

## ЛИНКОВИ ПОМЕЃУ МИКРОБИОЛОШКИОТ СТАТУС И ЦИТОКИНСКИОТ ПРОФИЛ НА ПЕРИИМПЛАНТНИТЕ ТКИВА

### LINKS BETWEEN MICROBIOLOGY STATUS AND CYTOKINE PROFILE OF PERIIMPLANT TISSUES

Автори: Велеска-Стевковска Д.<sup>1</sup>,  
Пеева-Петреска М.<sup>1</sup>, Величковски Б.<sup>1</sup>,  
Апостолова Г.<sup>1</sup>, Накова М.<sup>2</sup>, Петровска М.<sup>3</sup>,  
Горгоски И.<sup>4</sup>

1-Катедра за орална хирургија, Стоматолошки  
Факултет во Скопје, Р.Македонија

2-Катедра за болести на устата и парадон-  
тот, Стоматолошки Факултет во Скопје,  
Р.Македонија

3-Катедра за микробиологија со паразито-  
логија, Медицински факултет во Скопје,  
Р.Македонија

4-Институтот за биологија, Природно-матема-  
тичкиот факултет во Скопје, Р.Македонија

Autors: Veleska-Stevkovska D.<sup>1</sup>, Peeva-Petreska  
M.<sup>1</sup>, Velickovski B.<sup>1</sup>, Apostolova G.<sup>1</sup>, Nakova M.<sup>2</sup>,  
Petrovska M.<sup>3</sup>, Gorgoski I.<sup>4</sup>

1-Department for oral surgery, Faculty of Den-  
tistry in Skopje, R.Macedonia

2-Department for periodontology and oral pathol-  
ogy, Faculty of Dentistry in Skopje, R.Macedonia

3-Department of Microbiology with Parasitology,  
Faculty of Medicine in Skopje, R.Macedonia

4-Institute for biology, Faculty for natural sciences  
and mathematics in Skopje, R.Macedonia

#### Апстракт

Бактериите кои го колонизираат биофил-  
мот во различни стадиуми, предизвикуваат  
карактеристични ефекти на сигналните па-  
тишта асоцирани со низа проинфламаторни  
цитокини. Барањето на врска помеѓу цито-  
кинските нивоа и специфичните бактери-  
ски/вирални патогени е предмет на новите  
испитувања во остеоимунологијата. Две  
недели по поставувањето на протетичката  
супраструктура, се помош на брис метода-  
та се колектираше дел од супрагингивал-  
ниот плак. Примерок од субгингивалниот  
плак се адсорбира на стерилни суви харти-  
ени лентички. Кај имунолошки испитувања  
(анализа на цитокинскиот профил пред  
имплантација, 4 месеци по имплантација и  
12 месеци по протетичкото оптеретување)  
се користеше принципот на одредување на  
концентрација на цитокини- ELISA методот.  
При евалуацијата на имунолошкиот статус  
(проинфламаторен и антиинфламаторен  
цитокински профил) и оптеретувањето со  
орални микроорганизми на перимплант-  
ните ткива, констатиравме статистички ви-

#### Abstract

The search of a link between the cytokine lev-  
els and the specific bacterial pathogens is the  
subject of new studies in osteoimmunology.  
Bacteria impact similar responses to the host,  
causing the characteristic effects of signaling  
pathways associated with a series of proinflam-  
matory cytokines.

Two weeks after setting the prosthesis supra-  
structure by using the swab method, a part of  
the supragingival plaque was collected.

A sample of the subgingival plaque was ad-  
sorbed on sterile dry paper strips. In the eval-  
uation of the immune status (proinflammatory  
and anti-inflammatory cytokine profile) and  
the loading with oral microorganisms on the  
peri-implant tissues, a statistically highly sig-  
nificant relationship was concluded in terms  
of the given time dimension of the study (“time  
dependent status”).

In determining the correlation between immu-  
nological and microbiological status and the  
clinical condition of the peri-implant tissues,



соко сигнификантна поврзаност во однос на зададената временска димензија на студијата (time dependent status). Анализата на цитокинскиот профил придонесува во детектирањето на рани метаболички и биохемиски лезии на перимплантното ткиво, како и мониторирање на осеоинтеграцискиот процес и одговорот на коската на протетичкото оптеретување. На овие факти се темели и развојот на идни дијагностички биомаркери што ќе овозможат да се мониторира состојбата на перимплантните ткива, кои истовремено ќе учествуваат и во креирање на рани стратегии за превенција и/или третман на инцијални лезии на истите.

