G	68	107	<0.0001
	C	0	21	
IL-10 rs1800896	A	40	67	0.386
	G	28	61	
TNF $\alpha$ rs1800629	A	20	9	<0.0001
	G	48	119	
IL-1RA	A1	51	79	0.102
	A2	14	45	
	A3	2	4	
	A4	1	0	

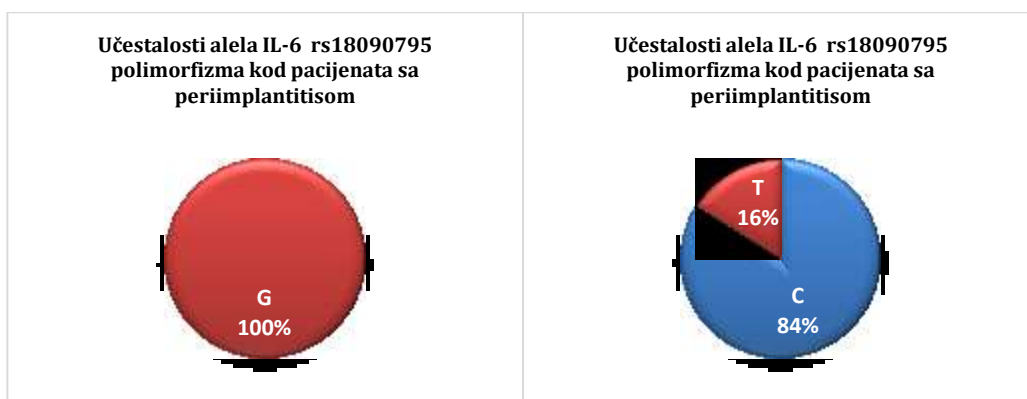
N-ukupan broj pacijenata/kontrola  
p\* < 0.05

U CD14 genu između ispitivanih grupa pacijenata uočene su statistički značajne razlike učestalosti alela analiziranog polimorfizma (Tabela 10, Grafikon 11).



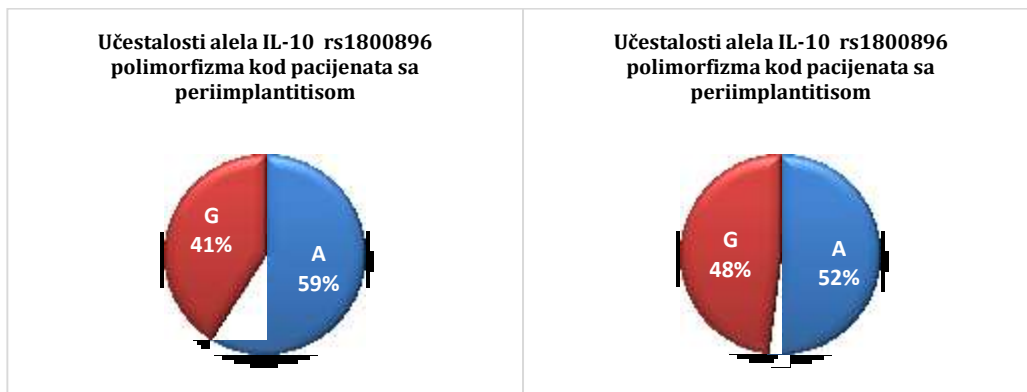
**Grafikon 11.** Procentualna učestalost alela polimorfizma rs2569190 CD14 gena u grupi ispitanika a) sa periimplantitisom b) bez periimplantitisa

Učestalosti alela proučavang IL6 polimorfizma je predstavljen na grafikonu 12. U grupi ispitanika sa periimplantitisom je posledično uočeno odsustvo mutiranog C alela, koji se u grupi ispitanika bez periimplantitisa javljao sa učestalošću od 84% .



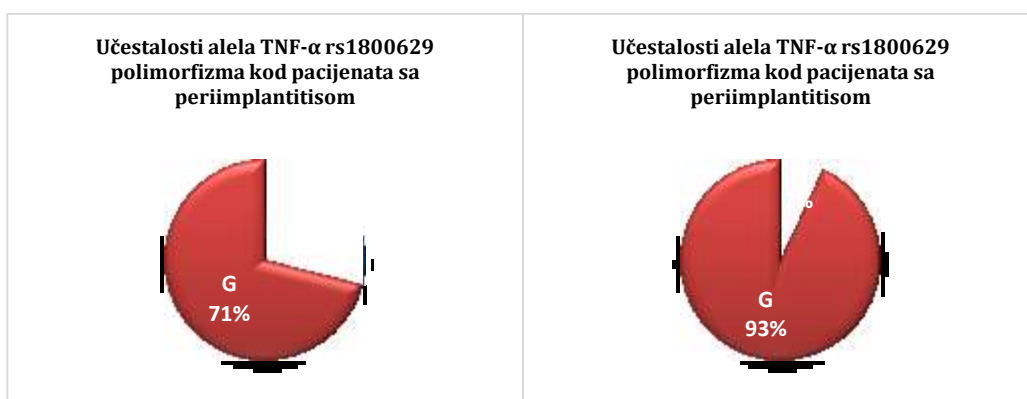
**Grafikon 12** Procentualna zastupljenost alela polimorfizma rs18090795 IL-6 gena u grupi ispitanika a) sa periimplantitisom b) bez periimplantitisa.

Ispitivanjem učestalosti alela ispitivanog polimorfizma IL10 gena nije zabeleženo postojanje statistički značajne razlike u distribuciji alela između ispitivanih grupa pacijenata (Tabela 10, Grafikon 13).



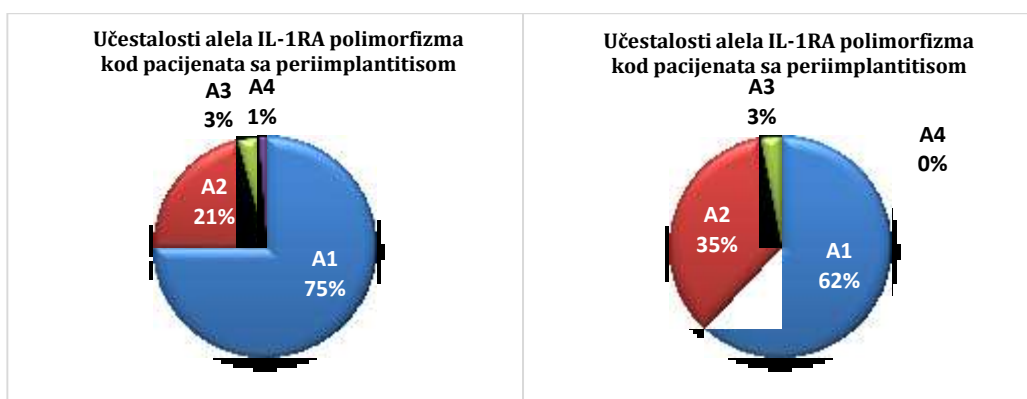
**Grafikon 13.** Procentualna zastupljenost alela polimorfizma rs1800896 IL10 gena u grupi ispitanika a) sa periimplantitisom b) bez periimplantitisa.

Rezultati ispitivanih alela TNF  $\alpha$  polimorfizma su pokazali da postoji statistički značajne razlike učestalosti alela između dve grupe ispitanika (Tabela 10, Grafikon 14). U obe grupe ispitanika je dominirao alel G, pri čemu se u grupi ispitanika bez periimplantitisa javljao sa učestalošću od 93%, a u grupi ispitanika sa periimplantitisom u 71%.



**Grafikon 14.** Procentualna zastupljenost alela polimorfizma rs1800629 TNF- $\alpha$  gena u grupi ispitanika a) sa periimplantitisom b) bez periimplantitisa.

Merenjem učestalosti alela analiziranog polimorfizma u IL1ra genu nije zabeleženo postojanje statistički značajne razlike u distribuciji između ispitivanih grupa (Tabela 10, Grafikon 15). Uočili smo da je alel A1, dominantno zastupljen u obe grupe ispitanika (75%, 62%).



**Grafikon 15.** Procentualna zastupljenost alela polimorfizma IL1ra gena u grupi ispitanika a) sa periimplantitisom b) bez periimplantitisa.

## 4.2.2. Etiološke i kliničko-patološke odlike ispitivane studijske grupe

Na tabeli 11 je predstavljena asocijacija proučavanih polimorfizama u CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra genima sa etiološkim faktorima kao i sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitivane grupe pacijenta sa periimplantitsom. Nije pronađena statistički značajna veza između analiziranih polimorfizama u CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra genima i kliničko patološkim odlikama.

**Tabela 11.** Asocijacija polimorfizama u CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra genima sa etiološkim i kliničko- patološkim odlikama ispitanika sa periimplantitsom

Varijable	N	CD14 rs2569190	IL-6 rs1800795	IL-10 rs1800896	TNF $\alpha$ rs	IL-1RA rs
		CC/CT/TT	GG/GC/CC	AA/AG/GG	AA/AG/GG	A1A1/A1A2/A1A3/ A1A4/A2A2/A2A3
<b>Pol</b>						
muški	26	10/14/2	28/0/0	5/21/0	0/15/11	17/4/0/1/3/1
ženski	8	3/5/0	8/0/0	1/7/0	1/3/4	5/1/1/0/1/0
	p	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Godine</b>						
<58	18	7/11/0	18/0/0	2/16/0	0/8/10	13/2/0/0/3/0
>58	16	6/8/2	16/0/0	4/12/0	1/10/5	9/3/1/1/1/1
	p	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Pušenje</b>						
ne	10	5/4/1	10/0/0	1/9/0	0/6/4	6/1/1/0/2/0
bivši	12	3/8/1	12/0/0	1/11/0	1/7/4	4/4/0/1/2/1
sadašnji	12	5/7/0	12/0/0	4/8/0	0/5/7	12/0/0/0/0/0
	p	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Istorija paradontopatija</b>						
ne	13	4/9/0	13/0/0	4/9/0	0/6/7	11/1/0/0/0/1
da	21	9/10/2	21/0/0	2/19/0	1/12/8	11/4/1/1/4/0
	p	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Indeks krvarenja</b>						
0	9	4/5/0	9/0/0	2/7/0	0/2/7	8/0/1/0/0/0
1	19	6/11/2	19/0/0	4/15/0	1/13/5	11/4/0/0/3/1
2	5	2/3/0	5/0/0	0/5/0	0/3/2	2/1/0/1/1/0
3	1	1/0/0	1/0/0	0/1/0	0/0/1	1/0/0/0/0/0
	p	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	
<b>Gingivalni indeks</b>						
0	0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0/0/0/0
1	4	2/2/0	4/0/0	0/4/0	0/2/2	3/0/0/0/0/0/1
2	30	11/17/2	30/0/0	6/24/0	1/16/13	19/5/1/1/4/0
3	0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0/0/0/0
	p	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Dubina džepa</b>						
<3 mm	11	5/5/1	11/0/0	2/9/0	0/6/5	8/1/1/0/1/0
>=3 mm	23	8/14/1	23/0/0	4/19/0	1/12/10	14/4/0/1/3/1
	p	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ

N-ukupna broj pacijenata/kontrola; NSZ-nije statistički značajno

**Tabela 12.** Asocijacija polimorfizama u CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra genima sa etiološkim i kliničko- patološkim odlikama ispitanika bez periimplantitisa

Varijable	N	CD14 rs2569190	IL-6 rs1800795	IL-10 rs1800896	TNF $\alpha$ rs	IL-1RA rs
		CC/CT/TT	GG/GC/CC	AA/AG/GG	AA/AG/GG	A1A1/A1A2/A1A3/ A1A4/A2A2/A2A3
<b>Pol</b>						
muški	44	4/29/11	34/10/0	16/13/15	1/6/37	21/16/1/0/4/2
ženski	20	1/15/4	9/11/0	9/4/7	0/1/19	4/12/0/0/3/1
p		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Godine</b>						
<58	33	1/24/8	22/11/0	14/7/12	1/3/29	12/15/0/0/4/2
>58	31	4/20/7	21/10/0	11/10/10	0/4/27	13/13/1/0/3/1
p		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Pušenje</b>						
ne	37	4/27/6	24/13/0	16/11/10	0/6/31	15/14/1/0/5/2
bivši	11	0/8/3	8/3/0	4/2/5	0/0/11	5/6/0/0/0/0
sadašnji	16	1/9/6	11/5/0	5/4/7	1/1/14	5/8/0/0/2/1
p		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Istorija paradontopatija</b>						
ne	51	5/35/11	32/19/0	19/13/19	0/5/46	21/22/1/0/5/2
da	13	0/9/4	11/2/0	6/4/3	1/2/10	4/6/0/0/2/1
p		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Indeks krvarenja</b>						
0	47	2/33/12	30/17/0	21/10/16	1/6/40	16/23/1/0/5/2
1	14	1/10/3	11/3/0	3/6/5	0/1/13	6/5/0/0/2/1
2	3	2/1/0	2/1/0	1/1/1	0/0/3	3/0/0/0/0/0
3	0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0/0/0/0
p		<b>0.004</b>	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Gingival indeks</b>						
0	30	1/23/6	18/12/0	11/5/14	0/3/27	12/15/1/0/1/1
1	29	4/19/6	22/7/0	12/9/8	1/3/25	12/11/0/0/5/1
2	5	0/2/3	3/2/0	2/3/0	0/1/4	1/2/0/0/1/1
3	0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0/0/0/0
p		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Dubina džepa</b>						
<3 mm	56	4/41/11	37/19/0	23/13/20	1/6/49	22/25/1/0/6/2
>=3 mm	8	1/3/4	6/2/0	2/4/2	0/1/7	3/3/0/0/1/1
p		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ

N-ukupna broj pacijenata/kontrola; NSZ-nije statistički značajno

Na tabeli 13 su predstavljeni rezultati asocijacije proučavanih polimorfizama u CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra genima sa etiološkim faktorima kao i sa kliničko-patološkim

karakteristikama celokupne studijske grupe koja je uključivala ispitanike sa i bez periimplantitisa.

**Tabela 13.** Asocijacija polimorfizama u CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra genima sa etiološkim i kliničko-patološkim odlikama celokupne studijske grupe-ispitanici sa i bez periimplantitisa združeno

Varijable	N	CD14	IL-6	IL-10	TNF $\alpha$	IL-1RA
		rs2569190	rs1800795	rs1800896	rs	rs
		CC/CT/TT	GG/GC/CC	AA/AG/GG	AA/AG/GG	A1A1/A1A2/A1A3/A1A4/A2A2/A2A3
<b>Pol</b>						
<b>muški</b>	70	14/43/13	60/10/0	21/34/15	1/21/48	38/20/1/1/7/3
<b>ženski</b>	28	4/20/4	17/11/0	10/11/7	1/4/23	9/13/1/0/4/1
<b>p</b>		NSZ	<b>0.006 (0.012)*</b>	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Godine</b>						
<b>&lt;58</b>	51	8/35/8	40/11/0	15/23/12	1/11/39	25/17/0/0/7/2
<b>&gt;58</b>	47	10/28/9	37/10/0	15/22/10	1/14/32	22/16/2/1/4/2
<b>p</b>		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Pušenje</b>						
<b>ne</b>	47	9/31/7	34/13/0	17/20/10	0/12/35	21/15/2/0/7/2
<b>bivši</b>	23	3/16/4	20/3/0/	5/13/5	1/7/15	9/10/0/1/2/1
<b>sadašnji</b>	28	6/16/6	23/5/0	9/12/7	1/6/21	17/8/0/0/2/1
<b>p</b>		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Istorija paradontopatija</b>						
<b>ne</b>	64	9/44/11	45/19/0	23/22/19	0/11/53	32/23/1/0/5/3
<b>da</b>	34	9/19/6	32/2/0	8/23/3	2/14/18	15/10/1/1/6/1
<b>p</b>		NSZ	<b>0.006 (0.008)*</b>	<b>0.005</b>	<b>0.003</b>	NSZ
<b>Indeks krvarenja</b>						
<b>0</b>	56	6/38/12	39/17/0	23/17/16	1/8/47	24/23/2/0/5/2
<b>1</b>	33	7/21/5	30/3/0	7/21/5	1/14/18	17/9/0/0/5/2
<b>2</b>	8	4/4/0	7/1/0	1/6/1	0/3/5	5/1/0/1/1/0
<b>3</b>	1	1/0/0	1/0/0	0/1/0	0/0/1	1/0/0/0/0/0
<b>p</b>		<b>0.041</b>	0.098	<b>0.035</b>	NSZ	NSZ
<b>Gingival indeks</b>						
<b>0</b>	30	1/23/6	18/12/0	11/5/14	0/3/27	12/15/1/0/1/1
<b>1</b>	33	6/21/6	26/7/0	12/13/8	1/5/27	15/11/0/0/5/2
<b>2</b>	35	11/19/5	33/2/0	8/27/0	1/17/17	20/7/1/1/5/1
<b>3</b>	0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0/0/0/0
<b>p</b>		0.074	<b>0.004</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.002</b>	NSZ
<b>Dubina džepa</b>						
<b>&lt;3 mm</b>	67	9/46/12	48/19/0	25/22/20	1/12/54	30/26/2/0/7/2
<b>&gt;=3 mm</b>	31	9/17/5	29/2/0	6/23/2	1/13/17	17/7/0/1/4/2
<b>p</b>		NSZ	<b>0.014 (0.016)*</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.029</b>	NSZ

N-ukupna broj pacijenata/kontrola NSZ-nije statistički značajno

\*Rezultat Fisher statističkog testa

#### 4.2.3. Asocijacija proučavanih polimorfizama sa rizikom za razvoj periimplantitisa

U cilju provere postojanja asocijacije genotipova ispitivanih polimorfizama u CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra genima sa rizikom za razvoj periimplantitisa urađena je

logistička regresiona analiza. Kao referentna vrednost je uzet *wild type* genotip za sve proučavane polimorfizme, u odnosu na koji je procenjivan rizik za heterozigotni i mutirani genotip, ali i efekat heterozigotnog i mutiranog genotipa združeno. Na tabeli 12 su prikazani rezultati *crude Odds Ratio* analize. Kada je reč o proučavanom polimorfizmu u CD14 genu, značajno smanjenje rizika za razvoj periimplantitsa je zabeleženo za heterozigotni genotip (OR=0.166, p=0.002), mutirani genotip (OR=0.051, p=0.001), ali i heterozigotni i mutirani genotip združeno u odnosu na *wild type* genotipa (OR=0.137, p=0.001) (Tabela 14).

**Tabela 14.** Asocijacija polimorfizama u CD14, IL6, IL10, TNF, IL1ra genima sa rizikom za razvoj periimplantitisa-*crude Odds Ratio*

Gen/SNP	Genotip	Ispitanici sa periimplantitismom		Ispitanici bez periimplantitisa		Crude OR (95% CI)	p
		N	%	N	%		
CD14 rs2569190	CC	13	38	5	8	1.000	Ref.
	CT	19	56	44	69	0.166 (0.052-0.532)	<b>0.002</b>
	TT	2	6	15	23	0.051 (0.008-0.310)	<b>0.001</b>
	CT+TT*	21	62	59	92	0.137 (0.044-0.430)	<b>0.001</b>
IL6 rs1800795	GG	34	100	43	67	1.000	Ref.
	GC	0	0	21	33	NR	NR
	CC	0	0	0	0	NR	NR
	GC+CC*	0	0	21	33	NR	NR
IL10 rs1800896	AA	6	18	25	39	1.000	Ref.
	AG	28	82	17	27	6.863 (2.342-20.121)	<b>&lt;0.0001</b>
	GG	0	0	22	34	NR	NR
	AG+GG*	28	82	39	61	2.991 (1.084-8.252)	<b>0.034</b>
TNF $\alpha$ rs1800629	AA	1	3	1	2	1.000	Ref.
	AG	18	53	7	11	2.571 (0.141-47.017)	0.524
	GG	15	44	56	87	0.268 (0.016-4.538)	0.362
	AG+GG*	33	97	63	98	0.524 (0.032-8.645)	0.651
IL1RA	A1A1	25	39	22	64	1.000	Ref.
	A1A2	28	44	5	15	0.203 (0.067-0.616)	<b>0.005</b>
	A1A3	1	1	1	3	1.136 (0.067-19.264)	0.929
	A1A4	0	0	1	3	NR	NR
	A2A2	7	11	4	12	0.649 (0.167-2.519)	0.532
	A2A3	3	5	1	3	0.379 (0.037-3.911)	0.415

N-ukupan broj ispitanika; OR-Odds Ratio; NR-nije računato 95%;  
CI-95% Interval poverenja p#<0.05 su predstavljene zatamnjeno  
<sup>a</sup>Heterozigotni i mutirani genotip združeno *versus wild type* genotip

Imajući u vidu da za proučavani polimorfizam u IL6 genu nije zabeleženo prisustvo heterozigotnog niti mutiranog genotipa u grupi ispitanika sa periimplantitsom, nismo računali *crude Odds Ratio* za taj polimorfizam (Tabela 14).

Heterozigotni AG genotip rs1800896 polimorfizma u IL10 genu je bio povezan sa značajno povišenim rizikom za razvoj periimplantitisa u odnosu na *wild type* genotip (OR= 6.863,  $p < 0.0001$ ) (Tabela 15). Isti trend povišenog rizika je zabeležen i u slučaju združenog heterozigotnog i mutiranog genotipa u poređenju sa *wild type* genotipom (OR=2.991,  $p=0.034$ ).

A1A2 genotip proučavanog polimorfizma u IL1ra genu je bio asociran sa 0.203 puta nižim rizikom za razvoj periimplantitisa u odnosu na A1A1 genotip (OR=0.203,  $p=0.005$ ) (Tabela 14)

Rezultati *adjusted Odds Ratio* analize su predstavljeni na tabeli 15. *Adjustment* je rađen prema godinama i polu. Značajno sniženje rizika za razvoj periimplantitisa je uočeno u slučaju heterozigotnog, mutiranog, kao i združenih heterozigotnih i mutiranih genotipova u poređenju sa *wild type* genotipom (OR=0.145,  $p=0.003$ ; OR=0.045,  $p=0.001$ ; OR=0.124,  $p=0.001$ , redom).

Za proučavani polimorfizam u IL6 genu nije računat *adjusted Odds Ratio* s obzirom da nije zabeleženo prisustvo heterozigotnog niti mutiranog genotipa u grupi ispitanika sa periimplantitsom (Tabela 14).

Heterozigotni AG genotip rs1800896 polimorfizma u IL10 genu je bio povezan sa značajno povišenim rizikom za razvoj periimplantitisa u odnosu na *wild type* genotip (OR= 8.406,  $p < 0.0001$ ) (Tabela 15). U slučaju združenog heterozigotnog i mutiranog genotipa u poređenju sa *wild type* genotipom zabeležen je takođe povišen rizik za razvoj periimplantitisa (OR=3.035,  $p=0.039$ ).