**Клучни зборови:** орални микроорганизми, цитокини, денални импланти, микробно оптоварување

we determined statistically significant relationships with all the analyzed categories of parameters.

The analysis of cytokine profile contributes to the detection of early metabolic and biochemical lesions of the peri-implant tissue and monitoring the osseointegration process and the bone response to the prosthetic loading.

These facts are the base of the development of future diagnostic biomarkers that will allow monitoring of the condition of the peri-implant tissues that simultaneously participate in creating strategies for early prevention and / or treatment of initial lesions of the same.

**Key words:** oral microorganisms, cytokines, dental implants, microbial load

## Вовед

Усната празнина обезбедува топла и влажна средина за раст на микроорганизмите. Обезбедува и единствени можности за развој на биофилм (микроорганизмите мора претходно да се прикрупат за површината) и сигурни услови за нивно преживување. Околината што ја обезбедува домаќинот влијае на развојот, составот и метаболната активност на оралната микрофлора. Условите на околината варираат кај различни ареи на оралната празнина. Аналогно и составот на оралната микрофлора варира во различни екосистеми: јазик, букална мукоза и заби. Во состојба на здравје микроорганизмите се во динамичен еквилибриум со домаќинот, но промена во клучните параметри кои го детерминираат микробниот раст може да го поремети еквилибриумот. Со цел подобро да се разбере врската помеѓу оралните микроорганизми и домаќинот во состојба на здравје и заболување, развиен е еден концепт кој се базира на еколошките принципи кој

## Introduction

Conditions provided by the host in the mouth affect the development, composition and metabolic activity of the oral microflora and vary in different areas of the oral cavity. Analogous to this, the composition of the oral microflora varies in different ecosystems: tongue, buccal mucosa and teeth.

When the microorganisms are in “health status” they are in dynamic equilibrium with the host, but change in the key parameters that determine microbial growth can disturb equilibrium.

In order to better understand the link between oral microorganisms and the host in the state of health or disease, a concept is developed which is based on ecological principles that explain their interactions.

The ecological plaque hypothesis describes the dynamic nature of the relationship between the host and the normal microflora<sup>1</sup>.



ги објаснува нивните интеракции. Еколошката плак хипотеза ја опишува динамичната природа на врската помеѓу домаќинот и нормалната микрофлора<sup>8</sup>. Промените во околината ја зголемуваат конкурентивноста на патогените и придонесуваат за зголемување на вирулентните фактори. Патогените микроорганизми можат да бидат присутни и при добра здравствена состојба на оралните ткива, но со исклучително ниска застапеност и со клинички незначителни нивоа. Според оваа хипотеза постои директен линк помеѓу локалните услови во околината како и активноста и составот на биофилмот. Во локални услови на средината можат да се вбројат: температурата, редокс потенцијалот, нутритивните, генетските карактеристики, животниот стил и возраста на домаќинот.

### **Соодноси помеѓу домаќинот и биофилмот**

Домаќинот благодарјќи на вродениот и стекнатиот имунитет ја спречува бактеријата инвазија и колонизација. Но и покрај имунолошката одбрана, домаќинот развила способности да ја поддржува комплексната микрофлора. Домаќинот не е индиферентен во однос на присуството на различни заедници на микроорганизми кои ги населуваат неговите површини, туку активно е вклучен во односот со микроорганизмите. Рецепторите за клеточно препознавање на домаќинот (host cell pattern recognition receptors-PRPs) се распоредени стратешки во ткивата за да ги регистрираат промените во надворешната и внатрешната средина и да ги препознаат микробно-асоцираните молекуларни паттерни (microbe-associated molecular patterns MAMPs) како на пример липополисахаридите, нуклеински киселини и сл. Тие се способни да активираат мултипли сигнални паттерни при што поголем дел од нив се вклучуваат преку нуклеарниот фактор (NF- $\kappa$ B).

Changes in the environment increase the competitiveness of pathogens and increase the virulence factors.