Kod proučavanog polimorfizma u IL1ra genu A1A2 genotip je bio asociran sa 0.218 puta nižim rizikom za razvoj periimplantitisa u odnosu na A1A1 genotip, (OR=0.218,  $p=0.011$ ) (Tabela 15).



**Tabela 15** Asocijacija polimorfizama u CD14, IL6, IL10, TNF, IL1ra genima sa rizikom za razvoj periimplantitisa-*adjusted Odds Ratio*

Gen/SNP	Genotip	Ispitanici sa periimplantitisom		Ispitanici bez periimplantitisa		Adjusted OR (95% CI)	p
		N	%	N	%		
	CC	13	38	5	8	1.000	Ref.
<b>CD-14</b>	CT	19	56	44	69	0.145 (0.041-0.509)	<b>0.003</b>
<b>rs2569190</b>	TT	2	6	15	23	0.045 (0.007-0.300)	<b>0.001</b>
	CT+TT	21	62	59	92	0.124 (0.037-0.414)	<b>0.001</b>
	GG	34	100	43	67	1.000	Ref.
<b>IL-6</b>	GC	0	0	21	33	NR	NR
<b>rs1800795</b>	CC	0	0	0	0	NR	NR
	GC+CC	0	0	21	33	NR	NR
	AA	6	18	25	39	1.000	Ref.
<b>IL-10</b>	AG	28	82	17	27	8.406 (2.528-27.953)	<b>0.001</b>
<b>rs1800896</b>	GG	0	0	22	34	NR	NR
	AG+GG	28	82	39	61	3.035 (1.060-8.686)	<b>0.039</b>
	AA	1	3	1	2	1.000	Ref.
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	AG	18	53	7	11	6.413 (0.225-182.987)	0.277
<b>rs1800629</b>	GG	15	44	56	87	0.326 (0.017-6.184)	0.455
	AG+GG	33	97	63	98	0.653 (0.034-12.539)	0.777
	A1A1	25	39	22	64	1.000	Ref.
	A1A2	28	44	5	15	0.218 (0.068-0.701)	<b>0.011</b>
<b>IL-1RA</b>	A1A3	1	1	1	3	1.118 (0.058-21.370)	0.941
<b>rs</b>	A1A4	0	0	1	3	NR	NR
	A2A2	7	11	4	12	0.802 (0.190-3.385)	0.764
	A2A3	3	5	1	3	0.411 (0.036-4.697)	0.473

N-ukupan broj pacijenata/kontrola; OR-Odds Ratio; NR-nije računato  
95% CI-95% Interval poverenja

\**Adjustment* prema polu i godinama

p<sup>#</sup><0.05 su predstavljene zatamnjeno

<sup>a</sup> Heterozigotni i mutirani genotip združeno *versus wild type* genotip

U tabeli 16. su prikazani rezultati univarijantne Hazard Ratio analize rađene Cox proporcionalnom hazard regresionom analizom sa 95% intervalom poverenja. Analizirane varijable su testirane pojedinačno u analizi koja ima za cilj da pokaže koje od varijabli su asocirane sa pojavom periimplantitisa i koje se praktično mogu smatrati prediktivnim faktorima. Samo varijable koje su u univarijantnoj analizi bile statistički značajne, unose se u multivarijantnu analizu (Tabela 17), u cilju identifikacije varijabli se mogu koristiti kao nezavisni faktori za predikciju nastanka periimplantitisa.

**Tabela 16.** Univarijantna Cox regresiona Hazard ratio analiza pojedinačnih varijabli koje utiču na pojavu periimplantitisa

Varijable	HR	95% CI		p
Pol	0.200	0.067	0.595	<b>0.004</b>
Godine	0.715	0.358	1.429	0.343
Pušenje	0.824	0.545	1.245	0.358
Učestalost paradontopatija	1.212	0.569	2.584	0.618
Indeks krvarenja	1.642	1.030	2.619	<b>0.037</b>
Gingivalni indeks	6.534	2.192	19.473	<b>0.001</b>
Dubina džepa	2.618	1.251	5.478	<b>0.011</b>
CD14 rs2569190	0.533	0.283	1.006	0.052
IL1-ra	1.050	0.857	1.286	0.638
IL-10 rs1800896	0.820	0.450	1.497	0.519
IL-6 rs1800795	0.038	0.000	3.554	0.158
TNF $\alpha$ rs1800629	0.666	0.354	1.252	0.207

**Tabela 17.** Multivarijantna analiza pojedinačnih varijabli koje utiču na pojavu periimplantitisa

	Varijable	HR	95% CI		p
Step 1	Pol	0.246	0.082	0.743	<b>0.013</b>
	Indeks krvarenja	0.984	0.558	1.737	0.957
	Gingivalni indeks	5.561	1.769	17.488	<b>0.003</b>
	Dubina džepa	1.367	0.617	3.027	0.442
Step 2	Pol	0.248	0.084	0.730	<b>0.011</b>
	Gingivalni indeks	5.549	1.770	17.391	<b>0.003</b>
	Dubina džepa	1.358	0.636	2.899	0.430
Step 3	Pol	0.248	0.084	0.732	<b>0.012</b>
	Gingivalni indeks	6.278	2.078	18.966	<b>0.001</b>

Za multivarijantnu analizu je primenjen forward-stepwise model koji uklanja varijable sa p vrednošću manjom od 0.1. Samo varijable koje su u univarijantnoj analizi bile statistički značajne su analizirane u multivarijantnoj analizi. Rezultati su prikazani po „stepovima“, primenom logike eliminacije „najslabije karike“, tako da u finalnom modelu (step 3) ostaju varijable koje su statistički značajne i mogu se smatrati nezavisnim prediktivnim faktorima za nastanak periimplantitisa. U našem slučaju, pol i gingivalni indeks su se pokazali kao kao statistički značajni faktori rizika za nastanak periimplantitisa.

#### **4.2.4. Povezanost polimorfizama gena za citokine IL6, IL10 i TNF $\alpha$ sa lokalnom produkcijom citokina**

Povezanost između polimorfizama gena za citokine i koncentracije ispitivanih citokina odredili smo samo za TNF $\alpha$ , IL6 i IL10, za koje je prethodno pokazano postojanje statistički značajne razlike u učestalosti genotipova ispitivanih polimorfizmama između grupa pacijenata sa i bez periimplantitisa. Lokalna produkcija IL1ra i CD14 nije merena.

Tabelama 18, 19 i 20 su prikazani rezultati Kruskal-Wallisovog testa kojim se utvrđuje postojanje razlika između medijane koncentracije citokina u zavisnosti od genotipa ispitivanih polimorfizama IL6, IL10 i TNF $\alpha$  gena.

Kada se posmatra celokupna studijska grupa, koja uključuje pacijente sa i bez periimplantitisa (N=98) (Tabela 18), uočava se nepostojanje statistički značajne razlike između medijana koncentracije sva tri ispitivana citokina u zavisnosti od genotipa analiziranih polimorfizama.

**Tabela 18.** Medijana koncentracije citokina u zavisnosti od genotipa polimorfizama IL6, IL10 i TNF $\alpha$  gena u celokupnoj studijskoj grupi koja uključuje pacijente sa i bez periimplantitisa

Gen/SNP	Genotip	N	Medijana koncentracije citokina	p
IL6 rs1800795	GG	77	48.83	0.655
	GC	21	51.95	
IL10 rs1800896	AA	31	48.16	0.934
	AG	45	49.68	
	GG	22	51.02	
TNF $\alpha$	AA	2	66.75	0.181
	AG	25	41.16	
	GG	71	51.95	

N-ukupan broj ispitanika

Medijana koncentracije citokina u zavisnosti od genotipova ispitivanih polimorfizama IL6, IL10 i TNF $\alpha$  gena u grupi pacijenata sa periimplantitisom (N=34) je prikazana u tabeli 19. Ni u jednom slučaju nije uočeno postojanje značajne razlike u koncentraciji citokina u zavisnosti od genotipa (Tabela 19).

**Tabela 19.** Medijana koncentracije citokina u zavisnosti od genotipa polimorfizama IL6, IL10 i TNF $\alpha$  gena u grupi pacijenata sa periimplantitisom

Gen/SNP	Genotip	N	Medijana koncentracije citokina	p
IL6 rs1800795	GG wt	34	20,02	NR
	GC het	0	0.00	
IL10 rs1800896	AA wt	6	17.92	0.909
	AG het	28	17.41	
TNF $\alpha$	AA wt	1	19.00	0.522
	AG het	18	15.67	
	GG mut	15	19.60	

N-ukupan broj ispitanika; NR-nije računato

Medijana koncentracije citokina u zavisnosti od genotipova ispitivanih polimorfizama IL6, IL10 i TNF $\alpha$  gena u grupi pacijenata bez periimplantitisa (N=64) je prikazana u tabeli 20.

**Tabela 20.** Medijana koncentracije citokina u zavisnosti od genotipa polimorfizama IL6, IL10 i TNF $\alpha$  gena u grupi pacijenata bez periimplantitisa

Gen/SNP	Genotip	N	Medijana koncentracije citokina	p
IL6 rs1800795	GG wt	43	31.21	0.426
	GC het	21	35.14	
IL10 rs1800896	AA wt	25	32.06	0.844
	AG het	17	30.91	
	GG mut	22	34.23	
TNF $\alpha$	AA wt	1	51.00	0.094
	AG het	7	19.43	
	GG mut	56	33.80	

N-ukupan broj ispitanika

## **5. DISKUSIJA**

## **5.1 Imunski odgovor u periimplantitisu**

### **5.1.1 Lokalni imunski odgovor u periimplantitisu**

Periimplantitis pripada grupi kasnih komplikacija dentalnih implantata koji mogu uticati na njegovu stabilnost i održanje a često kao posledicu može imati i sam gubitak implantata (Zitzmann i sar., 2008). Najčešće opisani faktori rizika koji su udruženi sa pojavom periimplantitisa uključuju prethodnu parodontalnu infekciju, bruksizam, pušenje, sistemske bolesti i druge lokalne i sistemske faktore (Tales i sar., 2008).

Glavni etiološki faktori koji dovode do periimplantitisa su infekcija i biomehanički faktori pri čemu je patogenetski mehanizam zajednički, zasnovan na inflamatornoj osteoklastogenezi. Inflamatorna osteoklastogeneza podrazumeva sazrevanje nezrelih i aktivaciju zrelih osteoklasta do kojih dolazi usled dostizanja kritične koncentracije proinflamatornih medijatora (Collin-Osdoby i sar., 2011). Pretpostavka je da postoji individualni intenzitet imunskog odgovora u odgovoru domaćina na ulazak patogena što dovodi do prekomerne produkcije i visokih koncentracija proinflamatornih citokina. Kao jedno od objašnjenja navodi se potencijalno prisustvo polimorfizma gena citokine koji preko povećane transkripcione aktivnosti gena za citokine dovodi posledično do povećane biosinteze ovih proinflamatornih citokina. Periimplantatne lezije su histopatološki karakterisane kao agresivne lezije što ukazuje na značaj pravovremene dijagnoze u cilju identifikovanja biohemijskih markera periimplantitisa radi uspešnog ishoda terapije (Gualini i sar., 2003).

U tim istraživanjima su ispitivani nivoi biohemijskih medijatora kao što su citokini, enzimi i drugi regulatori inflamatorne osteoklastogeneze koji su sekretovani u periimplantatnoj tečnosti (PICF) (Monov i sar., 2006; Arikan i sar., 2008; Duarte i sar., 2009; Petković i sar., 2010; Rakić i sar., 2013).

Poslednjih godina mnogobrojna otkrića ukazala su na značaj razumevanja etiopatogeneze periimplantitisa. Intenzivirano je izučavanje korelacije markera inflamacije sa kliničkim parametrima koji determinišu stanje implantata i periimplantatnog tkiva. Inicijalni urođeni odgovor domaćina predstavlja reakciju na prisustvo patogena i obuhvata prepoznavanje mikrobioloških komponenata lipopolisaharida (LPS) i produkciju inflamatornih medijatora kao što su citokini (Garlet, 2010), hemokini (Silva i sar., 2007), matriksne metaloproteinaze (MMPs)

(Garlet i sar.,2006). Kao segment adaptivnog imunskog odgovora bakterije dovode do polarizacije i aktivacije antigen specifičnih limfocita i migraciju drugih inflamatornih ćelija ka periimplantatnom tkivu (Cutler i sar., 2004). Ovi odgovori iako direktno usmereni protiv bakterija posreduju u destrukciji vezivnog i mineralizovanog tkiva utičući na destrukciju koštanog tkiva. Važna karakteristika ovog odgovora domaćina je konstantno oslobađanje inflamatornih medijatora, hemokina i citokina (Silva i sar., 2007, Garlet i sar., 2010, Javed i sar 2011).

Takođe, pokazano je da iako se smatra da su površine titanijumskih dentalnih implantata bioinertne ili biokompatibilne, prisustvo ovakve površine uzrokuje povećani nivo proinflamatornih citokina (IL1 $\beta$ , TGF $\beta$  I TNF $\alpha$ ) u odnosu na prirodnu denticiju (Nowzari i sar., 2010).

U ovom istraživanju koje je obuhvatalo 98 ispitanika sa ugrađenim dentalnim implantatima određivana je lokalna produkcija citokina (INF $\gamma$ , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) u uzorcima tečnosti periimplantatnog sulkusa u grupi ispitanika sa i bez periimplantitisa. Vrednosti citokina određene su u uzorcima periimplantatne tečnosti (PICF) 64 pacijenta bez znakova perimplantitisa i u PICF 34 bolesnika sa manifestnim perimplantitisom. Kod ispitanika su praćeni i beleženi klinički parametri prisustva ili odsustva zapaljenja oko implantata: plak indeks (PI), gingivalni indeks (GI), indeks krvarenja (BOP), dubina periimplantatnog džepa (DPIS).

Rezultati naših ispitivanja su pokazali da postoje različiti profili lokalno produkovanih medijatora kod ispitanika bez znakova perimplantitisa i kod ispitanika sa manifestnim perimplantitisom. Poređenje koncentracija citokina u PICF ispitanika sa manifestnim periimplantitisom pokazalo je da su prosečne vrednosti IL8 i IL5 bile statistički značajno veće u odnosu na vrednosti u uzorcima ispitanika bez periimplantitisa, dok su vrednosti IL2 i IL1 $\beta$  bile uvećane ali bez statističke značajnosti. Od toga, prosečne vrednosti jedinog određivanog hemokina, IL8 bile su skoro 30 puta veće od vrednosti detektovanih u grupi ispitanika bez periimplantitisa (MW test, p=0.0000). Objašnjenje povećane koncentracije IL8 leži u činjenici da je IL8 hemokin koji indukuje osteoklastnu diferencijaciju i aktivnost, i čije su vrednosti povećane u inflamaciji (Bendre i sar., 2003; Darveau i sar., 2010).



IL5 pripada Th2 grupi citokina i nije do sada proučavan u PICF. Ima značajnu biološku funkciju u rastu i diferencijaciji eozinofila pa samim tim može potencijalno biti jedan od markera stepena inflamacije u usnoj duplji. Queiroz i saradnici 2008 godine su pokazali da povoljan odnos između povećanih nivoa u IFN $\gamma$  i IL5 predstavljaju odgovor imunskog sistema organizma na infekciju u usnoj duplji. U našem istraživanju prosečne vrednosti IFN $\gamma$  kao i TNF $\alpha$  i TNF $\beta$  nisu se značajno razlikovale. Za razliku od grupe ispitanika sa periimplantitisom, u grupi ispitanika bez periimplantitisa dolazi do porasta prosečne vrednosti koncentracije antiinflamatornog IL10, kao i IL4 i IL6. IL10 stimuliše osteoprotežerin (OPG) pospešujući destrukciju i najčešće je povećan u inflamaciji (Pestka i sar., 2004).

U klinički zdravim uslovima postoji kontinuitet ekspresije citokina, hemokina i ćelijski adhezivnih molekula shodno bazalnom nivou inflamacije što se smatra važnim za uspostavljanje protektivnog odgovora domaćina protiv bakterijskih infekcija. Povećanje koncentracije proinflamatornih citokina ukazivale su na razvitak i širenje inflamacije, gubitak kosti ili neuspeh implantata (Campos i sar, 2005, Schierano i sar, 2008). IL1 $\beta$  indukuje ćelijsku migraciju zapaljenskih celija i koštanu resorpciju i njegove vrednosti su povećane u hroničnoj inflamaciji (Bloemen i sar., 2010). U zdravom tkivu oko implantata dolazi do uskladjene ekspresije E-selektina, intraćelijskih adhezivnih molekula (ICAMs) i interleukina 8 (IL8), koji olakšava tranziciju neutrofila kroz tkivo i formiraju zid između tkiva domaćina i biofilma od dentalnog plaka (Tonneti i sar., 1998; Darveau i sar., 2010).

Prvi rezultati istraživanja inflamacije oko implantata ukazali su na značaj citokinskog profila u periimplantatnom tkivu. Panagakos i sar., 1996 godine su uočili da povećani nivoi IL1 $\alpha$  i IL1 $\beta$  su povezani sa periimplantitisom a do sličnih zaključaka su došli i Abououssef i sar., 1998. Proučavajući imunski odgovor u usnoj duplji Salcetti i saradnici, 1997. godine su ustanovili da je imunski odgovor na oralnu mikrofloru i lokalne traume u fiziološkim uslovima protektivan, ali u određenim uslovima i sam može uticati na napredak bolesti neadekvatnom produkcijom proinflamatornih citokina, prevashodno TNF $\alpha$  i IL1 $\beta$  koji stimulišu resorpciju kosti i proliferaciju fibroblasta.

Jovanović i sar., 1998 su našli povećan nivo PGE2 i IL1 $\beta$  povezan sa progresijom bolesti oko implantata, dok su u uslovima periimplantitisa vrednosti IL1 $\beta$  trostruko

uvećane. Zasnivano na višestruko potvrđenoj korelaciji povećanih nivoa IL1 kako sa periimplantitisom i progresijom bolesti, tako i sa zdravim periimplantnim tkivima, ispitivani su polimorfizmi gena koji kodiraju IL1 i IL1ra kod pacijenata sa ugrađenim dentalnim implantatima. Istraživanja su pokazala da je IL1ra udružen sa periimplantitisom (Laine i sar., 2006).

Curtis i saradnici 1997 godine su nakon svojih opsežnih istraživanja došli do zaključka da merenje IL1 $\beta$  kao lokalnog parametra imunske reaktivnosti može biti važan dodatak kliničkim parametrima u dijagnozi periimplantitisa. Vrednosti nivoa su bile u proseku trostruko uvećane u odnosu na početni stadijum. Pokazano je i da IL1 $\beta$  i TNF $\alpha$  imaju značajnu ulogu u inflamatornom procesu koji se odvija u periimplantatnom tkivu (Duarte i sar 2009, Schierano i sar, 2008). U periimplantatnom tkivu se javlja povećani nivo proinflamatornih citokina i hemokina u korelaciji sa većim vrednostima merenih kliničkih parametara (Petkovic i sar.,2010).

Grupa istraživača Panagacos i sar, 1996 su našli da TNF $\alpha$  ne korelira sa oboljenjem oko implantata, za razliku od rezultata prikazanih u radovima Ataoglu i sar., 2002 gde je pokazano da su nivoi TNF $\alpha$  u PICF niži u odnosu na nivoe IL1 $\beta$  i nisu u konstantnoj korelaciji sa kliničkim parametrima.

Murata i sar 2002 su izmerili veće vrednosti IL1 $\beta$  koncentracije u periimplantatnim lezijama u poređenju sa vrednostima u regijama sa mukozitisom i zdravim implantatima, a pri tome nije nađena razlika između zdravih implantata i zdravih zuba. Time su istakli važnost IL1 $\beta$  u stimulaciji koštane resorpcije.

Sa ciljem da se prati profil lokalno produkovanih medijatora imunske reakcije u našem istraživanju određena je koncentracija ključnih Th1 citokina (IL2, IFN $\gamma$ ), Th2 citokina (IL4, IL5,IL6,IL10), proinflamatornih citokina IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$  i jednog predstavnika hemokina IL8. Rezultati su pokazali da postoje različiti profili lokalno produkovanih medijatora kod ispitanika sa i bez periimplantitisa a da u literaturi ne postoje studije koje su na ovakav način ispitivale celokupan citokinski profil sa ovakvim dizajnom studije.

Ustanovljeno je da titan u dentalnim implantatima olakšava imunski odgovor i rezultuje oslobađanjem proinflamatornih citokina koji utiču na remodelaciju kosti (Hofsetter 2002) Povećani nivoi IL1,IL8 rezultat su aktivacije inflamatornog procesa

koji se odvija u periimplantatnom tkivu. IL8 pospešuje proinflamatorne funkcije, dok IL10 ima antiinflamatorne funkcije i detektovan je kod ispitanika sa periimplantatnim lezijama (Schierano i sar 2008), ali ne i u salivi zdravih osoba (Liskman i sar 2004).

U studiji Cosgarea i sar. iz 2012 god. ispitivani su nivoi IL1 $\beta$ , IL8, i IL10 u blizini zuba i implantata tokom rane faze zarastanja kod ispitanika sa prethodnom istorijom parodontopatije. Statistički značajne razlike između zdravih i obolelih mesta zuba i implantata zabeležene su jedino za IL1 $\beta$  i IL10. Slični rezultati dobijeni su kod PICF zdravih i obolelih tkiva implantata (Hultin i sar., 2002; Lachmann i sar., 2007). Za razliku od njih Melo i sar., 2011 su ustanovili sličnost imunskog odgovora kod zdravih zuba i implantata koju su tumačili kao refleksiju hronične infekcije i dobili su približne vrednosti koncentracija IL1 $\beta$ .

Liskman i sar., 2004 su pokazali povećanu koncentraciju IL10 kod ispitanika sa periimplantitisom. Povišeni nivoi IL10 u PICF oko implantata u odnosu na zdrav parodontijum ukazuju na imunosupresivnu reakciju tkiva oko implantata u ranim fazama zarastanja, dok za razliku od toga nije nađena značajna razlika između vrednosti oko obolelog i zdravog implantata. Serino i sar., 2009 su takođe pokazali da nema značajne razlike u vrednostima IL10 obolelih i zdravih mesta. Nekoliko studija je pokazalo povećane nivoe proinflamatornih citokina i niske nivoe antiinflamatornih citokina u PICF ispitanika sa znacima periimplantitisa (Liskmann i sar 2004; Lachmann i sar, 2007; Murata i sar 2002; Duarte 2009, Serino i sar., 2009).