Pathogenic microorganisms may also be present in a good health condition of the oral tissues, but with extremely low representation and clinically insignificant levels.

According to this hypothesis, there is a direct link between local environmental conditions and activity and composition of the biofilm.

The local environmental conditions also involve temperature, redox potential, nutrients, genetic characteristics, lifestyle and the age of the host.

### **Correlations between biofilms and host**

Thanks to innate and acquired immunity, the host prevents bacterial invasion and colonization. But despite immune defense, the host developed capabilities to support complex microflora.

Host is not indifferent with respect to the presence of different communities of microorganisms that inhabit its surface, but is actively involved in a relationship with microorganisms.

Receptors for host cell recognition (host cell pattern recognition receptors-PRPs) are deployed strategically in tissues to register changes in the external and internal microenvironment and recognize microbe-associated molecular pathways (microbe-associated molecular patterns MAMPs) such as lipopolysaccharides, nucleic acids, etc.

They are able to activate multiple signaling pathways in which most of them are cross through nuclear factor (NF- $\kappa$ B).



MAMPs се ослободуваат од сите микробни клетки. Домаќинот создал механизми за толеранција на резидентните микроорганизми со цел да не се иницираат штетни инфламаторни одговори, но сепак не ја губи способноста за ефикасна одбрана од патогени микроорганизми<sup>6</sup>. Важноста на системите за детекција на домаќинот се манифестира со фактот дека абнормалната експресија на PRPs кои ги врзуваат бактериските липополисахариди (TLR2 и CD14) се поврзува со предиспозицијата за развој на заболувања на потпорниот апарат<sup>7</sup>. Резидентните орални бактерии ја детерминираат нормалната експресија на имуните медијатори, помагаат при одржувањето на здравјето на ткивата преку регулација на ниски нивоа на експресија на интрацелуларните молекули на адхезија (intracellular adhesion molecule-1), E-selectin, IL-8, кои пак од своја страна учествуваат во создавањето на протективна обвивка на неурофили стратешки позиционирани помеѓу субгингивалниот биофилм и припојниот епител<sup>8</sup>.

Во услови кога домаќинот не успева да го стави под контрола иницијалниот микробиолошки инсулт, започнува активација на механизмите на неадекватен одговор кои уште повеќе ги подобруваат условите за раст на патогените видови на микроорганизми, кои пак од своја страна го продлабочуваат неадекватниот одговор на домаќинот. Според Petrovic и Vojdic<sup>23</sup> имплантите кои покажуваат знаци на ран имплантен неуспех поседуваат микроорганизми слични на оние заби кои покажуваат клинички знаци на пародонтопатија. Бактериите продуцираат бактериски колагенази и под нивно дејство клетките синтетизираат остеокласт активирачки цитокини.

Според истражувањата на авторите Mitsugi et al.<sup>9</sup>, Odila et al.<sup>11</sup>, Nonnenmacher et al.<sup>10</sup>; постојат голем број на периодонтопатогени бактерии, меѓу кои и: *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* (*Tannerella forsythia*)

MAMPs get rid of all microbial cells. Host created mechanisms for tolerance of resident microorganisms in order not to initiate harmful inflammatory responses, but does not lose the ability to effectively defend against pathogens<sup>6</sup>.

The importance of systems for detection of host manifested by the fact that abnormal expression of PRPs that bind bacterial lipopolysaccharide (TLR2 and CD14) is associated with predisposition to the development of diseases of the anchor apparatus<sup>7</sup>.

Resident oral bacteria determine the normal expression of immune mediators, assist in maintaining the health of tissues through regulation of low levels of expression of intracellular adhesion molecules (intracellular adhesion molecule-1), E-selectin, IL-8, which in turn participate in the creation of a protective layer of neurofilii strategically positioned between subgingival biofilm and the attached epithelium<sup>8</sup>.

In circumstances where the owner fails to prevent initial microbial insult, begins activation of mechanisms of inadequate response that further improve the conditions for the growth of pathogenic species of microorganisms, which in turn deepen the inadequate response of the host.

According to Petrovic and Vojdic<sup>23</sup> implants that show early signs of implant failure have microorganisms similar to those teeth which show clinical signs of parodontopathy.

Bacteria produce bacterial collagenase and under their influence cells synthesize osteoclasted activated cytokines.