Pojedine studije su ukazale na povećanje IL6, IL8, IL10 i IL12 u periimplantitisu ukazujući na njihov značaj u destrukciji periimplantatnog tkiva (Schierano i sar., 2008, Konttinen i sar., 2006)

Na značaj citokina IL6, IL8 i IL12 u indukciji koštane resorpcije ukazala je grupa istraživača na čelu sa Liskmanom 2004 godine. Pokazano je da povećani nivoi ovih citokina u PICF mogu ukazati na destrukciju periimplantatnog tkiva. IL10 je označen kao marker periimplantanih oboljenja koji pospešuje antiinflamatorni efekat. Kasnije su još pojedine grupe istraživača ukazale na mogućnost upotrebe pojedinih citokina kao markera tkivne destrukcije (Konttinen i sar 2006). Prethodne grupe autora pokazala su da ne postoji veza između IL6 i IL10 nivoa ukazujući na njihov značaj samo u ranim fazama gubitka implantata (Schierano, 2000). Za IL10 je pokazano da suprimira inflamatorni odgovor i da inhibira koštanu resorpciju in vitro (Wang i

sar.2008) i in vivo (Sasaki i sar 2004). Konttinen i sar 2006 godine su zabeležili statistički značajno veće nivoe IL6 kod ispitanika sa periimplantitisom u odnosu na zdrave. Mengel i sar., 1996 su poredeći nivoe IL1 $\beta$  i IL6 kod ispitanika sa dentalnim implantatima koji su imali prethodnu istoriju parodontopatije ustanovili uticaj toga na vrednosti nivoa citokina. Sve se ovo razlikuje u odnosu na prvobitne rezultate Salcetti i sar. 1997 gde nije nađena statistički značajna razlika u nivou IL6 kod odbačenih dentalnih implantata u odnosu na stabilne. Na tu različitost rezultata ukazala su i istraživanja Duarta i sar. 2009 koji nisu uočili razlike između nivoa citokina sa zdravih u odnosu na inflamirana mesta periimplantatnog tkiva. Ali kada su u poređenja uključili i vrednosti kliničkih parametara akumulacija dentalnog plaka, dubina džepa, spontano krvarenje na provokaciju, prisustvo gnoja i povećana dubina periimplantatnog džepa, vrednosti IL12 su povećane u odmakloj fazi periimplantitisa. Ovi autori su smatrali da je IL12 ključni marker destrukcije tkiva.

U in vitro studiji Bordina i sar 2009 godine nađeno je da fibroblasti ispitanika sa periimplantitisom i parodontopatijom sintetišu više IL6 i IL8 i imaju naglašeniji proinflamatorni profil.

Schierano i sar., 2000-te godine su 4 meseca nakon stavljanja protetskog rada zabeležili značajno povećanje u nivoima IL10 u PICF što ukazuje na važnost ovog citokina u kasnijoj regulaciji perimukozalne implantatne inflamacije.

Osam meseci nakon stavljanja protetskog rada Schierano i sar. 2000 su zabeležili smanjenje IL6, IL8 i IL10, što reflektuje uticaj ovih citokina na oseointegraciju i smanjenu koštanu resorpciju.

Sva istraživanja su ukazivala na važnost detekcije ovih markera radi pravovremene dijagnoze periimplantitisa i primeni adekvatne terapije u različitim fazama progresije.

### **5.1.2. Analiza lokalnog imunskog odgovora shodno tipu implantata**

Citokini su važni medijatori fizioloških i patoloških procesa u periimplantatnom tkivu. Kontinuirana, dinamička ravnoteža između domaćinskog lokalnog imunskog odgovora i potencijalnih subgingivalnih patogena utiče na procese kako u mekim tkivima, tako i na metabolizam vezivnog i koštanog tkiva. Površine oralnog

implantata, njihov fizički i hemijski sastav značajno utiču na lokalni metabolizam periimplantnih tkiva i smatraju se ključnim elementom reakcije između implantata i tkiva (Newman i sar., 2007 ). Titanijum je opšte usvojen kao visoko biokompatibilni materijal za izradu implantata i samim tim je materijal izbora. Međutim, površina implantata se namenski menja u procesu proizvodnje različitim aditivnim i subtraktivnim procesima u cilju povećanja prijemčivosti koštanom tkivu odnosno oseokonduktivnosti. Svaka od ovih modifikacija ima različiti uticaj na lokalni imunski odgovor.

Rezultati naših ispitivanja pokazali su da postoje različiti profili lokalno produkovanih medijatora kod ispitanika kod kojih su ugrađeni implantati različitih proizvođača. Poređenje koncentracija citokina u PICF ispitanika bez manifestnog implantitisa pokazalo je da su prosečne vrednosti IL2, IL8 i IL5 veće u uzorcima ispitanika sa tipom 1 implantata, dok su prosečne vrednosti IL10, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  i TNF $\beta$  bile veće u PCIF ispitanika sa tipom 2 implantata. Prosečne vrednosti IL4 i IL6 nisu se značajno razlikovale. Vrednosti IFN $\gamma$  su u obe grupe ispitanika bile izjednačene, na donjoj granici detektabilnosti metode. Nastanak klinički manifestne upale u perimplantnom tkivu, dodatno je izmenio profile lokalno produkovanih medijatora. U grupi ispitanika kod kojih je ugrađen tip 1 implantata detektovane su visoke prosečne vrednosti IL8, IL5, TNF $\beta$  ali i IL10, dok su se u grupi ispitanika sa tipom 2 implantata detektovane visoke prosečne vrednosti IL4. Interesantno je da je u obe grupe nastanak perimplantitisa povezan sa porastom koncentracije proinflamatornog IL1 $\beta$ , ali da u grupi sa 1 implantatima dolazi do porasta IL8 dok se u grupi sa 2 implantatima koncentracija IL8 smanjuje. Opet, u grupi ispitanika sa implantatima tipa 1, nastanak perimplantitisa povezan je sa porastom prosečne koncentracije antiinflamatornog IL10, dok je u grupi ispitanika sa tipom 2 implantata nastanak periimplantitisa praćen sniženjem prosečne koncentracije IL10.

Rezultati in vitro studija pokazali su da fizička modifikacija glatkoće implantata ispoljava značajno drugačije uticaje na aktivaciju humanih trombocita, odnosno na produkciju različitih koncentracija faktora trombocit (PDGF) i vaskularno endotelnog faktora (VEGF) u zavisnosti od načina obrade površine implantata (Kammerer i sar., 2012). Istraživanja na životinjskom modelu pokazala su da intramuskularna implantacija titanijumskih pločica sa različitim polimerizatima indukuje različite

profile serumskih citokina (Walschus i sar., 2012). Ugradnja titanijumskih dentalnih implantata različite završne obrade životinjama rezultovalo je različitim promenama u perimplantnom mekom tkivu, kosti i broju i rasporedu inflamatornih lezija (Alboj i sar., 2011). Konačno, početni rezultati studija sprovedenih na ljudima, pokazali su najmanju lokalnu produkciju IL6 i TNF $\alpha$  kod implantacije titanijum nobijum oksinitritom modifikovanim plazma hemijskim tretmanom, u odnosu na titanijum tantalum ili tantalum (Nickenig i sar., 2012).

Varijacije mikro i makro dizajna implantata ili njegovih komponenti koje proizvođači čine zbog povećanja prijemčivosti tkivu, takođe menjaju lokalni metabolizam (Albouy i sar., 2012), a samim tim i profil biomarkera. Ove različite površine menjaju odgovor tkiva na nivou RANK/RANKL/OPG sistema, koji reguliše metaboličku aktivnost vezivnog tkiva i kostiju (Mamalis i sar., 2011). Istraživanja su pokazala da intenzivne fizičke sile, odnosno trauma, utiču na RANK/RANKL/OPG sistem (Nakao i sar., 2007; Nozaki i sar., 2010). Uzimajući u obzir ankilotičnu vezu implantata za kosti i time veću osetljivost na dejstvu sila, i jake biomehaničke sile kao etiološki faktor periimplantitisa, ovaj mehanizam bi mogao da objasni drugačiji lokalni imunski odgovor, uzrokovan drugačijim mikrostrukturama implantata.

Svi ovi faktori doprinose intezivnom i drugačijem odgovoru periimplantatnih tkiva u odnosu na parodontalna tkiva. Nowzari sa saradnicima 2010 je pokazao da je koncentracija proinflamatornih citokina značajno veća u sulkusnoj tečnosti (PICF) zdravih periimplantatnih tkiva u odnosu na gingivalnu tečnost (GCF) parodontološki zdravih zuba.

Različita površina implantata može da direktno modifikuje aktivnost lokalnih ćelija imunog sistema. Hemijska modifikacija površine implantata može direktno da ispoljava uticaje na lokalne imunske ćelije. *In vitro* inkubacija humanih makrofaga na različito obrađene površine pokazala je značajne varijacije u adherenciji, proliferaciji i produkciji IL1, TNF $\alpha$  i CCL2, ukazujući da određene *Ti* površine mogu da indukuju smanjenje lokalnog inflamatornog odgovora, odnosno, da mogu pospešiti procese zarašćivanja (Hamlet i sar., 2012). Titanijumski substrati koji se koriste u implantatima, različite završne obrade (pretretirani, peskirani i nagriženi kiselinom), sa različitim stepenom glatkoće površine, uzrokovali su biološki različite *in vitro* odgovore dendritičnih ćelija. Naime, modifikovana izmena površine indukovala je

nezreli fenotip DĆ (iDĆ), dominantno antiinflamatornog fenotipa i produkcije citokina koji inhibiraju upalu, dok su drugi procesi obrade *Ti* indukovali nastanak zrelih DĆ (mDĆ), koje su stimulatorne i predstavljaju lokalne pokretače upale (Kou i sar., 2011).

### **5.1.3. Lokalni imunski odgovor i plak indeks**

Periimplantatna tečnost (PICF) sadrži potencijalne biohemijske markere koji potiču, ne samo od tkiva domaćina i seruma, već i od subgingivalnog dentalnog plaka (Lang i sar., 1993). Dentalni plak je mikrobiološki ekosistem ili biofilm sastavljen od gusto pakovanih mikrobioloških struktura od nerastvorljivih salivarnih glikoproteina, mikrobioloških intraćelijskih produkata do epitelnih ćelija i debris sklopljenih u organizovani kompleks intraćelijskog matriksa (Costerton i sar., 1994). Mikrobiološki biofilm se stvara na inertnoj površini biomaterijala u vlažnoj sredini. Eksperimentalne studije su omogućile dokaze o formiranju i razvoju mikrobiološkog biofilma što predstavlja važan etiološki faktor u razvoju periimplantitisa (Mombelli i sar 2008). Usled prisutnog klinički detektabilnog plaka javljaju se i neke specifične mikrobiološke karakteristike biofilma oko implantata. Grupa autora je definisala parametre za ispitivanje akumulacije plaka oko dentalnih implantata (Lindquist i sar 1997).

Bakterije kao egzogeni konstituenti plaka, svojom brojnošću, raznovrsnošću i metaboličkom aktivnošću uslovljavaju varijacije u sadržaju hemijskih elemenata, jonskom sastavu, vrednosti pH dentalnog plaka, sadržaju toksina i dr. Njih u jednu celinu povezuje proteinski deo plakovnog matriksa. Zahvaljujući ovim svojstvima dentalni plak predstavlja svojevrsnu koloniju sa potencijalima i za ispoljavanje štetnog dejstva. Dentalni plak indukuje inflamaciju potpornih tkiva zuba ili implantata. Kod zdravih osoba, imunski sistem obezbeđuje dobru regulisanu specifičnu odbranu od infiltracije štetnim produktima bakterija dentalnog plaka. Mehanizmi destrukcije tkiva podrazumevaju neposredno dejstvo štetnih produkata bakterija plaka, oštećenja izazvana polimorfonuklearnim leukocitima, oštećenja posredovana komplementom, kao i ona izazvana antitelima alternativnim putem aktivacije i oštećenja prouzrokovana posredstvom odbrambenih ćelija. Inflamatorni agensi iz bakterija i imunopatološke reakcije domaćina dovode do nastanka parodontopatije, kao i periimplantitisa.

Plak indeks je indeks koji je klinički i indirektni pokazatelj infekcije i praktično pokazuje uticaj i intezitet stimulacije lipopolisaharida (LPS). Vrednosti plak indeksa koje su povećane mogu da ukažu na veću inflamaciju s obzirom da dentalni plak ispoljava svoj efekat i na imunski sistem organizma domaćina. Konstituenti plaka, pre svega oni bakterijskog porekla mogu stimulisati proliferativni odgovor limfocita pri čemu plak deluje kao endogeni adjuvans koji pojačava dejstvo T i B limfocita.

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je odsustvo plaka povezano sa visokim koncentracijama IL2, IL10, IL6 i TNF $\beta$ , dok je razvoj plaka povezan sa visokim koncentracijama IFN $\gamma$ , IL8, IL4 i IL5 u PICF. Vrednosti IFN $\gamma$ , IL4, IL5 bile su značajno veće u grupi ispitanika sa najvećim PI u odnosu na ispitanike sa nižim indeksom plaka. Uočava se tendencija povećanja prosečne koncentracije ovih citokina sa povećavanjem vrednosti PI. Za razliku od njih, najveće prosečne vrednosti IL2, IL10, TNF $\alpha$ , detektovano je u grupi sa najmanjim PI, odnosno, odsutnim plakom. Vrednosti IL2 pokazuju jasnu tendenciju smanjenja u odnosu na povećanu prisutnost plaka. Vrednosti IL8, IL6 značajno su rasle od grupe sa najmanjom plakom do najvećih vrednosti PI, kod IL8 su dostizale skoro 20 puta veći porast. Prosečne vrednosti IL1 $\beta$  bile su značajnih bioloških koncentracija u svim ispitivanim grupama, a najviše detektovane u grupi PI=0, bez statistički značajnih razlika u odnosu na druge grupe.

Objašnjenje dela rezultata koji se odnose na razlike u koncentraciji citokina u PICF ispitanika sa različitim vrednostima plak indeksa, leži u poznatoj činjenici da je dentalni plak osnovni uzročnik inflamacije gingive. Plak indeks, bez obzira što direktno ne determiniše stepen inflamacije, uglavnom prati vrednosti gingivalnog indeksa i zajedno sa njim preciznije opisuje stanje gingive. S obzirom da se plak indeksom određuje debljina dentalnog plaka na implantatima (odnosno zubima), uočava se jasna korelacija porasta nivoa pojedinih citokina IL1 $\beta$  sa većim stepenom akumulacije dentalnog plaka. Ako se plak akumulira na implantatnoj površini, subepitelno vezivno tkivo postaje infiltrirano odbrambenim inflamatornim ćelijama, kao odgovor domaćina na prisustvo bakterija i njihovih štetnih produkata. Nedavne studije eksperimentalno indukovane periimplantatne inflamacije su pokazale sličnu povezanost akumulacije dentalnog plaka i razvoja periimplantitisa u korelaciji sa porastom nivoa proinflamatornih citokina (Baron i sar., 2000). U slučaju razvoja dentalnog plaka povećanje vrednosti IFN $\gamma$  se objašnjava indukovanjem inflamatornih



citokina i hemokina (IL8) i dešavanjima koja vode do stimulacije osteoklastnog formiranja (Garlet i sar 2010).

Berglundh i Lindhe su u svojim eksperimentalnim studijama došli do zaključka da je periimplantitis praćen koštanom resorpcijom primarno indukovano dentalnim plakom (Berglundh i sar 1992; Lindhe i sar 1992). Pokazana je bliska povezanost između volumena PICF i akumulacije plaka kao merilo periimplantno meko tkivne inflamacije. U ovim istraživanjima eksperimentalni model gingivitisa predstavljao je dokaz o povezanosti između akumulacije dentalnog plaka i razvoja gingivitisa, što je potvrđeno i u slučaju periimplantitisa. U ovim studijama, uočen je i povećani gingivalni indeks i povećana dubina džepa kao rezultat povećane akumulacije plaka i stoga, što ukazuje na uzročno-posledičnu vezu između dentalnog plaka i razvoja mukozitisa, a samim tim i periimplantitisa. Većina ispitivanja vezana za periimplantitis su rađena na životinjama, a ne na ljudima iz etičkih razloga. Pilotska studija Klinge i sar 2005. god. Ukazala je na sporiju stopu progresije bolesti kod implantata u poređenju sa prirodnim zubima. Periimplantitis se ne mora razviti na svim mestima gde je postojao perimukozitis, kao što i parodontopatija ne mora da se razvije svuda gde je postojao gingivitis. Ali značajan podatak koji prati ova istraživanja je da akumulacija dentalnog plaka i plak indeks prati razvoj inflamacije i stepen progresije periimplantitisa.

#### **5.1.4. Lokalni imunski odgovor i gingivalni indeks**

Dosadašnja istraživanja su pokazala da je inflamacija povezana sa povećanim nivoima različitih inflamatornih medijatora (Niedermaier i sar.,1996). Progresija inflamacije koja se manifestovala porastom vrednosti gingivalnog indeksa verovatno je posledica dejstva IL1 $\beta$  i IL6 koji uzrokuju značajno tkivno oštećenje aktivacijom osteoklasta i indukcijom sinteze enzima kolagenaza iz fibroblasta (Panagakos i sar., 1997).

Gingivalni indeks (GI) po Lou i Silnesu (Löe-Silness) je indeks koji se najčešće koristi za procenu stanja gingive i značajan je indikator inflamacije. Ovaj indeks se meri sa sa vestibularne, mezijalne, oralne i distalne strane svakog prisutnog zuba ili implantata. Smatra se da najvernije odslikava zapaljenje tkiva oko zuba ili implantata. Nađena je korelacija između povećanih vrednosti gingivalnog indeksa i visokih vrednosti

proinflammatory citokina sa jedne strane i smanjenih vrednosti antiinflammatory citokina sa druge strane (Petković i sar 2011).

U studiji koja je dugoročno pratila stanje periimplantatnog tkiva, uočena je korelacija između vrednosti gingivalnog indeksa i promena koje se odvijaju u periimplantatnom koštanom nivou (Matić i sar 2010).

Rezultati naših istraživanja su pokazali da su prosečne vrednosti IFN $\gamma$  i IL4 najveće u grupi ispitanika sa srednjom vrednosti GI=1. Za razliku od njih, najmanji gingivalni indeks povezan je sa visokim koncentracijama IL2, IL1 $\beta$  i TNF $\beta$ . Vrednosti IL2, IL10, IL1 $\beta$  i TNF $\alpha$  su bile praktično izjednačenih, značajnih bioloških koncentracija u svim ispitivanim grupama, bez značajnih razlika. Povećanje vrednosti GI povezana je sa visokim koncentracijama IFN $\gamma$ , IL4 i TNF $\alpha$ , dok su najveće vrednosti GI povezane sa visokim koncentracijama IL10, IL8 i IL5. Vrednosti IL6 pokazuju tendenciju smanjenja sa povećavanjem vrednosti GI. Vrednosti IL6 nisu se značajno međusobno razlikovale.

Vrednosti IL8 značajno su rasle od grupe sa najmanjim GI do najvećih vrednosti GI, dostižući skoro 30 puta veći porast. Prosečne vrednosti IL5 bile su značajno veće u grupi ispitanika sa najvećim GI. Sigusch i sar su još 1998 godine uočili značajno povišene nivoe IL5 u grupi sa parodontopatijom u odnosu na kontrolnu grupu, dok je u sledećoj studiji in vitro merenje produkcije IL5 iz aktiviranih perifernih mononuklearnih ćelija krvi pokazalo da gingivalne mononuklearne ćelije iz hronično inflamiranog parodontalnog tkiva produkuju IL5 i IL6 (Fujihashi i sar 1993).

Nađena je korelacija između GI i nivoa IL1 $\beta$  u GCF i PICF oko zuba i implantata (Yaghobee i sar., 2013). U nekoliko studija je pokazano da inhibicijom IL1 $\beta$  u eksperimentalnom periodontitisu dolazi do redukcije tkivne destrukcije. Kod ispitanika sa periimplantitisom su uočene povećane vrednosti IL1 $\beta$  (Aboyoussef i sar., 1998; Murata i sar., 2002). U toj grupi većina vrednosti kliničkih parametara je povećana, uključujući i gingivalni indeks (GI) i kod njih su nađene povišene vrednosti IL1 $\beta$ , IL10, RANKL i OPG na mestima inflamacije u odnosu na grupu sa zdravim tkivom oko implantata (Guncu i sar., 2012).

Rezultati koji se odnose na nivo IL6 u periimplantatnom tkivu su bili u pozitivnoj korelaciji sa dubinom džepa, indeksom krvarenja i gingivalnim indeksom što sve ukazuje na značajnu povezanost koja postoji između lokalne produkcije IL6 i

destrukcije periimplantatnog tkiva. Pokazano je da je IL10 značajni inhibitorni citokin koji reguliše produkciju proinflamatornih citokina IL1 $\beta$ , IL6, IL8, TNF $\alpha$  i IFN $\gamma$  (Rossomando i sar., 1990; Reinhart i sar., 1993; Yamazaki i sar., 1994). Povećani nivoi IL10 kod ispitanika sa periimplantitisom ukazuje na to da imaju ulogu u regulaciji lokalnog imunskog odgovora, dok su se povećani nivoi IL6 i IL10 povezivali sa gingivalnim indeksom većim od 1, i dubinom periimplantatnog džepa većim od 3mm (Duarte i sar. 2009).

Uočeno je da su u inflamiranim tkivima povećane vrednosti TNF $\alpha$  koji reguliše produkciju IL1 $\beta$  i IL6 uz istovremeno uvećane vrednosti gingivalnog indeksa (Garleta i sar., 2010; Gravesa i sar., 2008) godine IL4 inhibira transkripciju proinflamatornih citokina i vrednosti su mu uvećane tokom inflamacije (Pestka i sar., 2004).

Liskman i sar 2004 su proučavanjem nivoa IL6 u PICF zabeležili povećane koncentracije kod ispitanika sa periimplantitisom i uočena je pozitivna korelacija sa kliničkim parametrima :indeks krvarenja, dubina džepa i gingivalni indeks.

### **5.1.5. Lokalni imunski odgovor i dubina džepa**

Dijagnostičke metode koje se koriste u proceni stanja periimplantatnih tkiva obuhvataju: određivanje kliničkih parametara (indikatore inflamacije mekog i koštanog tkiva) radiološke analize, mikrobiološke analize i kvalitativne i kvantitativne analize PICF (Mombelli i Lang 2008; Heitz-Mayfield, 2010). Potreba za ranom dijagnozom periimplantitisa proizilazi iz činjenice da postoje nepoznanice o fazi prelaska iz fiziološkog u patološko stanje, kao i nemogućnost praćenja aktivnosti i progresije bolesti zbog ograničenja u praćenju i merenju kliničkih parametara dubine džepa, nivoa pripojnog epitela (Buduneli i Kinane., 2011).

U periimplantitisu koji obuhvata progresivni gubitak kosti, udružen sa inflamacijom periimplantatnog mekog tkiva implantat nije klinički pokretan do poslednjeg stadijuma kada koštani gubitak progredira i obuhvati kompletnu implantatnu površinu. Progresija gubitka kosti se klinički manifestuje kao povećanje dubine periimplantatnog džepa. Poznato je da je dubina džepa razdaljina od ivice slobodne gingive do dna džepa i da je rezultat apikalne migracije pripojnog epitela u neposrednoj blizini resorpcije alveolarne kosti. Kod periimplantitisa dubina

periimplantatnog džepa veća od 3mm obično ukazuje na gubitak alveolarne kosti. Dubina džepa se indirektno povezuje sa produbljivanjem anaerobnih uslova što može da se koristi i kao indikator za stimulaciju lipopolisaharida (LPS). Bakterije sadrže vezikule bogate LPS-om, koji u uslovima degradiranog epitela ima otvoren prolaz do vezivnog tkiva i sistemske cirkulacije. Oslobođeni LPS aktivira sekreciju inflamatornih medijatora i na taj način privlače i aktiviraju neutrofile. Endotelne ćelije aktivirane od strane LPS-a ili citokina i sposobne su za ekspresiju drugih receptora kao što je E-selektin. Bakterijski LPS koji se oslobađa prilikom dezintegracije bakterija interaguje sa endotelnim ćelijama utičući na inhibiciju ekspresije E selektina (Nair, 2004). Proinflamatorni citokini (IL $\beta$ , IL6 i TNF) i hemokini (IL8) koji se pri tom oslobađaju pojačavaju vaskularni odgovor, resorpciju koštanog tkiva od strane osteoklasta i degradaciju ekstraćelijskog matriksa. Istovremeno se pojačava sinteza proteina akutne faze koji sa IL6 stimulišu produkciju hematopoetskih GM-CSF dovodeći do destrukcije periimplantnog tkiva (Lerner U., 1994).

Za razliku od prirodnih zuba gde je prosečna dubina džepa lakše izmerena i definisana, fiziološka dubina periimplantatnog sulkusa uspešnog oseointegrisanog implantata je teže procenjiva. Pokazano je da povećanje dubine parodontalnog džepa i gubitak epitelnog pripoja imaju patološki efekat na sam razvitak inflamacije (Armitage i sar., 2009). Zbog razlike u meko-tkivnom sastavu, organizaciji i drugim karakteristikama uslovi za merenje dubine džepa oko zuba i implantata nisu uporedivi (Berglundh i sar., 1992; Schou i sar., 2006). Lindhe i sar (1992) su na eksperimentalnim modelima pasa pokazali da postoji veća gustina periimplantatnog tkiva što otežava procenu dubine džepa oko implantata.

Rezultati naših ispitivanja pokazali su da postoje različiti profili lokalno produkovanih medijatora kod ispitanika sa različitom dubinom periimplantnog sulkusa. Najveće prosečne vrednosti IFN $\gamma$  i IL4 detektovali smo u grupi ispitanika sa 2 mm, odnosno 3mm DPIS u slučaju IL2 i IL10. Vrednosti IL6 bile su najveće u grupama sa najmanjom vrednosti DPIS, u ispitanika koji su imali dubinu 1 i 2 mm. Prosečne vrednosti IL5 kao i IL8 imale su isti trend povećanja, odnosno rasle su od grupe sa najmanjom dubinom do najvećih vrednosti DPIS, dostižući višestruko uvećane vrednosti na dubini od 5mm. Prosečne vrednosti IL1 $\beta$  bile su značajnih bioloških koncentracija u svim ispitivanim grupama, a najviše u grupi DPIS 4 mm, bez značajnih

razlika, dok su vrednosti  $TNF\alpha$  i  $TNF\beta$  bile najveće kod ispitanika sa najmanjom dubinom džepa.

Uočeno je da su  $IL1\beta$ ,  $IL4$ ,  $IL6$  i  $IL8$  značajni u regulaciji ćelijskog imunskog odgovora u periodoncijumu. Povećanje vrednosti  $IL8$  je nađeno na svim mestima inflamacije a u literaturi ne postoje podaci o značaju  $IL5$  u parodontopatiji i periimplantitisu. Povećanje vrednosti proinflammatoryh citokina predstavlja inicijaciju inflamatornog procesa koji može biti potencijalni indikator tkivne destrukcije. U dostupnoj literaturi se razvoj inflamacije oko zuba i implantata vezuje za povećanje vrednosti  $IFN\gamma$ ,  $IL2$ ,  $IL3$ ,  $IL4$ ,  $IL12$ ,  $IL15$ ,  $MIP1\alpha$  i RANTES.

Gorska i sar., 2003 godine su ispitivali kliničke parametre i merili lokalne koncentracije citokina ( $IL1\beta$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL2$ ,  $IFN\gamma$ ,  $IL4$ ,  $IL10$ ) koji su važni u inicijaciji i progresiji parodontopatije. Nađeni su povećani nivoi  $IL1\beta$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL2$  i  $IFN\gamma$ , a značajno visoke koncentracije su detektovane za  $IL4$  i  $IL10$  na mestima sa infalamacijom i dubinom džepa većom od 3mm.

Većina istraživanja u kojima je rađen citokinski profil shodno progresiji inflamacije su ukazala na  $IL1$ ,  $IL6$ ,  $IL8$  i  $TNF\alpha$  kao ključne medijatore tkivne destrukcije čije su vrednosti povećane kod ispitanika sa parodontopatijom (Rossomando i sar.,1990; Wilton i sar. 1992; Geivelis i sar., 1993 ). Nađena je značajna relacija između povećanja nivoa ovih citokina u grupi ispitanika kod kojih je došlo do progresivnog uvećanja dubine džepa i do povećanja volumena gingivalne tečnosti (Brock i sar., 2004).

Kada je u pitanju proučavanje periimplantatnog tkiva, istraživanja su pokazala da  $IL1\beta$  i  $IL8$  indukuju koštanu resorpciju i imaju važnu ulogu u progresiji inflamacije kroz periimplantne strukture. Pokazano da je lokalna produkcija  $IL1\beta$ , a naročito  $IL8$  značajno veća kod implantata sa dubinom džepa većom od 3mm, u odnosu na one sa manjom dubinom džepa (Ji i sar.,2013). Pokazano je da ovi citokini stimulišu osteoklaste koji se onda povećavaju u broju i aktivnosti što doprinosi patološkom koštanom gubitku.

Povećanje koncentracije proinflammatoryh citokina u PICF vodi do gubitka oseintegracije, koštanog gubitka i implantatnog neuspeha a pokazano je da povećani nivo proinflammatoryh citokina i hemokina korelišu sa stepenom zapaljenja (Schierano i sar., 2008, Campos i sar., 2005). Panagacos (1996) i Salcetti (1997) su

određivanjem vrednosti IL1 u PICF pokazali da se koncentracija citokina povećava tokom progresije periimplantitisa pri čemu dolazi do progresivnog povećanja dubine džepa.

U istraživanjima Mombelli i sar., 2008 godine nađeno je da je dubina džepa bila u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama svih ispitivanih citokina i dobijene su povećane vrednosti IL1 $\beta$ , IL6 i IL8 na mestima gde je dubina džepa bila veća od 3mm što je ukazivalo na stimulaciju osteoklastne koštane resorpcije.

Machte i sar., 2005 godine su uradili studiju praćenja stanja gingivalnog i periimplantatnog tkiva u različitim fazama inflamacije. Rezultati su pokazali da su plak i gingivalni indeks prirodnih zuba veći u odnosu na indekse oko implantata za razliku od dubine džepa i alveolarnog koštanog gubitka koji su bili veći oko implantata. Nivoi merenih citokina u gingivalnoj odnosno periimplantatnoj tečnosti su bili približnih vrednosti. Ovo ukazuje na činjenicu da izmerena dubina džepa oko implantata jasnije odlikava proces destrukcije kosti i periimplantitis u odnosu na parametre oralne higijene gingivalni i plak indeks. Zaključak ove studije bio je da su proinflamatorni citokini IL1 i TNF validni markeri alveolarnog koštanog gubitka kod parodontopatije i periimplantitisa.

Imajući u vidu da periimplantitis predstavlja multifaktorsko oboljenje kompleksne etiologije, koje nastaje dejstvom imunoloških, mikrobioloških i genetičkih faktora, nameće se potreba za ispitivanjem uzajamnog dejstva ovih faktora kao i potencijalne sklonosti ka ovom oboljenju. Kod periimplantatnog tkiva u zavisnosti od zahvaćenosti tkiva inflamatornim procesom, ova oboljenja se dele na perimukozitise i periimplantitise (Lindhe i Meyle, 2008). Perimukozitis se karakteriše inflamatornim procesom ograničenim na meka tkiva što ga razlikuje od sledećeg razvojnog stadijuma zapaljenja periimplantitisa, gde je proces proširen na potpurnu kost opterećenog implantata (Mombelli i Lang, 2008; Zitzmann i Berglundh, 2008).

Istraživanja su pokazala da su patogenetički mehanizmi prisutni kod perimukozitisa i periimplantitisa analogni onima prisutnim kod gingivitisa i parodontopatije (Heitz-Mayfield i Lang, Berglundh 2011), što znači da je kao i kod parodontopatije i kod periimplantitisa glavni etiološki faktor bakterijska infekcija koja dovodi do nekontrolisanih imunskih procesa i postepenog oštećenja svih struktura periimplantatnog tkiva, a manifestuje se i prisustvom periimplantatnih lezija

(Berglundh i sar., 1992; Ericsson i sar., 1992; Lindhe i sar., 1992; Pontoriero i sar., 1994; Heitz-Mayfield, 2008 ; Shibli i sar., 2008). Ova sličnost upravo čini parodontopatiju faktorom rizika za razvoj periimplantatnih bolesti (Sumida i sar., 2002; Aoki i sar., 2009; Renvert i Persson, 2009).

Zaustavljanje ili barem ublažavanje destrukcije parodoncijuma i periimplantatnih tkiva pacijenata bi bilo moguće blagovremenom identifikacijom osoba koje imaju predispoziciju za razvoj inflamacije. Brojna istraživanja iz oblasti molekularne medicine, koja su fokusirana na problematiku razvoja periimplantitisa imaju za cilj upravo da identifikuju parametre – biomarkere koji bi omogućili rano utvrđivanje osoba koje su pod rizikom od razvoja periimplantitisa.

Proučavanje ćelijskih i molekularnih mehanizama u stomatologiji je u velikoj meri doprinelo sagledavanju inflamatornog odgovora u oralnoj sredini. Genetička osnova proučavana u različitim studijama predstavlja prvu kariku u razrešenju faktora koji uzrokuju ili doprinose razlikama u inflamatornim odgovorima između individua. Sva saznanja dobijena u pokušajima razjašnjenja genetičke osnove parodontopatije i periimplantitisa značajno su doprinela razumevanju etiologije obe navedene bolesti.

Genetički polimorfizmi mogu biti potencijalno asocirani sa rizikom za razvoj mnogobrojnih oboljenja kod ljudi, uključujući periimplantitis. Dok mikrobiološki i drugi spoljašnji faktori iniciraju i moduliraju parodontalna i periimplantatna oboljenja, individue različito odgovaraju na patogene. Taj odgovor je indukovan njihovim različitim genetičkim profilima (Lang i Berglundh, 2011). Geni koji kontrolišu zapaljenski odgovor domaćina imaju važnu ulogu u modulaciji stadijuma periimplantitisa (Schafer i sar., 2011).

U patogenezi periimplantitisa važnu ulogu imaju citokini i balans između pro i antiinflamatornih citokina i regulacija njihovih receptora i signalnog puta determiniše trajanje tkivne destrukcije koja se javlja u periimplantitisu. Mnogobrojni geni su uključeni u regulaciju specifičnih komponenata inflamatornog procesa. Identifikacija specifičnih gena koji utiču na predispoziciju za parodontopatiju i periimplantitis mogla bi imati dijagnostičku i terapeutsku vrednost. Istraživanja su pokazala da pojedini genetički polimorfizmi unutar ovih gena mogu da utiču na nivo ekspresije citokina kao i ispoljavanje imunskog odgovora (Laine i sar., 2006 ; Lachmann, 2007).

Individualne varijacije u lokalnoj produkciji ključnih inflamatornih i antiinflamatornih medijatora, bi potencijalno mogle biti posledica postojanja polimorfizama gena za citokine, te bi isti mogli da budu predisponirajući faktori koji bi činili okvir za protektivni ili nekontrolisani inflamatorni odgovor, kao onaj koji je prisutan u parodontopatiji i periimplantitisu. Ustanovljeno je da su kombinacija IL6-174 polimorfizama i prisustvo GG genotipa kao faktora rizika, povezani sa parodontopatijom kod nepušača i osoba starijih od 45 godina. Ova povezanost utiče na povećan rizik za komplikacije oko zuba pa čak i sa rizikom od gubitka zuba (Franch-Chillida i sar., 2010).

Koncentracija sintetisanih signalnih molekula, citokina koji imaju važnu ulogu u patogenezi parodontopatije i periimplantitisa, zavisi ne samo od intenziteta i vrste stimulacije, već i od funkcionalnih polimorfizama u genima koji kodiraju njihovu sintezu (Cajado i sar., 2011).

Različita ekspresija pojedinih citokina se može pripisati individualnim faktorima rizika svakog pojedinca, bilo da su u pitanju navike (pušenje, stres), sistemske (dijabetes, osteoporoza) ili genetičke bolesti. Studije blizanaca su pokazale da je najvažniji faktor koji utiče na razlike u progresiji parodontopatije genetički (Michalowiz i sar., 2000).

Doprinos genetičke varijabilnosti razvoju parodontopatije može varirati od značajne uloge u determinaciji oboljenja do toga da ima minorne efekte na etiologiju (Jacobi-Gresser, 2012). Papapanou i sar. su još 2001. godine pokazali da 50% kliničke varijabilnosti obolelih od parodontopatije se može pripisati genetičkim faktorima.

Kasnije studije su pokazale da su parodontopatija i periimplantitis kompleksna oboljenja u kojima mnogobrojni geni doprinose manjem delu osetljivosti, dok se spoljašnji faktori javljaju kao kritično važni u procesu oboljenja. Prisustvo određenih polimorfizama gena za citokine i detekcija genotipova mogla bi ukazati na visoko rizične genotipove koji kao posledicu imaju povećanu sklonosti ka inflamaciji. Osobama koje su nosioci takvog genotipa bi se mogla uraditi rana dijagnoza i pravovremeni tretman zbog povećanog rizika od nastanka periimplantitisa.

Individualni inflamatorno-imunski odgovor domaćina može da utiče na uspeh tretmana sa dentalnim implantatima (Esposito i sar., 2007). Poslednjih godina su



istraživanja fokusirana na detekciju visoko rizičnih genetičkih profila važnih za sklonost ka parodontopatiji/periimplantitisu.

## **5.2. Polimorfizmi gena za citokine i CD14 gen**

U ovom istraživanju proučavana je asocijacija polimorfizama gena za citokine CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra genima koji su uključeni u imunski odgovor domaćina na bakterijsku infekciju iz dentalnog plaka, sa rizikom razvoja periimplantitisa, kliničkim karakteristikama ispitanika i lokalnom produkcijom citokina.

Na osnovu podataka iz literature, u našoj populaciji do sada nije rađena analiza polimorfizama gena bitnih za nastajanje periimplantitisa. Dodatno, u literaturi vezanoj za ostale populacije je samo u nekoliko studija proučavana asocijacija izvesnih SNP-ova u genima za citokine sa rizikom za nastanak inflamacije oko dentalnih implantata. U dostupnoj literaturi nema puno podataka o potencijalnom prognostičkom značaju ovih polimorfizama kod pacijenata sa periimplantitisom.

U ovoj studiji su primećene značajne razlike u zastupljenosti genotipova polimorfizama CD14<sup>-159</sup> (rs2569190), IL6<sup>-174</sup> (rs1800795), IL10<sup>-1082</sup> (rs1800896), TNF $\alpha$ <sup>-308</sup> (rs1800629) između grupe pacijenata sa periimplantitisom u odnosu na kontrolnu grupu pacijenata sa zdravim tkivom oko dentalnih implantata. Uočena razlika u distribuciji polimorfizama između ove dve grupe ukazuje na moguću asocijaciju i važnu ulogu ovih gena u procesu nastanka periimplantitisa.

Postojanje statističke razlike u distribuciji alela je zabeleženo za sve analizirane polimorfizme, osim u slučaju ispitivanih polimorfizama u IL10 i IL1ra genima.

### **5.2.1 Polimorfizam rs2569190 CD14 gena**

CD14 gen se nalazi na hromozomskoj poziciji 5q23-21 i kodira receptor za lipopolisaharide (LPS ili endotoksin). Važnu ulogu u razumevanju molekularnih mehanizama periimplantitisa predstavlja činjenica da je CD14 receptor za lipopolisaharide, peptidoglikane i lipoteinsku kiselinu i da učestvuje u iniciranju urođenog imunskog odgovora na bakterijsku invaziju. Unutar promotorske sekvence CD14 gena je identifikovan genetički polimorfizam rs2569190 koji se sastoji od

tranzicije C u T na 159-om baznom paru od glavnog mesta početka transkripcije (Holla i sar 2002). Dosadašnja istraživanja su pokazala da je SNP identifikovan u promotorskom regionu na poziciji -159 povezan sa povećanom podložnošću ka inflamatornim oboljenjima (Klein i sar., 2002; Obana i sar., 2002). Pokazano je da homozigotni nosioci T alela na poziciji -159 imaju povećani nivo sCD14 (Obana i sar., 2002), a smatra se da povećani nivo sCD14 posledično odražava i povećani rizik od parodontopatije.

U našem istraživanju je zapaženo postojanje značajne razlike u distribuciji genotipova ( $p < 0.0001$ ) i alela ( $p = 0.003$ ) za analizirani polimorfizam rs2569190 u CD14 genu u grupi ispitanika sa i bez dijagnostikovanog periimplantitisa. U obe ispitivane grupe je zabeležena najviša učestalost heterozigotnog genotipa (CT). Mutirani alel TT je bio nešto više zastupljen među ispitanicima bez periimplantitisa (23%) u odnosu na grupu sa periimplantitisom (6%), dok je divlji tip alela bio češći u grupi ispitanika sa periimplantitisom (38%) u odnosu na ispitanike bez periimplantitisa (8%). Ovi rezultati ukazuju na moguću povezanost CD14<sup>-159</sup> sa nastankom periimplantitisa. Osobe CC genotipa za ispitivani CD14<sup>-159</sup> polimorfizam imaju povećani rizik za razvoj periimplantitisa, dok prisustvo C alela se dovodi u vezu sa povišenim rizikom nastajanja inflamacije. Navedeni nalaz je u skladu sa činjenicom da u grupi ispitanika sa periimplantitisom TT genotip prisutan u najmanjem procentu. U grupi ispitanika bez periimplantitisa, zabeleženo je prisustvo TT genotipa u većem procentu nego u prethodnoj grupi, pa bi se moglo pretpostaviti da T alel ima eventualni protektivni efekat.

Prema dostupnim podacima iz literature ovaj polimorfizam je ispitivan u parodontopatiji, ali ne i u periimplantitisu. Istraživanja sprovedena na Nemačkoj populaciji su pokazale da CD14 C<sup>-159</sup> T polimorfizam nije povezan sa agresivnom ili hroničnom parodontopatijom (Holla i sar., 2002; Yamazakii sar., 2003; James i sar., 2007). Međutim rezultati drugih studija ne potvrđuju ovakve nalaze (Donati i sar., 2005; Laine i sar., 2006; Tervonen i sar., 2007). Kontroverzni rezultati različitih studija se mogu delimično objasniti neuniformnim kliničkim parametrima, razlikama u statističkim pristupima kao i etničkim razlikama u distribuciji genotipova i alela za dati proučavani polimorfizam.

U studiji Donnati i sar. iz 2005. godine ispitivani su genetički polimorfizmi CD14, IL1ra i TNF $\alpha$  gena na parodontološkoj grupi ispitanika. Njihovi rezultati su delimično u saglasnosti sa rezultatima našeg istraživanja. Od ispitivanih polimorfizama jedino su za CD14 polimorfizam otkrivene značajne razlike između testirane i kontrolne grupe. Procenat osoba TT genotipa je značajno manji u grupi sa agresivnom parodontopatijom u odnosu na grupu zdravih ispitanika. Nosioci C alela su 90% bili u grupi sa parodontopatijom i bili su prisutni sa značajno većom učestalošću u odnosu na kontrolnu grupu (72%). Iz ovog istraživanja se nameće zaključak da je CD14 genetički polimorfizam na poziciji -159 povezan sa hroničnom parodontopatijom u populaciji severne Evrope.

James i sar 2007. godine su pokazali da su polimorfizmi u genima kao što su TLR4 i CD14 povezani sa povećanim rizikom od infekcija Gram-negativnim bakterijama i povećanu sklonost ka parodontopatiji. Rađena je genotipizacija CD14 na poziciji -159 i -1359 kod ispitanika sa agresivnom i hroničnom formom parodontopatije u odnosu na zdrave kontrole. U ovoj studiji nije pronađena statistička značajnost između CD14-159 polimorfizma i parodontopatije.

Za razliku od rezultata ispitivanja koji su ukazivali na višu zastupljenost C alela kod ispitanika sa inflamacijom, u studiji Yamazaki i saradnika 2003. godine je pokazano da postoji povećana učestalost TT genotipa za ispitivani CD14 polimorfizam u mlađoj u odnosu na stariju grupu ispitanika. Zaključeno je da ovaj genotip nije esencijalan za parodontopatije, ali njegovo prisustvo može doprineti nastanku parodontopatije. Studija Laina i saradnika iz 2006- te je pokazala značajnu veću učestalost CD14-159 TT genotipa kod ispitanika sa parodontopatijom u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika. Smatra se da je TT genotip relevantan zato što je povezan sa povećanim nivoom serumskog sCD14 (Baldini i sar., 1999) i povećani nivoi sCD14 su povezani sa parodontopatijom (Hayashi, 1999). Druge studije koje su obuhvatale Evropsku populaciju i parodontoptiju su pokazale da ne postoje značajne razlike u učestalostima alela i genotipova u celokupnoj grupi ispitanika i kontrola (Holla i sar., 2002; Folwaczny i sar., 2004). Tako je i istraživanjima Holla i sar. sprovedenoj na Nemačkoj populaciji 2002. godine nađena snižena učestalost CD14-159 TT genotipa u podgrupi sa umerenim u odnosu na teži oblik hronične parodontopatije, ali polimorfizam C-159 T nije povezan sa agresivnom ili hroničnom parodontopatijom.