According to the research of the authors Mitsugi et al.<sup>9</sup>, Odila et al.<sup>11</sup>, Nonnenmacher et al.<sup>10</sup>, there are a number of periodontopathogenic bacteria, including: *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* (*Tannerella for-*



*Fusobacterium nucleatum, Streptococcus intermedius, Peptostreptococcus micros, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Prevotella intermedia, Dialister pneumosintes, Micromonas (Peptostreptococcus) micros.*

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

Селектираните пациенти генерално беа во добра здравствена состојба и беа информирани за процедурите при што писмено се согласија за учество во студијата и проспективна соработка во следните дванаесет месеци по протетичката рехабилитација. Секој поединец доби инструкции за одржување на правилна орална хигиена за време на студијата. Во зависност од протетскиот план на терапија кај пациентите се инсерирани еден или повеќе ендоосеални штраф импланти со модифицирана титаниум имплантна површина (вкупно тринаесет и пет).

### Хируршки протокол и профилактички протокол

Кај пациентите беше спроведена професионална орална хигиена пред имплантацијата и се започна со антибиотска и антисептична профилакса еден ден пред хируршката процедура. Флап дизајнот се креираше респектирајќи ја регијата и бројот на планираните импланти. Препарацијата на имлантното лежиште и поставувањето на имплантите е спроведено според стандардните хируршки протоколи за минимална инвазивност. Анализирани се титаниумски штраф ендоосеални импланти (импланти со макроскопски навои), со модифицирана имплантна површина (пескарена и киселински обработена „sand blasted and acid etched“ и „sand blasted- large grid-acid etched“ со подобрени хидрофилни карактеристики) и „platform-switching“ концепт, кои се поставувани паракрестално во однос на алвеоларната коска. Имплантите се поставени според двофазниот протокол („submerged implants“). Четири месеци покасно имплантите се отворени и

*sythia) Fusobacterium nucleatum, Streptococcus intermedius, Peptostreptococcus micros, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Prevotella intermedia, Dialister pneumosintes, Micromonas (Peptostreptococcus) micros.*

## MATERIALS AND METHODS

Selected patients were generally in good health and were informed about the procedures so they agreed to participate in the study and prospective cooperation in the following twelve months after the prosthetic rehabilitation.

Each person was instructed to maintain proper oral hygiene during the study.

Depending on the plan of prosthetic therapy in patients one or more **endoosseal** screw-implants were inserted with modified titanium implant surface (total of thirty-five).

### Surgical and prosthetic protocol

In patients a professional oral hygiene was conducted before implantation and antibiotic and antiseptic prophylaxis began a day before the surgical procedure.

Flap design was created with respect to the region and the number of planned implants.

The preparation of the implant bearing and the setting of the implants is governed by standard surgical protocols for minimal invasiveness.

Titanium screw implants (implants with macroscopic threads) were analyzed with modified implant surface (sand blasted and acid etched and sand blasted-large grid-acid etched with improved hydrophilic characteristics) and with platform - switching concept, which were set paracrestaly.

Implants are placed according to two-phase protocol („submerged implants“).



вклучени во фазата на протетичка рехабилитација (Сл. 1).

*Колекција на материјал за испитување* - примерок за анализа на локалните цитокини се земаше пред имплантацијата од мукопериосталното ламбо, во втората фаза на отварање на имплантите и по една година од функцијата на имплантите. Ткивните примероци до моментот на инвестиција се чуваа во стерилни криотуби потопени во течен азот на температура под -80 степени Целзиусови. Две недели по поставувањето на протетичката супраструктура, се помош на брис методата се колектира дел од супрагингивалниот плак од лингвалната страна и од букалниот аспект на супраструктурата. Примерок од субгингивалниот плак се адсорбираше на стерилни суви хартиени лентички (perio-papper, Amytville, NY, USA).

**Слика 1.** Протетичка супраструктура

*Принцип на одредување на концентрација на цитокини- ELISA метод* - за одредување на концентрацијата на цитокините во биоптичниот материјал се користеше ELISA методот и апаратот Bio-Rad Microplate Reader Model 680. Концентрацијата на цитокините во примерокот се одредува со помош на ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) методот. Денес постојат најразлични комерцијално достапни комплекти за одредување на концентрацијата на цитокините кои не секогаш даваат приближно еднакви резултати. Користевме кит од eBioscience Platinum ELISA, ready-to-use sandwich ELISA.