Folwaczny i saradnici 2004. godine su našli veću učestalost C alela CD14<sup>-159</sup> gena kod žena sa hroničnom parodontopatijom, ali ne i kod muškaraca. Razlog ove različitosti dobijenih rezultata prema polu nije objašnjen, ali se može pripisati i malom broju ispitanika u okviru podgrupa. Sva dodatna objašnjenja se mogu pripisati etničkim razlikama kao i različitosti u klasifikaciji oboljenja. Ustanovljeno je da postojanje polimorfizama u TLR i CD14 genima može ukazati na povećanu individualnu sklonost ka parodontopatiji, a to ukazati na povećani rizik od parodontopatije.

Različita zastupljenost T alela između etničkih grupa je objavljena u različitim zdravim paradontološkim grupama pacijenata (Loos i sar., 2005).

Ispitivanje povezanosti genetičkih polimorfizama sa kliničkim karakteristikama parodontopatije ukazuje na postojanje protektivnog efekta TT genotipa rs2561799 polimorfizma CD14 gena, što je bilo u direktnoj vezi sa povećanim nivoom CD14 (Hubacek i sar.,1999). Slična povezanost demografskih karakteristika, kliničkih markera parodontopatije i subgingivalne kolonizacije bakterija je nađena i u prethodnim studijama (Umeda i sar., 1998; Hamlet i sar., 2001; Könönen, i sar., 2007).

Multivarijantnom analizom u istraživanjima Könönen i sar., 2007 je pokazano smanjenje rizika za nastanak subgingivalno lociranih bakterija kod ispitanika koji su nosioci TT genotipa. Ovakva povezanost uočena je u radu Umeda i sar., 1998 u grupi muških ispitanika.

U našem istraživanju postojanje asocijacije genotipova ispitivanih polimorfizama u CD14 genu sa rizikom za razvoj periimplantitisa je utvrđivano logističkom regresionom analizom. Kao referentna vrednost je uzet *wild type* genotip u odnosu na koji je procenjivan rizik za heterozigotni i mutirani genotip, ali i efekat heterozigotnog i mutiranog genotipa združeno. Kada je reč o proučavanom polimorfizmu u CD14 genu, značajno smanjenje rizika za razvoj periimplantitisa je zabeleženo za heterozigotni genotip (OR=0.166, p=0.002), mutirani genotip (OR=0.051, p=0.001), ali i heterozigotni i mutirani genotip združeno spram *wild type* genotipa (OR=0.137, p=0.001) . Isti trend sniženog rizika za razvoj periimplantitisa uočen je i u slučaju adjusted Odds Ratio analize kod osoba heterozigotnog i mutiranog genotipa, kao i oba navedena genotipa združeno u poređenju sa *wild type* genotipom (tabela 15).

### 5.2.2 Polimorfizam IL1ra gena

Najčešće proučavani genetički polimorfizam u periimplantitisu je polimorfizam IL1 grupe gena (IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL1ra). U našem istraživanju rađena je genotipizacija IL1ra. IL1ra je glavni modulator IL1 koji vezujući se za isti receptor onemogućava njegovu biološku aktivnost. Vezivanjem IL1ra blokira inicijaciju unutarćelijske signalne transdukcije (Watson i sar., 1995).

Nicklin i sar. 1994. godine su napravili restrikcionu mapu humanog regiona genoma i došli do zaključka da 3 gena kontrolišu produkciju IL1: IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  i IL1ra. U odnosu na terminalna CpG ostrvca ova tri gena su mapirana u intervalima IL1 $\alpha$  između +0 i +35 kb, IL1 $\beta$  između +70 i +110 kb, i IL1ra između +330 i +430 kb.

Analiza polimorfnosti gena koji kodira IL1ra ukazuje na postojanje veze između različitog broja tandemskih ponovaka od 86bp u intronu 2 IL1ra gena i podložnosti periimplantitisu. Polimorfizam u genu za IL1ra je po tipu mikrosatelitne ponavljajuće sekvence koje obuhvataju 86 parova baza u intronu 2. Identifikovano je pet alela: A1 (4 ponavljanja), A2 (2 ponavljanja), A3 (5 ponavljanja), A4 (3 ponavljanja) i A5 (6 ponavljanja), što rezultuje kvantitativnim razlikama u produkciji ovog inhibitora. Osobe koje su homozigoti za alel A2 gena za IL1ra imaju prolongirani i intenzivniji proinflamatorni imunski odgovor od osoba sa drugim IL1ra genotipovima.

U ovom istraživanju za proučavani polimorfizam u IL1ra genu nije uočeno postojanje statistički značajne razlike u distribuciji genotipova, ali je uočeno postojanje statistički značajne razlike između grupe sa i grupe bez periimplantitisa (0.042). U grupi ispitanika sa periimplantitisom zabeležena je najviša učestalost A1A1 genotipa, dok je u grupi ispitanika bez periimplantitisa zastupljeniji A1A2 genotip. Ovi rezultati su u suprotnosti sa većinom podataka iz literature. Ako uzmemo u obzir genotip A1A1, A1A2 i A2A2 su najčešće prisutni genotipovi ne samo u grupi ispitanika obuhvaćenim našim istraživanjem, već i u drugim populacijama obuhvaćenim različitim studijama. Kad je reč o učestalosti alela proučavanog polimorfizma IL1ra gena nije zabeleženo postojanje statistički značajne razlike u distribuciji između ispitivanih grupa. Alel A1 je dominantno zastupljen u obe grupe ispitanika (75%, 62% redom). Nije pronađena statistička značajna veza između polimorfizma u IL1ra genu i kliničko patološkim odlikama. A1A2 genotip proučavanog polimorfizma IL1ra gena

je bio asociran sa 0.203 puta nižim rizikom za razvoj periimplantitisa u odnosu na A1A1 (OR=0.203, p=0.005).

Analiza asocijacije VNTR polimorfizma IL1 ra gena sa ispitivanim parametrima (klinički parametri progresije periimplantitisa, pol, vremensko trajanje opterećenja implantatima, pušenje kao faktor rizika, učestale paraodontopatije) nije potvrdila da je polimorfizam ispitivanog gena u korelaciji sa navedenim parametrima.

Uvidom u dostupnu literaturu saznajemo da je jedina povezanost između genetičkog polimorfizma za citokine i periimplantitisa nađena upravo kod ispitanika koji su nosioci IL1ra polimorfizma i sklonosti tih ispitanika ka inflamaciji. Ova povezanost ukazuje na potencijalni značaj IL1ra genetičkog polimorfizma kao faktora rizika za periimplantitis (Laine i sar., 2006 godine). Pokazano je da je prisustvo A2 alela povezano sa smanjenom produkcijom IL1ra, čime je smanjena i inhibicija biološkog dejstva IL1 preko zajedničkog receptora, odnosno povećana je aktivnost citokina IL1 koji dalje indukuje i amplifikuje inflamatornu reakciju.

U istraživanju Laina i saradnika 2006 godine koja je obuhvatala ugrađene implantate kod 101 pacijenata (testirana grupa - 57, kontrolna grupa - 44 ispitanika) je pokazano da nosioci IL1ra polimorfizma imaju povećan rizik za periimplantitis (vrednostima odds ratio od 3) uzimajući u obzir pušački status, pol i godine ispitanika. Udeo prisutnosti IL1ra alela 2 je bio 33% kod zdravih kontrola, što je u poređenju sa prethodnim studijama predstavljao povećan rizik za razvoj periimplantitisa. U poređenju stope nosioca IL1ra alela 2 kod parodontopatije u Evropskoj populaciji (36-46%) (Laine i sar., 2010; Meisel i sar., 2002) kod pacijenata sa periimplantitisom postojao je veći procenat nosioca alela 2 (56.5%).

Kada su u pitanju istraživanja u parodontopatiji, najčešće identifikovan i proučavani IL1 polimorfizmi su IL1 $\beta$  <sup>+3953</sup>, IL1 $\beta$  <sup>-511</sup>. Postojanje polimorfizma se vezuje za 4 puta povećanu produkciju IL1 $\beta$  (Vaz i sar., 2012).

Postoje istraživanja u kojima nije nađena povezanost između IL1 genetičkog polimorfizma i periimplantitisa (Hultin i sar., 2002; Roger i sar., 2002; Campos i sar., 2005; De Boever i sar., 2009). Lachman i sar. 2007. godine nisu imali dovoljno podataka za definisanje asocijacije između IL1 genetičkog polimorfizma i gubitka implantata pa je uticaj IL1 polimorfizma označen kao nejasan.

Većina objavljenih radova i istraživanja ipak pripada grupi autora koja je našla asocijaciju IL1 genetičkog polimorfizma i periimplantitisa i ukazala na određene faktore rizika (Kao i sar., 1995; Panagakos i sar., 1996; Curtis i sar., 1997; Salcetti i sar., 1997; Murata i sar., 2002; Shimpuku i sar., 2002; Laine i sar., 2006; Machtei i sar., 2006; Ying i sar., 2007).

Nosioći alela 2 IL1ra su povezani sa smanjenom produkcijom IL1ra proteinom (Tountas i sar., 1999). Santtila i sar 1998 su ustanovili da mononuklearne ćelije koje su nosioći alela 2 proizvode veću koncentraciju IL1 $\beta$  *in vitro*. To se može objasniti time da ovaj alel 2 uglavnom povećava nivo IL1 $\beta$  što rezultuje u disbalansu odnosa IL1 $\beta$ /IL1ra, a to dovodi do povećane sklonosti ili težeg oblika inflamacije. Postoji i druga pretpostavka da je IL1ra marker za povezanost sa periimplantitisom, ali ne i faktor rizika oboljenja. Postojala je pretpostavka da definisana sklonost ka parodontopatiji može ukazati i na sklonost ka periimplantitisu.

Wilson i Nunn (1999) su ispitali odnos između IL1 genotipa i gubitka implantata. Ispitali su IL1 $\alpha$  <sup>-899</sup>, IL1 $\beta$  <sup>+3953</sup> polimorfizme u Kavkazoidnoj populaciji pacijenata. Našli su da nije povećani gubitak implantata kod ispitanika kod kojih postojala sklonost ka parodontopatiji, ali da prisustvo ovog polimorfizma doprinosi progresiji inflamacije. Nije postojalo dovoljno podataka u literaturi koji bi u potpunosti podržali ovu tvrdnju.

Kasnije Rogers i sar., 2002 godine su ispitivanjem polimorfizama u genu za IL1 $\alpha$  <sup>-889</sup> i IL1 $\beta$  <sup>+3953</sup> i združeno došli do zaključka da ova dva genotipa ne pokazuju statističku značajnost i uticaj na periimplantatno tkivo dentalnih implantata.

Različito od ovih rezultata istraživanja, Shimpuku i sar., 2003 godine su pokazali da je IL1 $\beta$  <sup>-511</sup> 2/2 genotip imao značajnu povezanost sa pojavom ranog koštanog gubitka oko implantata.

U studiji Lina i saradnika 2010 bilo je uključeno 143 implantata koji su ugrađeni kod dve grupe ispitanika. Ispitivani su genetički polimorfizmi IL1 na tri lokusa IL1 $\alpha$ -889, IL1 $\beta$ -511 i IL1 $\beta$ +3954. Učestalost IL1 $\beta$ -511 je bila značajno veća u grupi kod ispitanika sa ranim marginalnim koštanim gubitkom u odnosu na kontrolnu grupu. Multipla regresiona analiza je pokazala da je OR iznosio 3.933 između ove dve grupe.

Proučavanjem asocijacije IL1ra polimorfizma sa stanjem tkiva oko implantata u studijama Camposa i sar., 2005; Laine i sar., 2006; Montesa i sar., 2009 nađeno je da je genotip A2A2 značajno češće prisutan kod ispitanika kod kojih se razvio periimplantitis ili kod kojih je došlo i do gubitka implantata.

Grupa autora su ispitivali povezanost između genetičkog polimorfizma IL1 $\alpha$  i IL1 $\beta$  i periimplantitisa i nije nađena povezanost ovih genetičkih polimorfizama sa razvojem periimplantitisa (Feloutzis i sar.,2003; Gruica i sar., 2004). U ovim istraživanjima nije uzet u obzir genetički polimorfizam za IL1ra i njegova potencijalna povezanost sa periimplantitisom. Istaknut je povećan rizik od razvoja inflamatornih komplikacija i povećanog marginalnog koštanog gubitka kod ispitanika koji se svrstavaju u ozbiljne pušače u poređenju sa nepušačima istog genotipa.

U eksperimentima je pokazano da povećanje učestalosti alela A2 dovodi do porasta incidence nekih autoimunih bolesti, kao što su Lupus erythematosus i insulin-zavisni diabetes mellitus (Blackmore i sar., 1994).

Polimorfizmi u IL1 $\alpha$  i IL1 $\beta$  genima mogu dovesti do povišene produkcije IL1, što pospešuje inflamaciju i dovodi do povećane koštane resorpcije. Prisustvo mutacije IL1ra genotipa dovodi do smanjene produkcije IL1ra. Važna inhibicija IL1 zavisne inflamacije pomoću antagonista je redukovana. Pacijenti koji nose kombinaciju mutacija IL1 $\alpha$ / IL $\beta$  i i IL1 ra gena su vrlo osetljivi na egzogene stimuluse i imaju povećani rizik za rani i progresivni oblik parodontopatije.Oni moraju da se uključe u plan tretmana i zahtevaju kliničko praćenje (Laine i sar., 2006; Andriotelli, 2008). Zaključeno je da bi utvrđivanje genotipa polimorfizma IL1 gena u dijagnostičkim procedurama pre planiranja implantološkog tretmana, moglo olakšati buduću procenu smera procesa oseintegracije, perioda zarastanja nakon ugradnje implantata, kao i predviđanja ishoda protetske rehabilitacije kod implantoloških pacijenata.

U istraživanjima Langa i sar., 1993 ispitivan je odnos između IL1 polimorfizma i tendencije krvarenja. Oni su ustanovili da je značajno prisutno izraženo krvarenje u grupi nepušača koji su imali A2A2 genotip, dok su rezultati drugih istraživača pokazali da kod ispitanika ne postoji asocijacija između genetičke predispozicije i krvarenja na provokaciju.



U studiji Lachmann i sar 2007 uključeni su ispitanici koji su imali ugrađene različite tipove implantata. Rezultati ispitivanja su pokazali da polimorfizmi u IL1 $\alpha$  -889, IL1 $\beta$  +3954 genima nisu povezani sa zdravstvenim statusom periimplantatnog tkiva.

U studiji Hamdy i Ebrahim 2011 je uključeno 50 ispitanika sa ugrađenim dentalnim implantatima. Kombinacija alela 2 IL1 $\alpha$  -889 i IL1 $\beta$  kod ispitanika sa parodontalnim ili periimplantatnim inflamiranim tkivom može biti faktor rizika koji može dovesti do veće tkivne destrukcije .

Od pomenutih studija u jednoj od njih (Lachmann i sar., 2007) nije nađena povezanost između IL1 genetičkog polimorfizma i periimplantitisa dok u dve studije Laine i sar., 2006; Hamdy i Ebrahim 2011 zaključeno je da je IL1 genotip asociran sa povećanom tendencijom razvoja infekcije periimplantatnog tkiva i destrukcije.

Polimorfizmi u IL1 genu su povezani sa stadijumom parodontopatije. Sa druge strane IL1ra ima 5 alelskih formi koji su vrlo često povezani sa mnogim oboljenjima između ostalog epitelnim ćelijama i tkivima. Alel A1 je nađen u 79.6% slučajeva, dok je alel A2 nađen u 20.4% slučajeva u populaciji. U ovoj studiji nađena je značajna učestalost alela A1A1 sa značajno nižom učestalošću heterozigotne forme A1/A2 u slučajevima agresivne parodontopatije (Tai i sar., 2002). Ovi rezultati se razlikuju od prethodnih. Nađeno je da je alel A2 protektivan u slučaju parodontopatije, ali učestalost ovog alela je povećana u Japanskoj populaciji i u slučaju sistemskog eritemskog lupusa i Sjögrenovog sindroma (Blakemore i sar., 1994). Ovom doktorskom disertacijom je pokazano da je A1A2 genotip proučavanog polimorfizma u IL1ra genu bio asociran sa 20% nižim rizikom za razvoj periimplantitisa u odnosu na najčešće zastupljeni A1A1 genotip.

Revijski rad Dereka i sar iz 2012 godine koji je proučavao povezanost između specifičnih bioloških komplikacija i implantata je pokazao da ne postoji jaka povezanost između specifičnih genetičkih polimorfizama (IL1, IL2, IL6, TNF $\alpha$  ili TGF $\beta$ ) i uspešnosti dentalnih implantata. Nađena je samo povezanost između IL1 genotipa i periimplantitisa.

### 5.2.3 Polimorfizam rsl800629 TNF $\alpha$ -308 gena

Faktor nekroze tumora (TNF $\alpha$ ) je jedan od glavnih medijatora imunskog odgovora na infektivne agense. Njegova uloga je između ostalih pojačavanje destrukcije vezivnog tkiva i kosti putem pojačanog stvaranja i aktivnosti osteoklasta. TNF $\alpha$  ima važnu ulogu u inflamatornoj osteoklastogenezi baziranoj na potencijalu da direktno indukuje koštani gubitak i da pojačava osteoklastnu aktivnost. Sama lokacija gena za TNF $\alpha$  na kratkom kraku hromozoma 6 u HLA III lokusu glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC) ukazuje na važnu ulogu njegovog produkta u imunskim reakcijama, pre svega inflamaciji. Produkcija TNF $\alpha$  je delom regulisana na nivou transkripcije koja je povezana sa polimorfizmima ovog gena u promotorskim sekvencama za koje se vezuju transkripcioni faktori.

U našem istraživanju za analizirani polimorfizam u TNF  $\alpha$  genu na poziciji -308 je utvrđeno postojanje razlike u učestalosti genotipova između grupe ispitanika sa i bez periimplantitisa ( $p < 0.0001$ ). Dok je u grupi ispitanika sa periimplantitisom najvišu učestalost imao heterozigotni genotip (53%), u grupi ispitanika bez periimplantitisa je najviša zastupljenost bila zabeležena u slučaju mutiranog GG genotipa (87%). *Wild type* genotip je u obe grupe bio jednake učestalosti kod obe grupe ispitanika.

Učestalosti alela između ove dve grupe ispitanika su pokazale da je postojala statistički značajna razlika. U obe grupe ispitanika je zabeležena viša učestalost alela G, pri čemu se u grupi ispitanika bez periimplantitisa javljao sa učestalošću od 93%, a u grupi ispitanika sa periimplantitisom u 71% slučajeva.

U literaturi najviše podataka postoji za polimorfizam u promotorskom regionu TNF $\alpha$  gena -308 G $\rightarrow$ A. Ovaj polimorfizam je definisan sa dve alelske forme, prva u kojoj guanin definiše uobičajeni *wild type* alel TNF1, i druga u kojoj adenin na ovom mestu definiše mutirani, ređi alel TNF2. U populaciji belaca 60-70% je homozigot za TNF1 alel, 30-40% su heterozigoti, dok su svega 1.5-3% homozigoti za TNF2 alel (Cury i sar., 2007).

Analiziranjem TNF $\alpha$  -308 ustanovljena je značajna povezanost AG genotipa kao i G alela sa pojavom periimplantitisa što odgovara genetičkoj varijanti tranzicije G $\rightarrow$ A na poziciji 308 što dovodi do povećanja transkripcione aktivnosti ovog gena 2-3 puta. Poznato je da prisustvo navedene tranzicije G/A na poziciji 308 rezultuje povećanjem transkripcione aktivnosti gena TNF $\alpha$  (Nadel i sar., 1996). Naši rezultati odgovaraju

istraživanjima Duarta i sar., iz 2009 godine koji su uočili značajno povećanu transkripcionu aktivnost TNF $\alpha$  i povišenu ekspresiju u odmakloj fazi periimplantitisa u poređenju sa mukozitisom i inicijalnim periimplantitisom.

Kontroverzni rezultati su dobijeni u vezi sa povezanošću TNF $\alpha$ -308 genetičkog polimorfizma i parodontopatije. Uočeno je da ne postoje razlike u distribuciji TNF alela između pacijenata sa adultnom parodontopatijom i zdravih kontrola ili između pacijenata sa različitim stadijumom inflamacije (Craandijk i sar., 2002; Lin, 2003). Studija Craandijk i sar 2002 je pokazala značajno veću učestalost homozigota GG u odnosu na kontrole što se može smatrati faktorom rizika za podložnost parodontopatiji. Oni nisu pronašli udruženost polimorfizma ispitivanih TNF gena na pozicijama -376,-308, -238 i +489 sa faktorima rizika i sklonosti ka parodontopatiji.

Rezultati ovih studija (Craandijk i sar., 2002; Lin, 2003), kao i mnogih drugih vezanih za istraživanja genetičkih polimorfizama, ukazuju na činjenicu da se pri izučavanju sklonosti mora voditi računa o razlikama koje postoje između populacija. U tom smislu, posebnu pažnju treba obratiti na postojanje populacionih razlika u distribuciji genotipova polimorfizama gena čiji su produkti uključeni u odgovor organizma na inflamaciju (Waterer, 2003).

Daljom analizom povezanosti ispitivanog polimorfizma i faktora rizika u našem istraživanju uočen je trend smanjene učestalosti *wild type* GG genotipa kod ispitanika sklonih periimplantitisu. Na nivou celokupne grupe ispitanika (sa i bez periimplantitisa) u slučaju ispitivanog polimorfizma TNF $\alpha$ -308, uočena je značajna asocijacija sa istorijom parodontopatije (p=0.003), gingivalnim indeksom (p=0.02) i sa dubinom džepa (p=0.029). Sa druge strane, nije nađena povezanost proučavanog polimorfizma TNF $\alpha$  gena sa etiološkim i kliničko patološkim odlikama u grupi ispitanika sa, kao i u grupi ispitanika bez periimplantitisa. Naši rezultati u kojima se uočava postojanje razlike u distribuciji genotipova TNF  $\alpha$  polimorfizma između ove dve grupe ispitanika mogu ukazati na potencijalnu ulogu u sklonosti ka razvoju periimplantitisa.

Uvidom u dostupnu literaturu nailazi se i na podatke koji ukazuju da je polimorfizam TNF $\alpha$ -308 povezan sa različitim hroničnim oboljenjima među kojima je i parodontopatija (Barton i sar., 2001). Za ovaj polimorfizam je pokazano da ima uticaj na povećani nivo transkripcije RNK i sinteze ovog citokina (Aguillon i sar., 2006). U

istraživanjima Cury i sar., na Brazilskoj grupi ispitanika iz 2007 godine, distribucija 3 TNF $\alpha$  genotipa (AA, AG, GG) na poziciji 308 je bila statistički značajno povezana sa ishodom implantološke terapije. U ovoj studiji je pokazano da je heterozigotni AG genotip značajno više prisutan u grupi sa periimplantitisom, pokazujući time 5 puta veći rizik za nastanak periimplantitisa, dok je GG genotip protektivan, što se dodatno potvrđuje i značajno višom zastupljenošću GG genotipa kod zdravih kontrola. U u istoimenoj studiji, analiza alelske distribucije je pokazala povećani rizik za periimplantitis kod nosioca A alela. Nije pronađena povezanost sa marginalnim koštanim gubitkom, a u ispitivanoj grupi pacijenatanije nađena povezanost sa nivoima PICF, kao ni sa koncentracijom citokina.

Cury i sar., su 2009 godine nastavili istraživanja na Brazilskoj grupi ispitanika i u ovom istraživanju nije nađena statistički značajna povezanost između polimorfizma gena za TNF $\alpha$  i periimplantitisa. Polimorfizam TNF $\alpha$ -308 nije povezan sa povećanim rizikom od periimplantitisa. U ovu grupu rezultata u kojima nije nađena statistička značajnost ubraja se i studija Camposa i sar, iz 2004 godine, u kojoj takođe nije uočena povezanost TNF $\alpha$ -308 polimorfizma sa ranim implantatnim neuspehom u Brazilskoj grupi ispitanika.

#### **5.2.4. Polimorfizam rs1800795 gena za IL6**

Gen za citokin IL6 se nalazi na hromozomu 7p21. IL6 spada u grupu citokina koji su prvi okarakterisani, čija je uloga u regulaciji ekspresije gena za proteine akutne faze ispitana i dokazana. Akutno-fazni proteini su uključeni u sistemski odgovor organizma na različite invazivne agense kao što su mikroorganizmi, mehanička trauma, radijacija, dejstvo toksičnih agenasa. Zbog povezanosti IL6 sa regulacijom odgovora organizma na infektivne agense proučavan je u brojnim patološkim stanjima. Brojnim istraživanjima je ispitivana povezanost aktivnosti IL6 gena sa polimorfizmima u promotorskom regionu ovog gena. Najviše proučavani polimorfizam je identifikovan na poziciji -174 (C→G) koji se povezuje sa izmenjenom produkcijom IL6 (Shao i sar 2009). Za druge polimorfizme IL6 gena, smeštenih u promotorskom regionu, kao što su -572 (G/C) i -597 (G/A) polimorfizmi je pokazano da utiču na transkripciju gena, kako pojedinačno, tako i njihove haplotipske kombinacije. Sa tim u vezi, ističe se značaj izučavanja genetičkih varijacija u

promotorskom regionu IL6 gena, koji bi mogli da utiču na individualnu predispoziciju prema različitim bolestima. Poznato je da IL6 ima izuzetno značajnu ulogu u regulaciji odgovora organizama na inflamatorne agense.

Rezultati naših istraživanja su pokazali da postoji statistički značajna razlika u distribuciji genotipova za proučavani polimorfizam u IL6 genu između dve grupe ispitanika sa i bez periimplantitisa. Zabeleženo je odsustvo heterozigotnog i mutiranog genotipa u grupi ispitanika sa periimplantitisom, dok je u grupi ispitanika bez periimplantitisa zabeleženo samo odsustvo mutiranog genotipa CC. U grupi ispitanika sa periimplantitisom je posledično uočeno odsustvo mutiranog C alela, koji se u grupi ispitanika bez periimplantitisa javljao sa učestalošću od 16.5 %. Na osnovu dobijenih rezultata možemo pretpostaviti da bi polimorfizam na poziciji -174 IL6 gena mogao potencijalno biti povezan sa genetičkom sklonošću ka periimplantitisu.

U istraživanju povezanosti između podložnosti hroničnoj parodontopatiji ili periimplantitisu i IL6-174 genetičkog polimorfizma u Brazilskoj populaciji nađene su različite učestalosti genotipa GG i alela G između grupe zdravih i grupa sa različitim stepenom inflamacije. CC genotip je u većini slučajeva bio zajednički za sve ispitivane grupe. Kada je u pitanju periimplantitis odds ratio je pokazao da osobe sa GG genotipom i alelom G je bio 1.53 ili 1.43 podložnije datom oboljenju. U proceni sklonosti ka periimplantitisu u odnosu na parodontopatiju, ispitanici sa alelom G su bili 2.08 puta podložniji ka periimplantitisu (Casado i sar., 2013). U drugom radu Casado i sar., (2013) ispitivano je da li hronična parodontopatija predstavlja faktor rizika za nastanak periimplantitisa. Nađena je značajna korelacija između istorije parodontopatije i periimplantitisa ( $p < 0.0001$ ). Ispitanici sa prethodnom parodontopatijom su imali 4 puta veću šansu za razvoj periimplantitisa u odnosu na ispitanike sa zdravim tkivom. Opšti zaključak je bio da istorija parodontopatije kao faktor rizika utiče na razvoj periimplantitisa, bez obzira na godine ispitanika i regiju ugrađenog implantata.

U prethodno sprovedenoj studiji uočena je povećana učestalost GG genotipa polimorfizma IL6-174 kod ispitanika sa parodontopatijom (Franch-Chillida, 2010). IL6 gena na poziciji 148892 A/C bi mogao da bude faktor rizika za parodontopatiju (Galicía i sar., 2006).

U studiji Melo i sar 2012-te godine, takođe je uočena viša učestalost G alela i GG genotipa u grupi ispitanika sa periimplantitisom u poređenju sa kontrolnom grupom, ali data razlika nije bila statistički značajna (Melo i sar., 2012).

Sa druge strane, uvidom u literaturu nalazimo da je prisustvo G alela bilo asocirano sa razvojem parodontopatije (Trevilatto, 2003, Tervonen, 2007). U ovim istraživanjima je dobijeno da je genotip GG statistički povezan sa sklonošću ka agresivnoj formi parodontopatije. Dodatno, studijama Moreira i saradnika 2007 godine ispitivana je povezanost povećane ekspresije IL6 kao posledice genetičkog polimorfizma i korelacija sa stepenom progresije parodontopatije u populaciji Brazilaca. Nepušači sa umerenom parodontopatijom i kontrole ispoljavaju veću učestalost GG genotipa. Ustanovljeno je da se za teže oblike parodontopatije vezuje povećana IL6 ekspresija i IL6-174 polimorfizam.

Homozigoti za C alel su ređe podložni parodontopatiji, dok su nosioci G alela podložniji. Inače ekspresija IL6 je kompleksna i može zavisiti od prisustva drugih polimorfizama gena (Shou i sar., 2006).

Iako je u radu Laine i saradnika iz 2010 godine nađeno da IL6-174 polimorfizam može biti povezan sa podložnosti ka hroničnoj parodontopatiji, meta analiza IL6-174 polimorfizma nije pokazala povezanost ovog polimorfizma sa hroničnom parodontopatijom (Nikolopoulos i sar 2008)

Studijom Franch-Chillida iz 2010 godine, utvrđeno je da je heterozigotni GC genotip udružen sa nižim stepenom parodontopatije uz objašnjenje da navedene asocijacije najverovatnije potiču od protektivne funkcije alela C koje je povezano sa redukovanom produkcijom IL6 citokina (Franch-Chillida, 2010). IL6-174 polimorfizam je pokazao povezanost sa parodontalnim statusom kod nepušača i starijih osoba u populaciji Indije. Ova povezanost može biti posredovana efektima IL6 na inflamatorni odgovor.

Studijom Scapolii i sar., iz 2012 godine je pokazano da nosioci C alela imaju niži rizik za razvoj parodontopatije.

S obzirom da u našoj studiji za proučavani polimorfizam u IL6 genu nije zabeleženo prisustvo heterozigotnog niti mutiranog genotipa u grupi ispitanika sa

periimplantitisom, *crude i adjusted Odds Ratio* vrednosti za dati polimorfizam nisu računane.

### 5.2.5 Polimorfizam rs1800896 IL10 gena

Promotor gena za humani IL10 izrazito je polimorfan, gde su najčešće proučavani polimorfizmi smešteni na pozicijama -1082 (G/A), -819 (C/T), -592 (C/A) i 3575 (T/A). Pokazano je sa su navedeni polimorfizmi povezani sa izmenjenom sintezom IL10 u odgovoru na inflamatorne stimuluse (Scarel i sar., 2004). Imajući u vidu važnu ulogu IL10 u regulaciji/supresiji imunskog odgovora u inflamaciji, ispitivali smo da li su polimorfizmi promotorske sekvence IL10 u našoj populaciji povezani sa sklonošću ka razvoju periimplantitisa. Ovom doktorskom disertacijom je ispitivan rs1800896 polimorfizam na poziciji, koji predstavlja izmenu guanina adeninom na poziciji -1082.

Naši rezultati su pokazali da postoji statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između dve grupe ispitanika. U grupi pacijenata sa periimplantitisom, najzastupljeniji je bio heterozigotni AG genotip (82%), a potom *wild type* AA (18%), dok nije zabeleženo postojanje mutiranog genotipa. Sa druge strane, u grupi ispitanika bez periimplantitisa, *wild type* AA genotip se javljao sa najvišom učestalošću (39%), za kojim sledi mutirani GG (34%) i heterozigotni AG genotip (27%).

Što se tiče učestalosti alela ispitivanog polimorfizma IL10 gena nije zabeleženo postojanje statistički značajne razlike u distribuciji između ispitivanih grupa u našoj studiji.

Daljom analizom povezanosti ispitivanog polimorfizma i rizika za razvoj periimplantitisa, uočeno je da je heterozigotni AG genotip bio povezan sa značajno povišenim rizikom za razvoj periimplantitisa u odnosu na *wild type* genotip (OR= 8.406,  $p < 0.0001$ ). U slučaju združenog heterozigotnog i mutiranog genotipa u poređenju sa *wild type* genotipom zabeležen je takođe povišen rizik (OR=3.035,  $p = 0.039$ ).

Rezultati našeg istraživanja potvrđuju pretpostavku značajnog doprinosa polimorfizma gena za IL10<sup>-1082</sup> na poziciji u razjašnjavanju genetičke predispozicije za razvoj sklonosti ka periimplantitisu.

Studijom Pigossi i saradnika iz 2012-te je ispitivana povezanost polimorfizama IL10 gena -1082, -819 i -592 sa gubitkom dentalnog implantata (Pigossi i sar., 2012). U navedenoj studiji, multipla regresiona analiza je pokazala postojanje povezanosti između neuspeha dentalnog implantata jedino sa -819 (C/T) polimorfizmom IL10 gena. Dodatno, istoimenom studijom je pokazano da su navedena tri polimorfizma IL10 gena povezana sa visokom *in vitro* produkcijom IL10 i autoimunskim oboljenjima.

Ispitivanje povezanosti IL10 genskog polimorfizma sa parodontopatijom u populaciji Japanaca je pokazala da nijedan od haplotipova nije povezan sa parodontopatijom i da je zastupljenost G alela na poziciji -1082 kod ovih pacijenata relativno niske učestalosti (Yamazaki, 2003). Međutim u ovoj studiji značajno visoka učestalost IL10-1082 AA genotipa je nađena u ispitivanoj grupi pacijenata sa parodontopatijom u poređenju sa kontrolama, te se AA genotip može razmatrati kao potencijalni rizičan genotip za sklonost ka parodontopatiji. S druge strane značajno niža učestalost heterozigotnog genotipa je nađena između ispitanika i kontrola i ovaj genotip bi se mogao smatrati protektivnim kada je u pitanju sklonost ka parodontopatiji. Nasuprot ovakvim nalazima, drugom studijom su dobijeni potpuno oprečni rezultati. Naime, GG genotip je bio značajno više zastupljeniji kod osoba sa parodontopatijom u odnosu na zdrave kontrole (Berglundh i sar., 2003). Postojanje nekonzistencije između rezultata različitih studija bi se moglo objasniti postojanjem populacionih razlika u učestalosti alela i genotipova ispitivanih polimorfizama, ali i veličinom studijske grupe i kriterijumima koji su primenjeni prilikom selekcije ispitanika za studiju.

Reichert i sar 2008 su pokazali da alel A utiče na povećani rizik od razvoja hronične parodontopatije, što je povezano sa niskim nivoom ekspresije IL10. Osim imunoregulatornog efekta IL10, ovaj citokin ima i sposobnost pojačavanja proliferacije B ćelija i određenih autoreaktivnih B ćelija, što je utvrđeno u slučaju postojanja povezanosti između IL10-1082 polimorfizma i agresivne parodontopatije. Oko 40-50% B ćelija u perifernoj krvi osoba koje su sklone parodontopatiji pokazuju osobine autoreaktivnosti, dok manje od 15% cirkulišućih B ćelija kod starije grupe ispitanika ispoljava ove markere. Parodontalne lezije odraslih osoba sadrže veći broj B ćelija kod kojih 30% pokazuje autoreaktivne karakteristike. Takođe, kod osoba sklonih parodontopatiji cirkulišuće i B ćelije imaju veći procenat autoreaktivnih



svojstava u odnosu na B ćelije pacijenata sa niskom podložnošću ka parodontopatiji (Turner, 1997; Berglundh, 2002; Crawley, 1999).

Iako je ovom doktorskom disertacijom analiziran samo jedan polimorfizam IL10 gena, dobijeni rezultati ukazuju na postojanje asocijacije ispitivanog polimorfizma i periimplantitisa.

#### **5.2.6. Povezanost faktora rizika sa polimorfizmima gena za citokine**

Etiološki faktori koji značajno doprinose nastanku periimplantitisa su bakterijska infekcija i biomehanički faktori povezani sa prekomernim opterećenjem implantata u funkciji (Zitzmann i sar., 2008).

Akumulacija plaka do koje dolazi kao posledica bakterijske infekcije se smatra važnim faktorom u nastanku oboljenja. Klinički tok oboljenja zavisi od intenziteta odgovora domaćina na bakterijsku infekciju. Variranja u smeru oboljenja se mogu pripisati faktorima koji dodatno mogu uticati na razvoj i tok oboljenja.

Dosadašnja istraživanja o sklonosti ka periimplantitisu su ukazala na to da određeni faktori rizika, iako nisu direktno povezani sa nastankom periimplantitisa, ukoliko su prisutni doprinose povećanom riziku za nastanak sklonosti ka periimplantitisu, utičući na jedan ili više uzročnika ove infekcije. Najčešće istraživani faktori koji zavise od domaćina bili su pušenje, nasledna i porodična sklonost ka parodontopatiji i pol. Uzimajući u obzir činjenicu da se u ispitivanju uticaja faktora rizika za nastanak periimplantitisa najčešće sreće njihovo udruženo delovanje, postoje značajna ograničenja u proceni značaja pojedinog faktora rizika.

U ovoj studiji ispitivana je povezanost između proučavanih polimorfizama u CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra genima sa etiološkim faktorima kao i sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitivane grupe pacijenta sa periimplantitisom. Nije pronađena statistički značajna veza između analiziranih polimorfizama u CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra genima i kliničko patološkim odlikama.

Dubina periimplantnog džepa (engl. probing depth PD) je najčešće indikator gubitka kosti, jer je utvrđeno da povećanje dubine peri-implantnog džepa tokom vremena odslikava gubitak meko tkivnog pripoja kao i gubitak potporne kosti (Lang i sar., 1993). Treba naglasiti da se dubina džepa koja se meri prilikom sondiranja indirektno

povezuje sa povećanim anaerobnim uslovima što može da se koristi i kao indikator za stimulaciju LPS-om. Dubina džepa veća od 3mm ukazuje obično i na potencijalan gubitak nivoa kosti, što ukazuje na važnost ovog parametra.

Za gingivalni indeks se smatra da je indeks koji najvernije odslikava zapaljenje tkiva oko zuba ili implantata. Istraživanja u kojima je praćena klinička slika oko implantata je pokazala postojanje pozitivne korelacije sa proinflamatornim citokinima, a negativnu sa antiinflamatornim citokinima (Petkovic i sar., 2010).

Našim istraživanjem je pokazano da su pol, indeks krvarenja, gingivalni indeks i dubina džepa bili statistički značajni faktori za pojavu periimplantitisa. Nakon multivarijantne analize, kao statistički značajne varijable ostale su samo pol i gingivalni indeks. Ipak, dobijeni rezultat za pol se u ovom istraživanju može zanemariti s obzirom da je studijska grupa obuhvatala homogenu grupu pacijenata odnosno mušku grupu ispitanika. Uzimajući to u obzir, nakon multivarijantne analize izdvojen je gingivalni indeks koji može biti razmatran kao nezavisan prognostički faktor.

Poslednjih godina istraživanjima je pokazano da faktori kao što su pušenje, metabolička oboljenja, slab kvalitet kosti, biomehanički faktori prilikom protetskog opterećenja dodatno utiču na proces oseintegracije i marginalni koštani gubitak. Ustanovljeno je postojanje uticaja pušenja na lošu prognozu prilikom implantološkog tretmana, a to utiče i na stopu uspeha same implantacije (Hinode i sar., 2006). Uticaj duvana može da poveća učestalost pojave periimplantitisa, hronične mukozalne inflamacije i koštane resorpcije oko implantata.

Bain i Moy 1993 su našli korelaciju između povećanja neuspešnosti implantološkog tretmana i unete količine duvana u organizam. Pušenje doprinosi modifikaciji imunološkog potencijala domaćina što ima uticaj na proces zarastanja i oseintegraciju implantata.

Pušenje se smatra faktorom rizika (bez obzira na genetičke polimorfizme) koji povećava rizik od periimplantatnog koštanog gubitka i povećava mogućnost ka potencijalnoj inflamaciji koja može dovesti do progresije periimplantitisa (Bain i Moy, 1993; Wilson i Nunn, 1999).

U istraživanjima Ekfeldt i saradnika, iz 2001 godine nađene su razlike za koje se smatralo da su indikativne što se tiče povećanog rizika od neuspeha kod pušača, ali nije postojala statistička značajnost. U studiji Haasa i sar., 1996, pronađeno je da su vrednosti različitih kliničkih parametara bili značajno lošiji kod pušača u poređenju sa nepušačima. Kan i sar., 1999, su istraživali efekte pušenja na opstanak implantata koji su imali maksilarne koštane graftove. Stepenn uspešnosti je bio znatno lošiji kod pušača kod kojih je jedna trećina implantata imala lošu prognozu. Nije pronađena korelacija između procenta neuspešnosti kod ugrađenih implantata i količine konzumiranih cigareta. Zaključeno je da pušači sa dentalnim implantatima imaju povećan rizik od razvoja periimplantitisa.

U studiji Laine i sar., 2006, pušenje se smatralo faktorom koji značajno utiče na konačan ishod implantacije. Sa druge strane, pojedine studije nisu našle statističku povezanost između pušenja i gubitka implantata (Levin i sar., 2005). Nosaka i sar., 2002 godine su proučavali rani marginalni koštani gubitak oko implantata i ustanovili da pušenje ne utiče na opstanak implantata. Zaključak većine studija je da pušenje doprinosi neuspehu implantacije, ali ne postoji dovoljno dokaza koji ukazuju na značajnost pušenja kao važnog faktora rizika u odsustvu drugih relevantnih faktora.

Proučavan je i efekat polimorfizama gena za citokine na stopu neuspeha implantata. U radovima Wilsona i sar., 1999 kao i Rogera i sar., 2002 nisu nađene razlike u stopi neuspeha implantacije shodno prisustvu različitog genotipa. U istraživanju Feloutzis i sar., 2002 došlo se do zaključka da kod ispitanika koji poseduju rizičan genotip postoji znatno veći koštani gubitak i to u grupi pušača u odnosu na nepušače.

Kada su u pitanju godine ispitanika, istraživanjima je utvrđeno da godine u većini slučajeva nisu relevantan faktor rizika za neuspeh implantata (Lambert i sar., 2000). Prisustvo infekcije, loše oralne higijene kao i učestale parodontopatije nepovoljno utiču na prognozu i uspešnost dentalnih implantata (Lambert i sar., 2000).

### **5.2.7. Povezanost polimorfizama gena za citokine IL6, IL10 i TNF $\alpha$ sa lokalnom produkcijom citokina**

Značaj citokina IL6, IL10 i TNF $\alpha$  u patogenezi periimplantitisa pokazan je u radu Candel-Martí i saradnika iz 2011-te godine u kome je dat pregled rezultata istraživanja lokalne produkcije citokina kod ispitanika sa periimplantitisom. Većina autora je pokazala značaj IL6 u indukciji koštane resorpcije gde povećani nivoi ovih citokina mogu ukazati na destrukciju periimplantatnog tkiva. IL10 je smatran markerom periimplantanih oboljenja koji pospešuje antiinflamatorni efekat i na to je ukazala grupa istraživača na čelu sa Liskaman 2004 godine. Ova grupa istraživača je nakon dobijenih rezultata predložila upotrebu IL6 i IL10 citokina kao markera tkivne destrukcije (Liskman 2004, Salcetti 1997, Kontinen 1991). Za proinflamatorni citokin TNF $\alpha$  je pokazano postojanje povišene koncentracije u slučaju periimplantitisa.

Detektabilnost i koncentracija citokina variraju između pojedinaca i pokazano je da se menjaju pod uticajem genetičkih faktora i sredine. Polimorfizmi nukleotidne sekvence gena za citokine mogu da utiču na ekspresiju gena, stabilnost iRNK i/ili strukturu proteina, sa dokazanim patološkim efektima (Frazer 2009). Sa tim u vezi, moglo bi se pretpostaviti da polimorfizmi u genima mogu potencijalno uzrokovati pojavu različitih hroničnih bolesti, povećati rizik od infekcije i uticati na različiti ishod akutnih bolesti (Smith i sar., 2009).

Rezultati naših ispitivanja su pokazali da postoje različiti profili lokalno produkovanih medijatora kod ispitanika sa i bez periimplantitisa. Vrednosti TNF $\alpha$  se nisu značajno razlikovale između ove dve grupe ispitanika. U grupi ispitanika bez periimplantitisa došlo je do porasta prosečnih vrednosti koncentracije antiinflamatornog IL10, kao i IL6 u odnosu na grupu ispitanika sa periimplantitisom. Ustanovljeno je još da pojedini klinički parametri, kao što je povećani gingivalni indeks, menja odnose u detektovanim medijatorima lokalnog imunskog odgovora time što favorizuje TH2 odgovor sa dodatnim porastom antiinflamatornog IL10 i porastom vrednosti inflamatornog medijatora što verovatno menja gubitak kontrole nad kolonizacijom bakterija. Prema dostupnoj literaturi, još uvek nema rezultata ispitivanja koji povezuju polimorfizme gena za IL10, IL6 i TNF $\alpha$  sa detektovanim lokalnim koncentracijama ovih citokina. Rezultati ove doktorske teze ukazuju da se medijane koncentracije citokina IL6, IL10 i TNF $\alpha$  ne razlikuju u zavisnosti od genotipova ispitivanih polimorfizama u genima za navedene citokine.