Имунолошките тестови претставуваат алтернатива за биолошките методи и проточната цитометрија. Едноставни се за изведување при што резултатите се добиваат за неколку часа. Најчесто употребуваната ELISA метода користи два вида на противтела. На микротитрационата плоча со 96 бунарчиња

Four months later the implants are open and involved in the prosthetic rehabilitation phase (Figure 1).

*Collection of test material* - for analysis of local cytokines tissue sample is taken before the implantation of mucoperiosteal flap, in the second phase of opening the implants and after a year of implant function.

Until the investigation tissue samples were kept in sterile cryotubes immersed in liquid nitrogen at temperatures below -80 degrees Celsius. Two weeks after setting the prosthetic suprastructure, using the swab method, part of the supragingival plaque from the lingual-side and buccal aspect of suprastructure is collected. Sample of the subgingival plaque is adsorbed on dry sterile paper strips (perio-papper, Amytville, NY, USA).

**Figure 1.** Prosthetic suprastructure

*Principle for determining the concentration of cytokine-ELISA method* - ELISA method and apparatus Bio-Rad Microplate Reader Model 680 were used to determine the concentration of cytokines in bioptic material.

The concentration of cytokines in the sample is determined using ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) method.

Today there are a variety of commercially available kits for determining the concentration of cytokines that do not always give approximately equal results. We used putty from eBioscience Platinum ELISA, ready-to-use sandwich ELISA. Immunological tests are alternative tests for biological methods and flow cytometry.

They are simple to perform and the results are obtained for several hours. Most used ELISA method has two types of antibodies. The microtitration plate with 96 little wells contains bounded immobilized antibodies and they



се врзани имобилизирачки противтела и служат да ја врзат за себе материјата што се испитува. После првото плакнење на бунарчињата се додава второто противтелo. Второто противтелo кое е детектирачко противтелo поседува врзан ензим биотин, HRP (horseradish peroksidase) или алкална фосфатаза. По второто плакнење на бунарчињата се додава засилувачки раствор Amdex кој претставува специфичен мултифункционален конјугат и содржи молекули на HRP и стрептавидин.

Овој конјугат се врзува за цитокинет за кого се врзани и првичното и вторичното противтелo. Врзувањето на противтелата е видно кога ензимот врзан за детектирачкото противтелo и засилувачкиот раствор реагира со супстратот 3,3, 5,5, -тетра-метил бензидин (ТМБ). Реакцијата се стопира со додавање на сулфурна киселина. Обојувањето се чита на соодветна бранова должина со спектрофотометар или ELISA читач чиј интензитет на обојувањето е право пропорционален со концентрацијата на испитуваниот цитокин во примерокот.

Пред да се почне со работа сите хемикалии и примероци се загреваат на температура од +20-25 °C. Сензитивноста на методот се постигнува со дотерување на волуменот на примерокот, времето на инкубација, температурата, како и употребата на различни пуфери и различно pH.

*Микробиолошки испитувања*- засадувањето на примерокот се вршеше со валкање на брисот и хартиените стикчиња по површината на цврстата подлога и дел од физиолошкиот раствор (0.1ml) во кој се потопени стикчињата се засадува на хранителна подлога. Материјалот се засади на крвна подлога и декстроза бујон (Шедлер). Еден дел од материјалот би се засади на цврста подлога за докажување на присуство на анаеробни бактерии. Се инкубира на 37° C, во

serve to bind itself to the matter which is under investigation. After first rinsing of the little wells the second antibody is added.

The second antibody which is detectable antibody has bounded enzyme biotin, HRP (horseradish peroksidase) or alkaline phosphatase.

After the second rinse of the wells Amdex - amplifier solution is added that is specific and multifunctional conjugate containing molecules HRP and streptavidin.

This conjugate binds to the cytokine to which initial and secondary antibodies are bounded. The binding of the antibodies is evident when enzyme bounded for the detectable antibody and potentiating solution reacts with the substrate 3,3, 5,5, -tetra-methyl benzidinin (TMB).