Rezultati novijih radova sugerisali su da periimplantitis nastaje pre svega kao posledica dejstva patogena u sadejstvu sa odgovorom samog domaćina, što znači da je najverovatnije uslovljen aktivnošću gena koji kontrolišu produkciju citokina ( Heitz-Mayfield, 2014; Smeets 2014). Uprkos nekim nađenim povezanostima, autori su se ogradili da ovi rezultati koji povezuju polimorfizam gena za citokine sa periimplantitisom, mogu biti samo deo od očekivano velikog broja genetičkih faktora koji doprinose sklonosti ka razvoju periimplantitisa (Lee i sar 2014).

## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovu dobijenih rezultata ovog istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

- ◆ Između grupe ispitanika sa periimplantitisom i kontrolne grupe sa zdravim tkivom oko implantata uočena je razlika u distribuciji genotipova proučavanih polimorfizama u CD14, IL6, IL10 i TNF $\alpha$  genima. Uočena razlika u distribuciji genotipova bi mogla da ukaže na potencijalnu ulogu navedenih polimorfizama u sklonosti ka razvoju periimplantitisa.
- ◆ Uočena je statistički značajna razlika u distribuciji alela u slučaju proučavanih polimorfizama u IL6, TNF $\alpha$  i CD14 genima između grupe ispitanika sa i bez periimplantitisa.
- ◆ Nije pronađena statistički značajna veza između analiziranih polimorfizama u CD14, IL6, IL10, TNF $\alpha$  i IL1ra genima i kliničko patoloških odlika ispitanika sa i bez periimplantitisa.
- ◆ U grupi ispitanika bez periimplantitisa statistička značajnost je zabeležena samo u slučaju indeksa krvarenja i proučavanog polimorfizma u CD14 genu, dok za ostale analizirane polimorfizme, nije pronađena veza sa etiološkim i kliničko-patološkim odlikama ispitivane grupe osoba bez periimplantitisa.
- ◆ Multivarijantnom analizom pokazano je da su pol i gingivalni indeks statistički značajni faktori rizika za nastanak periimplantitisa.
- ◆ Statistički značajne razlike u koncentraciji ispitivanih citokina (IL12, IFN $\gamma$ , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) u grupi sa periimplantitisom uočene su za IL8 i IL5, dok je u grupi bez periimplantitisa postojala statistički značajna razlika za IL10, IL6 i IL4.
- ◆ Utvrđeno je da su u grupi ispitanika sa periimplantitisom prosečne vrednosti IL8 kao jedinog određivanog hemokina bile su skoro 30 puta veće od vrednosti IL8 detektovanih u grupi ispitanika bez periimplantitisa.
- ◆ Periimplantitis indukuje različitu dinamiku promene vrednosti IL5 i IL6 u zavisnosti od tipa implantata. U grupi sa I tipom implantata periimplantitis povećava prosečne vrednosti, dok u grupi sa implantatima tipa II periimplantitis snižava prosečne vrednosti ovih citokina.

- ◆ U grupi ispitanika sa implantatima tipa II statistička značajnost postojala je za IFN $\gamma$  i IL4 u uzorcima sa periimplantitisom u odnosu na ispitanike sa istim tipom implantata što navodi na zaključak da je u grupi sa ovim tipom implantata perimplantitis indukovao značajan rast IFN $\gamma$ .
- ◆ Kada se analiziraju svi ispitivani citokini detektovani u uzorcima PICF ispitanika sa različitim tipom implantata u odnosu na periimplantitis, uočljiv je potpuno drugačiji tip lokalnog odgovora na nastalu inflamaciju.
- ◆ U grupi ispitanika sa tipom I implantata, manifestni periimplantitis je povezan sa povećanjem prosečnih vrednosti svih ispitivanih citokina (IFN $\gamma$  IL10, IL8, IL6, IL4, IL5, IL1 $\beta$  TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) sem IL2, čije se vrednosti snižavaju.
- ◆ U grupi bolesnika sa tipom II implantata, manifestni periimplantitis povezan je sa porastom IFN $\gamma$ , IL2, IL4, IL1 $\beta$  i TNF $\alpha$ , dok su prosečne vrednosti IL5, IL6, IL8, IL10 i TNF $\alpha$  niže od pacijenata bez periimplantitisa.
- ◆ Najmanji gingivalni indeks je povezan sa visokim koncentracijama IL2, IL1 $\beta$  i TNF $\beta$ . Povećanje vrednosti gingivalnog indeksa povezana je sa visokim koncentracijama IFN $\gamma$ , IL4 i TNF $\alpha$ , dok su najveće vrednosti gingivalnog indeksa povezane sa visokim koncentracijama IL10, IL8 i IL5.
- ◆ Odsustvo plaka povezano je sa visokim koncentracijama IL2, IL10, IL6 i TNF $\alpha$ , dok je razvoj plaka povezan sa visokim koncentracijama IFN $\gamma$ , IL8, IL4 i IL5 u PICF.
- ◆ Vrednosti IL1 $\beta$  i TNF $\alpha$  detektovani su u PCIF kod svih grupa, uglavnom nezavisno od vrednosti PI
- ◆ Prema dubini perimplantnog sulkusa ispitanici su podeljeni u grupe . Prosečne vrednosti IL5 kao i IL8 imale su isti trend značajnog porasta u grupi ispitanika koje su imale dubinu džepa periimplantnog sulkusa veću od 5 mm
- ◆ U grupama ispitanika sa dubinom džepa do 3mm uočeno je povećanje koncentracija IFN $\gamma$ , IL6, IL4, TNF $\alpha$  i TNF $\beta$ .



## **7. LITERATURA**

- Aboyoussef** H, Carter C, Jandinski JJ, Panagakos FS. Detection of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases in implant crevicular fluid. *Int J Oral Maxillofac Implants*; 13(5):689-96, 1998.
- Adell** R, Lekholm U, Rockler B, Branemark P, Lindhe J, Eriksson B, Sbordone L. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1986; 15: 39-52
- Aguillón** J, Cruzat. Could single-nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting the tumour necrosis factor promoter be considered as part of rheumatoid arthritis evolution? *Immunobiology*, 2006; 211: 75-84.
- Albert** P. What is a functional genetic polymorphism? Defining classes of functionality. *J Psychiatry Neurosci*. 2011; 36(6):363-365.
- Albouy** J, Abrahamsson I, Berglundh T. Spontaneous progression of experimental peri-implantitis at implants with different surface characteristics. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*. 2012; 39: 182–187.
- Albrektsson** T, Isidor F. Consensus report: implant therapy. In: Lang, N. P. & Karring, T. (eds). *Proceedings of the 1<sup>st</sup> European Workshop on Periodontology*, 1994: 365–369. Berlin: Quintessence.
- Aoki** M, Takanashi K, Matsukubo T, Yajima Y, Okuda K, Sato T, Ishihara K. Transmission of Periodontopathic Bacteria from Natural Teeth to Implants. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 2009.
- Andreiotelli** M, Koutayas SO, Madianos PN, Strub JR. Relationship between interleukin-1 genotype and peri-implantitis: a literature review. *Quintessence Int*. 2008 ; 39(4): 289-98.
- Arikan** F, Buduneli N, Kütükçüler N. Osteoprotegerin levels in peri-implant crevicular fluid. *Clinical Oral Implants Research* 2008; 19:283-8.
- Armitage** G. Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontology 2000*, 2004. 34: 109-119.
- Armitage** GC, Robertson PB. The biology, prevention, diagnosis and treatment of periodontal diseases: scientific advances in the United States. *J Am Dent Assoc*, 2009; 140 Suppl 1:36S-43S.
- Ataoglu** H, Alptekin NO, Haliloglu S, Gursel M, Ataoglu T, Serpek B, Durmus E. Interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha levels and neutrophil elastase activity in peri-implant crevicular fluid. *Clin Oral Implants Res*, 13(5): 470–476 (2002).
- Bain** C, Moy P. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 1993; 8: 609–615.
- Baldini** M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A Polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20 (5): 976–983.
- Baron** M, Haashe R. Experimentally Induced Peri-implantitis. A Review of Different Treatment Methods Described in the Literature. *International Journal of Oral &*

*Maxillofacial Implants* 2000; 15: 533–544.

- Barton A**, John S. Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians. *Arthritis & Rheumatism*. 2001; 44(1): 61-65.
- Belibasakis G**, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* 2012; 39: 239–248
- Bendre MS**, Montague DC, Peery T, Akel NS, Gaddy D, Suva LJ. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone* 2003, 33:28–37.
- Berglundh T**, Lindhe J, Marinello C, Ericsson I, Liljenberg, B. Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 1992; 3: 1–8.
- Berglundh T**, Liljenberg B, Tarkowski A, Lindhe J. The presences of local and circulating autoreactive B cells in advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002; 29:281- 286.
- Berglundh T**, Abrahamsson I, Lang N, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. A model study in the dog. *Clinical Oral Implant Research*. 2003; 14: 251–262.
- Berglundh T**, Zitzmann N, Donati M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *Journal of Clinical Periodontology* 2011; 38 : 188–202.
- Birkedal-Hansen H**. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res*.1993; 28: 500-10.
- Blakemore A**, Tarlow J, Cork M, Gordon C, Emery P, Duff G. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a disease severity factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1994; 37:1380-1385.
- Bloemen V**, Schoenmaker T, de Vries TJ, Everts V. (). Direct cell-cell contact between periodontal ligament fibroblasts and osteoclast precursors synergistically increases the expression of genes related to osteoclastogenesis. *J Cell Physiol*, 2010; 222: 565-573.
- Bordin S**, Flemmig TF, Verardi S. Role of fibroblast populations in peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009; 24:197-204.
- Branemark P**. Osseointegration and Autogenous Onlay Bone Grafts. Reconstruction of the Edentulous Atrophic Maxilla, 2001, Quintess Publ CO, Chicago.
- Brill N**, Bjorn H. Passage of tissue fluid into human gingival pockets. *Acta Odontol Scand*. 1959; 17:11-21.
- Brock GR**, Butterworth CJ. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol* 2004; 31(7): 515-21.
- Brunelli G**, Carinci F, Zollino I, Candotto V, Scarano A, Lauritano D. Peri-implantitis. A case report and literature review. *European Journal of Inflammation*. 2012;10:1-6.
- Buduneli M**, Kinane D. Host derived markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 2011; 38: 85-105.

- Cajado C**, Cerqueira V. TNF-alpha and IL-8. Serum levels and gene polymorphisms are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. *Cytokine* 2011; 56(2): 312-317.
- Campos M**, dos Santos M, Trevilatto P, Scarel-Caminaga R, Bezerra F, Line SR. Early failure of dental implants and TNF-alpha (G-308A) gene polymorphism. *Implant Dent*. 2004; 13(1):95-101.
- Campos M**, Santos M, Trevilatto P, Scarel-Caminaga R, Bezerra F, Line S. Evaluation of the relationship between interleukin-1 gene cluster polymorphisms and early implant failure in non-smoking patients. *Clinical Oral Implants Research*. 2005; 16(2):194-201.
- Candel-Martí M**, Flichy-Fernández A, Alegre-Domingo T, Ata-Ali J, Peñarrocha-Diag M. Interleukins IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and periimplant disease. An update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Jul 1;16 (4):e518-21.
- Carinci F**, Girardi A, Palmieri A, Martinelli M, Sca-poli L, Avantiaggiato A. Genetic susceptibility in periodontal disease. *European Journal of Inflammation*. 2012; 10: 99-101.
- Casado P**, Villas-Boas R, de Mello W, Duarte ME, Granjeiro JM. Peri-implant disease and chronic periodontitis: is interleukin-6 gene promoter polymorphism the common risk factor in a Brazilian population? 2013; 28(1):35-43.
- Chakravarthi A**. Single nucleotide polymorphism to a future of genetic medicine. *Nature* 2001; 409: 822-3.
- Cochran D**. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of Periodontology* 2008; 79 Suppl 8: 1569-1576.
- Collin-Osdoby P**, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P. Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 2011; 276: 20659-20672.
- Cosgarea R**, Dannewitz B, Sculean A, Bran S, Rotaru H, Baciut G, Eick S. *Bacterial and inflammatory behavior of implants in the early healing phase of chronic periodontitis. Quintessence international*, 2012; 43(6): 491-501.
- Costerton JW**, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol*. 1994 ;176(8): 2137-42.
- Craandijk J**, van Krugten MV, Verweij CL, van der Velden U, Loos BG. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002; 29:28-34.
- Crawley E**, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999; 42: 1101-110.
- Curtis DA**, Kao R, Plesh O, Finzen F, Franz L. Crevicular fluid analysis around two failing dental implants a clinical report. *J Prosthodont* 6(3): 210-214, 1997.
- Cury P**, Joly J, Freitas N, Sendyk W, Nunes F, de Arajo N. Effect of tumor necrosis factor-

- alpha gene polymorphism on peri-implant bone loss following prosthetic reconstruction. *Implant Dent*, 2007; 16:80-88.
- Cury P**, Horewicz V, Ferrari D. Evaluation of the Effect of Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene Polymorphism on the Risk of Peri-implantitis: A Case-Control Study. *Int J Oral Maxillofac Implants* . 2009; 24:1101-05.
- Cutler CW**, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol 2000*, 2004; 35: 135–157.
- Darveau RP**. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews. Microbiology*, 2010; 8: 481-490.
- De Boever A**, Quirynen M, Coucke W, Theuniers G, De Boever J. Clinical and radiographic study of implant treatment outcome in periodontally susceptible and nonsusceptible patients: a prospective long-term study. *Clinical Oral Implant Researc*. 2009; 20: 1341–1350.
- Dereka X**, Mardas N, Chin S , Petrie A, Donos N. A systematic review on the association between genetic predisposition and dental implant biological complications. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23(7): 775-88.
- Demmer R**, Behle J, Wolf D, Handfield M, Kebschull M, Celenti R. Transcriptomes in healthy and diseased gingival tissues. *J Periodontol*. 2008; 79: 2112-24.
- Dennison D**, Van Dyke T. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*. 1997; 14:54-78.
- Dinarello C**. Interleukin 1, Interleukin 1 receptors and interleukin 1 receptor antagonist. *International Reviews of Immunology*.1998 ;16: 457-99.
- Donati M**, Berglundh T, Hytönen A, Hahn-Zoric M, Hanson L, Padyukov L. Association of the -159 CD14 gene polymorphism and lack of association of the -308 TNFA and Q551R IL-4RA polymorphisms with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *Journal of Clinical Periodontology*. 2005; 32, (5): 474–479.
- Dominici R**, Cattaneo M, Malferrari G, Archi D, Mariani C, Grimaldi L. Cloning functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin 1 alpha. *Immunogenetics* 2002; 54 (2): 82-6.
- Donati M**, Lijenberg B, Padykov L, Berlung T. Local Expression of Interleukin-10 and mCD14 in Relation to the -1087 IL-10 and -159 CD14 Gene Polymorphisms in Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology* 2008;79 (3).517-4.
- Duarte P**, de Mendonca A, Maximo M, Santos V, Bastos M, Nociti Junior F. Differential cytokine expressions affect severity of peri-implant disease. *Clinical Oral Implants Research*. 2009; 20: 514–520.
- Ekfeldt A**, Christiansson U, Eriksson T. A retrospective analysis of factors associated with multiple implant failures in maxillae. *Clinical Oral Implants Research*. 2001; 12:462-7.
- Ericsson I**, Berglundh, T, Marinello C, Liljenberg B, Lindhe J. Long-standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, 1999; 23:

99-103.

**Esposito M**, Grusovin M, Willings M. The Effectiveness of Immediate, Early, and Conventional Loading of Dental Implants. *International Journal of Oral Maxillofac Implants*. 2007;22:893-904.

**Feloutzis A**, Lang NP, Tonetti MS, Burgin W, Bragger U, Buser D. IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for peri-implant bone loss in a well maintained population. *Clin Oral Implants Res*. 2003; 14(1):10-7.

**Folwaczny M**, Glas J, Török HP, Limbersky O, Folwaczny C. Toll like receptor 2 and 4 mutations in periodontal diseases. *Clin Exp Immunol*. 2004;135:330-5.

**Frazer K**, Murray S, Scohrk N, Topol E. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nature Reviews Genetics*. 2009; 10: 241-251.

**Franch-Chillida F**, Nibali L, Madden I, Donos N, Brett P. Association between interleukin-6, polymorphisms and periodontitis in Indian non-smokers. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 137-144.

**Fujihashi K**, Beagley KW, Kono Y, Aicher WK, Yamamoto M, DiFabio S, Xu-Amano J, McGhee JR, Kiyono H. Gingival mononuclear cells from chronic inflammatory periodontal tissues produce interleukin (IL)-5 and IL-6 but not IL-2 and IL-4. *Am J Pathol*. 1993; 142(4):1239-50.

**Galicia J**, Tai H, Komatsu Y, Shimada Y, Ikezawa I, Yoshie H. Interleukin-6 receptor gene polymorphisms and periodontitis in a non-smoking Japanese population. *J Clin Periodontol*. 2006;33:704-9.

**Garlet G**, Cardoso C, Silva T. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiology and Immunology*. 2006; 21:12-20.

**Garlet G**. Destructive and Protective Roles of Cytokines in Periodontitis: A Reappraisal from Host Defense and Tissue Destruction Viewpoints. *J Dent Res*. 2010; 89(12): 1349-1363.

**Geivelis M**, Turner DW. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol* 1993; 64(10): 980-3.

**Gemmell E**, Seymour G. Immunoregulatory control of Th1 / Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2004; 35: 21-41.

**Gemmell E**, Yamasaki K, Seymour G. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13: 17-34.

**Gorska R**, Gregorek H, Kowalski J, Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 2003; 30: 1046-1052.

**Graves D**. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of*

- Periodontology*. 2008; 79, 1585-91.
- Graves D, Cochran D.** The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontolog.* 2003; 74:391-401.
- Gruica B, Wang H, Lang N, Buser D.** Impact of IL-1 genotype and smoking status on the prognosis of osseointegrated implants. *Clin Oral Implants Res.* 2004 ; 15(4): 393-400.
- Guncu GN, Akman AC, Gunday S, Yamalik N, Berker E.** Effect of inflammation on cytokine levels and bone remodelling markers in peri-implant sulcus fluid: a preliminary report. *Cytokine* 2012; 59: 313–316.
- Gualini, F, Berglundh, T.** Immunohistochemical characteristics of inflammatory lesions at implants. *Journal of Clinical Periodontology* 2003; 30: 14–18.
- Haas R, Haimbock W, Mailath G, Watzek G.** The relationship of smoking on periimplant tissue: a retrospective study. *Journal of Prosthetic Dentistry.* 1996; 76:592-6.
- Hayashi J, Masaka T, Ishikawa I.** Increased levels of soluble CD14 in sera of periodontitis patients. *Infect Immun* 1999; 67: 417-420.
- Hajishengallis G, Sojar H, Genco RJ, DeNardin E.** Intracellular signaling and cytokine induction upon interactions of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae with pattern-recognition receptors. *Immunological Investigations.* 2004; 33:157-72.
- Hamdy A, Ebrahim A.** The effect of interleukin-1 allele 2 genotype IL-1 $\alpha$  (-889) and IL-1 $\beta$  (+3954) on the individual's susceptibility to peri-implantitis: case-control study. *J Oral Implantol.* 2011; 37(3): 325-34.
- Hamlet S, Alfarsi M, George R, Ivanovski S.** **The effect of hydrophilic titanium surface modification on macrophage inflammatory cytokine gene expression.** *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23(5): 584-90.
- Hassel T, Harris E.** Genetic Influences in Caries and Periodontal Diseases. *Critical Reviews in Oral biology & Medicine.* 1995; 6(4): 319-342.
- Heitz-Mayfield L.** Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *Journal of Clinical Periodontology.* 2008; 35 (Suppl. 8): 292–304.
- Heitz-Mayfield L, Lang, N.** Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontology 2000*, 2010; 53: 167-81.
- Heitz-Mayfield LJ, Mombelli A.** The therapy of peri-implantitis: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014; 29 Suppl:325-45.
- Hinode D, Tanabe S, Yokoyama M.** Influence of smoking on osseointegrated implant failure. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17: 473-478.
- Hodge P, Michalowicz B.** Genetic predisposition to periodontitis in children and young adults. *Periodontol 2000*, 2001; 26: 113-134.
- Hofsetter W, Balga R, Jost-Albrecht K, Leunig M, Kokovic V.** Correlation of inflammatory and R. Felix, 2003. Inflammatory reactions to implant cytokines concentrations with clinical signs of materials and bone resorption: observations and periimplantitis. Institute for oral Transplantation and mechanisms. *European Cells and Materials*, 2002; 5: 13-14

- Holla** Li, Buckova D, Fassmann A, Halabala T, Vasku A, Vacha J. Promoter polymorphisms in the CD14 receptor gene and their potential association with the severity of chronic periodontitis. *J Med Genet*, 2002; 39: 844-8.
- Holmes** C L, Russell J. A, Walley K. R. Genetic Polymorphisms in Sepsis and Septic Shock: Role in Prognosis and Potential for Therapy. *Chest*, 2003; 124: 1103-1115.
- Hubacek** J, Rothe G, Pit'ha J, Skodova Z, Stanek V, Poledne R, Schmitz G (C(-260) >T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 99(25): 3218–3220.
- Hultin** M, Gustafsson A, Halstrom H, Johanson L, Ekfedelt A, Klinge B. Microbial findings and host response in patients with periimplantitis. *Clin Oral Impl Res* 2002; 13(4): 349-358.
- Imamura** T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontology* 2003; 74: 111-8.
- James** J, Poulton K, Haworth. Polymorphisms of TLR4 but not CD14 are associated with a decreased risk of aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 2007; 34( 2): 111–117.
- Jansson** H, Hamberg K, De Bruyn H, Bratthall G . Clinical consequences of IL-1 genotype on early implant failures in patients under periodontal maintenance. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005; 7(1): 51-9.
- Javed** F, Al-Hezaimi K, Salameh Z, Almas K, Romanos GE. Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Cytokine* 2011; 54(1): 8-12.
- Ji** S, Choi Y. Innate immune response to oral bacteria and the immune evasive characteristics of periodontal pathogens. *J Periodontal Implant Sci* 2013;43:3-11
- Jovanović** SA. Peri-implant tissue response to pathological insults. *Adv Dent Res* 1999; 13:82-86.
- Kao** RT, Curtis DA, Richards DW, Preble J. Increased interleukin-1 beta in the crevicular fluid of diseased implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995; 10(6): 696-701.
- Kalburgi** NB, Bhatia A, Bilichodmath S, Patil SR, Mangalekar SB, Bhat K. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Indian patients with chronic periodontitis. *J Oral Sci*. 2010; 52(3):431-7.
- Kammerer** P, Gabriel M, Al-Nawas B, Scholz T, Kirchmaier CM, Klein MO. **Early implant healing promotion of platelet activation and cytokine release by topographical, chemical and biomimetic titanium surface modifications in vitro.** *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23(4): 504-10.
- Kan** J, Rungcharassaeng K, Lozada J , Goodacre CJ. Effects of smoking on implant success in grafted maxillary sinuses. *Journal of Prosthetic Dentistry* 1999; 82: 307-11.
- Karoussis** I, Muller S, Salvi G, Heitz-May-field L, Bragger U, Lang N. Association between periodontal and peri-implant conditions: a 10-year prospective



- study. *Clinical Oral Implants Research*. 2004; 15:1–7.
- Kinane D**, Hart T. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2003;14:430.
- Kindt T**, Goldsby R, Osborne BA, Kuby J. *Immunology* (6 ed.) 2006 New York: W H Freeman and company.
- Kishimoto T**. Interleukin-6: from basic science to medicine 40 years in immunology. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23:1-21.
- Klein W**, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, Eitner K, Marx M, Duerig N, Eppel JT. A polymorphism in the CD14 gene is associated with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol*. 2002; 37:189–191.
- Klinge B**, Hultin M, Berglundh T. Peri-implantitis. *Dent Clin N Am* 2005; 49: 661-676.
- Klokkevoeld P**, Newman M. Current status of dental implants: a periodontal perspective. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2000; 15: 56–65.
- Kou P**, Schwartz Z, Boyan B, Babensee J. **Dendritic cell responses to surface properties of clinical titanium surfaces.** *Acta Biomater* 2011; 7(3): 1354-63.
- Könönen E**, Asikainen S, Alaluusua M, Könönen P, Summanen A, Kanervo, Jousimies-Somer H. Are certain oral pathogens part of normal oral flora in denture-wearing edentulous subjects? *Oral Microbiol. Immunol*. 1991; 6:119-122.
- Konttinen YT**, Lappalainen R, Laine P, Kitti U, Santavirta S, Teronen O. Immunohistochemical evaluation of inflammatory mediators in failing implants. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006;26(2):135–41.
- Lachmann S**, Kimmerle-Muller E, Axmann D, Scheideler L, Weber H, Haas R. Associations between peri-implant crevicular fluid volume, concentrations of crevicular inflammatory mediators, and composite IL-1A -889 and IL-1B +3954 genotype. A cross-sectional study on implant recall patients with and without clinical signs of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18(2):212-23.
- Laine M**, Leonhardt A, Roos-Jansaker A, Pena A, van Winkelhoff A, Winkel E. IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17(4):380-5.
- Laine M**, Loos B, Crielaard W. Gene polymorphisms in chronic periodontitis. *International Journal of Dentistry* 2010: 22.
- Lambert P**, Morris H, Ochi S. The influence of smoking on 3-year clinical success of osseointegrated dental implants. *Annals of Periodontology*. 2000; 5: 79- 89.
- Lang N**, Bragger U, Walther D, Beamer B, Kornman K. Ligature-induced periimplant infection in cynomolgus monkeys. I. Clinical and radiographic findings. *Clinical Oral Implants Research*. 1993; 4: 2–11.
- Lang N**, Berglundh T. Periimplant diseases: where are we now?—consensus of the seventh european workshop on periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 2011; 38: 178–181.
- Leber J**, Crimmins G, Raghavan S, Meyer-Morse N, Cox J, Portnoy D. Distinct TLR- and

- NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen. *PloS Pathog* 2008; 6-12.
- Lee S** , Kim J , Hwang J, Kim S , Lee J, Han D. Investigation of Pathogenic Genes in Peri-Implantitis from Implant Clustering Failure Patients: A Whole-Exome Sequencing Pilot Study. *PLoS ONE* 2014; 9(6): e99360.
- Lekholm U** Gunne J, Henry P, Higuchi K ,Linden U, Bergstrom C, van Steenberghe D. Survival of Branemark implant in partially edentulous jaws: a 10 year prospective multicenter study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 1999; 14: 639-645.
- Lekholm U**. Osseointegrated implants in the treatment of partially edentulous jaws: A prospective 5-year multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1994; 9; 627-635.
- Lerner UH**. Regulation of bone metabolism by the kallikrein-kinin system, the coagulation cascade, and the acute- phase reactants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 481-493.
- Levin L**, Schwartz-Arad D. The effect of cigarette smoking on dental implants and related surgery. *Implant Dent*. 2005 Dec; 14(4): 357-61.
- Lin L**, Pan Y, Yin L. Study on the correlation of cytokine gene polymorphism with chronic periodontitis. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2003; 12(6): 456-459.
- Lin Z**, Rios HF, Volk SL, Sugai JV, Jin Q, Giannobile W. Gene Expression Dynamics During Bone Healing and Osseointegration. *J Periodontol*. 2010.
- Lindhe J**, Berglundh T, Ericsson I, Liljenberg B, Marinello C. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. *Clinical Oral Implants Research*. 1992; 3: 9-16.
- Lindhe J**, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*; 2008: 35 (Suppl. 8): 282-285.
- Lindquist L**, Carlsson G, Jemt T. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clinical Oral Implants Research* 1996; 7; 329-336.
- Liskmann S**, Zilmer M, Vihalemm T, Salim O, Fischer, K. Correlation of periimplant health and myeloperoxidase levels: a cross sectional clinical study. *Clin Oral Impl Res* 2004;15: 546-52.
- Liu Y**, Lerner U, Teng Y. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontology 2000*, 2010; 52:163-206.
- Loos B** , Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontology 2000*, 2005; 39:53-72.
- Machtei E**, Oved-Peleg E, Peled M. Comparison of clinical, radiographic and immunological parameters of teeth and different dental implant platforms. *Clin Oral Impl Res*. 2006; 17(6):658-665.
- Mamalis A**, Markopoulou C, Vrotsos I, Koutsiliri M. Chemical modification of an

implant surface increases osteogenesis and simultaneously reduces osteoclastogenesis: an in vitro study. *Clinical Oral Implant Research* 2011; 22: 619–626.

**Matić S**, Stamatović N. Osnovi oralne implantologije. Beograd: Vojna štamparija, 2008 (Serbian)

**Matić S**, Stamatović N, Lazić Z, Petković- Ćurčin A, Bubalo M, Vojvodić D, Djurdjević D. Uticaj metode ugradnje dentalnih implantata na periimplantatni epitelni pripoj – eksperimentalna studija na psima. *Vojnosanit Pregl* 2010; 67: 236-243.

**Maximo M**, de Mendonca A, Alves J, Cortelli S, Peruzzo D, Duarte P. Peri-implant diseases may be associated with increased time loading and generalized periodontal bone loss: Preliminary re- sults. *The Journal of Oral Implantology*, 2008; 34: 268-273.

**Meiser H**, Schöttler D, Genius J, Lychi C, Gray A, Dörfer C. Polymorphism in the promoter of IL6 gene and periodontitis in a South German population. *J Dent Res* 2003; 82: 2818.

**Melo R**, Lopes B, Shibli J, Marcantonio Junior E, Marcantonio R, Galli G. Interleukin-1 beta and Interleukin-6 expression and gene polymorphisms in subjects with peri-implanta disease. *Clin Implant Dent Relat Res* 2011: 1708-1.

**Mengel R**, Stelzel M, Hasse C, Flores-de-Jacoby L. Osseointegrated implants in patients treated for generalized severe adult periodontitis. An interim report. *J Periodontol*. 1996;67:782-7.

**Michalowicz B**, Diehl S, Gunsolley J. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *Journal of periodontology*. 2000; 71: 1699-1707.

**Misch C**. Contemporary Implant Dentistry, 1999, 2nd ed., Mosby, St

**Mombelli A**, Lang NP. Clinical parameters for the evaluation of dental implants. *Periodontol 2000*. 1994; 4: 81–6.

**Mombelli A**, Lang N. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontology 2000*. 2008; 17: 63-76.

**Montes C**. Analyses of association of IL1B (C+3954T) and IL1RN (intron 2) polymorphisms with dental implant loss in a Brazilian population. *Clin Oral Impl Res*. 2009: 208-217.

**Monov G**, Strbac GD, Baron M, Kandler B, Watzek G, Gruber R. Soluble RANKL in crevicular fluid of dental implants: a pilot study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 2006: 8: 135-41.

**Moreira P**, Lima P, Sathler K, Imanishi S, Costa J, Gomez R, Gollob K, Dutra W. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol*. 2007: 148(1): 119–126.

**Muddugangadhar BC**, Amarnath GS, Tripathi S, Dikshit S, Divya MS. Biomaterials for dental implants: An overview. *International Journal of Oral Implantology and Clinical Research*, 2011; 2(1): 13-24.

**Murata M**, Tatsumi J, Kato Y, Suda S, Nunokawa Y, Kobayashi Y, Takeda H, Araki H, Shin K, Okuda K, Miyata T, Yoshie H. Osteocalcin, deoxyypyridinoline and interleukin 1

beta in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13(6):637-43.

**Nadel S**, Newport M, Booy R, Levin M. Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *J Infect Dis* 1996; 174: 870-80.

**Nair**, P.N. R. (). Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2004; 15 (6): 348-381.

**Newman M**, Flemming T. Periodontal considerations of implants and implant associated microbiota. *Journal of Dental Education*. 1988; 52: 737.

**Newman M**, Takei, Klokkevold, Caranza. *Clinical Periodontology*. 10th edition. 2007 Saunders Elsevier, St. Louis, USA: 1075.

**Nicklin M**, Weith A, Duff G. A physical map of the region encompassing the human interleukin-1-alpha, interleukin-1-beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics*. 1994;19: 382-384.

**Nickenig H**, Schlegel K, Wichmann M, Eitner S. **Expression of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in soft tissue over ceramic and metal implant materials before uncovering: a clinical pilot study.** *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012; 27(3): 671-6.

**Niederman R**, Buyle-Bodin Y, Lu BY, Naleway C, Robinson P, Kent R. The relationship of gingival crevicular fluid short chain carboxylic acid concentration to gingival inflammation. *J Clin Periodontol*. 1996; 23:743-749.

**Nikolopoulos G**, Dimou N, Hamodrakas S, Bagos P. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J Clin Periodontol*. 2008; 1-14.

**Nowzari H**, Phamduong S, Botero J, Villacres M, Rich S. The Profile of Inflammatory Cytokines in Gingival Crevicular Fluid around Healthy Osseointegrated Implants. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2010

**Nosaka Y**, Tachi Y, Shimpuku H, Kawamura T, Ohura K. Association of calcitonin receptor gene polymorphism with early marginal bone loss around endosseous implants. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2002; 17: 38-43.

**Obana N**, Takahashi S, Kinouchi Y, Negoro K, Takagi S, Hiwatashi N, Shimosegawa T. Ulcerative colitis is associated with a promoter polymorphism of lipopolysaccharide receptor gene, CD14. *Scand J Gastroenterol*. 2002 ;37: 699-704.

**Otero J**, Dai S, Alhawagri M, Darwech I, Abu-Amer Y. IKKbeta activation is sufficient for RANK-independent osteoclast differentiation and osteolysis. *Journal of Bone and Mineral Research* 2010; 25: 1282-94.

**Panagakos F**, Aboyousssef H, Dondero R, Jandinski J. Detection and measurement of inflammatory cytokines in implant crevicular fluid: a pilot study. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. 1996; 11: 794-799.

- Papapanou P**, Neiderud A, Sandros J, Dahlén G. Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. A case-control study. *J. Clin. Periodontol* , 2001; 28: 5.
- Park S**, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S, Kamimura D, Ueda N, Iwakura Y, Ishihara K, Murakami M, Hirano T. IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol*. 2004; 173(6):3844-54.
- Perović J**: *Oralna implantologija*, 2004, Nauka, Beograd
- Pestka S**, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. (). Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*, 2004; 22 :929-979.
- Petković A**, Matić S, Stamatović N, Vojvodić D, Todorović T, Lazić Z, Kozomara R. Proinflammatory cytokines (IL1 $\beta$  and TNF  $\alpha$ ) and chemokines (IL8 and MIP-1 $\alpha$ ) as markers of peri-implant tissue condition. *Int. J Oral Maxillofac.Surg*.2010; 39:478-485.
- Petković A**, Matić S, Stamatović N, Vojvodić D, Todorović T. Cytokines in pathogenesis of peri-implantitis. *Vojnosanit pregl* 2011; 68:435-441.
- Pigossi S**, Alvim-Pereira F, Montes C, Finoti L, Secolin R, Trevilatto P, Scarel-Caminaga R. Genetic association study between Interleukin 10 gene and dental implant loss.*Archives of oral biology*, 2012; 57: 1256-1263.
- Pontoriero R**, Tonelli M, Carnevale G, Mombelli A, Nyman S, Lang, N. Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clinical Oral Implants Research* 1994; 5: 254–259.
- Queiroz A**,Taba M, O’Connell P, Nobrega P, Costa P, Kawata V, Trevisan G, Novaes A,Jr. Souza S, Palioto D, Grisi M. Inflammation Markers in Healthy and Periodontitis Patients. A Preliminary Data Screening. *Braz Dent J* (2008) 19(1): 3-8
- Rakic M**, Lekovic V, Nikolic-Jakoba N,Vojvodic D, Petkovic-Curcin A, Sanz M. Bone loss biomarkers associated with peri-implantitis. A cross-sectional study. *Clin Oral Impl Res*, 2013; 24(10): 1110-6.
- Reichert S**, Machulla HK, Klapproth J, Zimmermann U, Reichert Y, Glaser CH. The interleukin-10 promoter haplotype ATA is a putative risk factor for aggressive periodontitis. *J Periodontal Res*. 2008; 43: 40–7.
- Reinhardt RA**, Masada MP, Kaldahl WB, DuBois LM, Kornman KS, Choi JI, Kalkwarf KL, Allison AC. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993;20:225–231.
- Renvert S**, Persson G. Periodontitis as a potential risk factor for peri-implantitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2009; 36 : 9–14.
- Rogers M**, Figliomeni L, Baluchova K, Tan AE, Davies G, Henry P. Do interleukin-1 polymorphisms predict the development of periodontitis or the success of dental implants? *J Periodontal Res* 2002; 37(1):37-41.
- Rossomando EF**, Kennedy JE, Hadjimichael J. Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Arch Oral Biol* 1990;35:431–434.

- Salcetti J**, Moriarty J, Cooper L, Smith F, Collins J, Socransky S, Offenbacher S. The clinical, microbial and host response characteristics of the failing implant. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997; 12 (1): 32-42.
- Salisbury B**, Pungliya M, Choi J, Jiang R. SNP and haplotype variation in the human genome. *Mutat Res*. 2003; 526: 53–61.
- Santtila S, Savinainen K, Hurme M**. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL-1RN\*2) is associated with enhanced IL-1 production in vitro. *Scand. J. Immunol* 1998; 189:195-198.
- Sasaki, H.**, Okamatsu, Y., Kawai, T., Kent, R., Taubman, M. & Stashenko, P. (). The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss. *Journal of Periodontal Research*, 2004; 6: 432-441.
- Scarel-Caminaga R**, Trevilatto P, Souza A, Brito R, Camargo L, Line S. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004; 31:443-8.
- Scapoli L**, Girardi A, Palmieri A, Carinci F, Testori T, Zuffetti F, Monguzzi R, Lauritano D. IL6 and IL10 are genetic susceptibility factors of periodontal disease. *Dent Res J (Isfahan)*, 2012; 9 : S197–S201.
- Schafer A**, Jepsen S, Loos B. Periodontal genetics: a decade of genetic association studies mandates better study designs. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 103–107.
- Schenk R**. Bone regeneration: Biologic basis. In: Buser D, Dahlin C, Schenk R. Guided bone regeneration in implant dentistry, 1994. Chapter 3, 49–100. Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc.
- Schierano G**, Pejrone G, Brusco P. TNF alpha, TGF beta 2 and IL1 beta levels in gingival and periimplant crevicular fluid before and after de novo plaque accumulation. *J Clin Periodontol*. 2008; 35: 532-538.
- Schierano G**, Bassi F, Gassino G, Mareschi K, Bellone G, Preti G. Cytokine production and bone remodeling in patients wearing overdentures on oral implants. *J Dent Res*. 2000;79:1675-82.
- Schulz S**, Schlitt A, Lutze A, Lischewski S, Seifert T, Dudakliewa T. The importance of genetic variants in TNF $\alpha$  for periodontal disease in a cohort of coronary patients. *J Clin Periodontol* 2012;39: 699-706.
- Schou S**, Holmstrup P, Worthington H, Esposito M. Outcome of implant therapy in patients with previous tooth loss due to periodontitis. *Clinical Oral Implant Research* 2006; 17 : 104–123.
- Serino G**, Strom C. Peri-implantitis in partially edentulous patients: Association with inadequate plaque control. *Clinical Oral Implants Research*. 2009; 20: 169-174.
- Seymour G**, Gemmel E, Reinhardt R, Eastcott J, Taubman MA. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Periodontal Research* 1993; 28( 6): 478–486.

- Smith** AJ, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphism and their functionality. *Cytokine growth Fact Rev*, 2009; 20: 43-59.
- Shao** M, Huang P, Cheng R, Tao H. Interleukin-6 polymorphisms modify the risk of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009 ; 10(12): 920-927.
- Shibli** J, Melo L, Ferrari D, Figueiredo L, Favari M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clinical Oral Implant research* 2008;19: 975-982.
- Shimpuku** H, Nosaka Y, Kawamura T, Tachi Y, Shinohara M, Ohura K. Genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene and early marginal bone loss around endosseous dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2003; 14(4): 423-9.
- Sigusch** B, Klinger G, Glockmann E, Simon HU. Early-onset and adult periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes. *J Periodontol*. 1998;(10):1098-104.
- Silva** T, Garlet P, Fukada S, Silva J, Cunha F. Chemokines in Oral Inflammatory Diseases: Apical Periodontitis and Periodontal Disease. *J Dent Res* 2007; 86: 306-319.
- Soga** Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (*TNF- $\alpha$* ) -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *Journal of Clinical Periodontology*, 2003; 30:524-531.
- Sumida** S, Ishihara K, Kishi M, Okuda K. Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implant*. 2002; 17:696-702.
- Tai** H, Endo M, Shimada Y, Gou E, Orima K, Kobayashi T, Yamazaki K and Yoshie H. Association of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms with early-onset periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol*. 2002; 29: 882-888.
- Teixeira** FG, Mendonça SA, Oliveira KM, dos Santos DB, Marques LM, Amorim MM, Raquel de Souza Gestinari R. Interleukin-6 c.-174G>C Polymorphism and Periodontitis in a Brazilian Population. *Molecular Biology International*, 2014:1-8
- Tonetti** MS, Imboden MA, Lang PN. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin 8 and ICAM1. *J Periodontol*. 1998 ; 69: 1139-1147.
- Taylor** J, Preshaw P, Donaldson P. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Implant dentistry*. 2005; 391-398.
- Tales** R, Haffajee A, Socransky S. Peri-implant infections. Clinical periodontology and implant dentistry, fifth edition. Blackwell Munksgaard. 2008; 268-277.
- Tervonen** T, Raunio T, Knuutila M, Karttunen R. Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease *Journal of Clinical Periodontology*. 2007; 34: 377-383.
- Tountas** N, Cassini-Raggi V, Yang H, Di Giovine F, Vecchi M, Kam L, Melani L, Pizzaro T, Rotler J, Cominelli F. Functional and ethnic association of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1999; 117:806-

813.

- Trevilatto P**, Scarel-Caminaga R, de Brito RB Jr, de Souza A, Line S. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol*, 2003; 30: 438-442.
- Turner D**, Williams D, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ and Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997; 24: 2134-2138.
- Umeda M**, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morison J, Slots J. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol* 1998; 69: 1111-8.
- Van der Weijden G**, van Bommel K, Revert S. Implant therapy in partially edentulous, periodontally compromised patients: a review. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 506-511.
- Vaz P**, Gallas M, Braga A, Sampaio-Fernandes J, Felino A, Tavares P. IL1 gene polymorphisms and unsuccessful dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23:1404-13.
- Van Winkelhoff A**, Wolf J. Actinobacillus actinomycetemcomitans associated peri-implantitis in an edentulous patient. *A case report. Journal of Clinical Periodontology* 2007; 27: 531-535.
- Vlacic-Zischke J**, Hamlet S, Friis T, Tonetti MS, Ivanovski S. The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGF $\beta$ /BMP signalling in osteoblasts. *Biomaterials* 2011; 32:665-71.
- Walschus U**, Hoene A, Patrzyk M, Finke B, Polak M, Lucke S, Nebe B, Schroeder K, Podbielski A, Wilhelm L, Schlosser M. **Serum profile of pro- and anti-inflammatory cytokines in rats following implantation of low-temperature plasma-modified titanium plates.** *J Mater Sci Mater Med*. 2012; 23(5): 1299-307.
- Wang M**, Hajishengallis G. (). Lipid raft-dependent uptake, signalling and intracellular fate of Porphyromonas gingivalis in mouse macrophages. *Cell Microbiol*, 2008; 10: 2029-2042.
- Waterer G**, Wunderink R. Science review: Genetic variability in the systemic inflammatory response. *Crit Care*, 2003; 7: 308-14.
- Watson J**. The intracellular IL-1 receptor antagonist alters IL-1 – inducible gene expression without blocking exogenous signaling by IL-1 $\beta$ . *Journal of Immunology*. 1995; 155(9): 4467-4475.
- Wilson T**, Nunn M. The relationship between the interleukin-1 periodontal genotype and implant loss. Initial data. *J Periodontol* 1999; 70(7): 724-729.
- Wilton JM**, Bampton J L. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) levels in gingival crevicular fluid from adults with previous evidence of destructive periodontitis. A cross sectional study. *J Clin Periodontol* 1992; 19(1): 53-7.



- Yaghobee S**, Khorsand A, Ghohroudi A, Sanjari K , Kadkhodazadeh M. Assessment of interleukin-1beta and interleukin-6 in the crevicular fluid around healthy implants, implants with peri-implantitis, and healthy teeth: a cross-sectional study. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2014;40:220-224.
- Yamazaki K**, Nakajima T., Gemmell E., Polak B., Seymour G.J. and Hara K. (). IL-4 and IL-6 producing cells in human periodontal disease tissue. *J. Oral Pathol. Med*, 1994; 23: 347-353.
- Yamazaki K**, Ueki-Maruyama K, Oda T, Tabeta K, Shimada Y, Tai H, Nakajima T, Yoshie H, Herawati D, Seymor GJ. Single-nucleotide polymorphism in the CD14 Promoter and Periodontal Disease Expression in a Japanese Population. *Journal of Dental Research*. 2003; (82) 8: 612-616.
- Ying L**, Huang P, Lu X, Guan Dh, Man Y, Wei N, Wang Yy, Gong P: The relationship between IL-1 gene polymorphism and marginal bone loss around dental implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65(11): 2340–2344.
- Zitzmann N**, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontolog*. 2008; 35: 286–291.