The reaction is stopped by adding sulfuric acid. Staining can be read from the appropriate wavelength of spectrophotometer or from ELISA reader whose intensity of staining is proportional to the concentration of cytokine in the test sample. Before you start working, all chemicals and samples are heated to a temperature of +20-25 degrees Celcius.

The sensitivity of the method is achieved by adjusting the sample volume, incubation time, temperature, and the use of different buffers and different pH.

*Microbiological testing* – planting of the sample was done with the dirt of the smear and the paper sticks on the surface of solid substrate and part of the physiological solution (0.1ml) in which the sticks are immersed is planted on the provider base.

The material is planted on blood base and dextrose broth (Shedler). One part of the material would be planted on solid ground for proving the presence of anaerobic bacteria.

термостат 24 часа, освен на Шедлер подлогата која се инкубира на иста температура, 48 часа, во анаеробни услови.

Се направи и директен препарат, со капнување на предметно стакленце со цел да се обон по методот на Грам. Микроскопијата се изведува со светлосен микроскоп со инверзивни објекти со зголемување од 100 пати. При добивањето на колонии на бактерии тие подлежат на идентификација.

Прво се читаше крвната подлога по инкубацијата, додека заматувањето на бујонот асоцира на присуство на бактерии кои поватаму се засадуваат на крвна подлога.

Користени се вештачки хранителни подлоги и тоа крвен агар (оксид) и Шедлеров агар (оксид) декстроза бујон.

Култивацијата се вршеше на температура од 37°C, аеробна атмосфера (крвен агар), 24 часа или во анаеробна атмосфера со кесички анаерокулт оксид во лонец за анаеробна култивација (Шедлеров агар) 48 часа.

Читањето на резултатите подразбираше:

- Броене на израснати колонии на површината на подлогата и пресметување на вкупен број на бактериски клетки на  $\text{cm}^2$  (еден примерок)
- Видови на бактерии според морфологија (дијагонален препарат обоен по Грам и субкултури на сектори на крвен агар и на Шедлеров агар).

Одредувањето на вкупниот број на аероби, анаероби и факултативно анаероби претставува семиквантитативен метод. Идентификацијата на бактериите се одредуваше според нивните морфолошко-физиолошки и биохемиски особини и тоа за аеробниите бактерии (макроскопски препарат по Грам,

It is incubated at 37° C, in the thermostat for 24 hours, except for Shedler ground where it is incubated at the same temperature, but for 48 hours in anaerobic conditions.

A direct product is made with dropping of the solution on the object glass in order to be stained using the Gram method. Microscopy is performed with a light microscope with inverse facilities with an increase of 100 times.

After receiving the colonies of bacteria, they are in process for their identification. First we read blood substrate after incubation, while blurring of the broth tells us that there is a presence of bacteria that further are planted on the blood ground.

Artificial substrates foodstuffs are used such as blood agar (oksoid) and Shedler agar (oksoid) dextrose broth. Cultivation was carried out at a temperature of 37° C, aerobic atmosphere (blood agar), 24 hours or in anaerobic atmosphere with bags of anaerokult oksoid in pot for anaerobic cultivation (Shedler agar) for 48 hours.

Reading the results implied:

- Counting of colonies grown on the surface of the substrate and calculate the total number of bacterial cells per  $\text{cm}^2$  (one sample)
- Types of bacteria by morphology (diagonal Gram stained preparation and subcultures of sectors on blood agar and Shedler agar).

The determination of the total number of aerobics, anaerobics and optional anaerobics is semiquantify method.

Identification of bacteria was determined according to their morphological and physiological-biochemical characteristics and it was done for the aerobic bacteria (Gram macroscopic



бацитрацински тест за бета хемолитички стрептококи, оптохин за вириданс стрептококи/пневмококи; ескулин за ентерококи, ВИТЕК идентификација за различни видови на вириданс стрептококи) и *анаеробни* бактерии (макроскопски препарат според Грам и форма на бактериската клетка – кока, бацил, спирохета -ВИТЕК идентификација).

## РЕЗУЛТАТИ

**Аналистички гел** - на максилата се анализираа 60,00% од штраф имплантите од кои 40,00% импланти инсерирани во постериорната регија на максилата. На мандибулата инсерирани се 40,00% од имплантите и тоа 37,14% во постериорната регија на мандибулата.

Дијаметарот на имплантите варира во интервалот  $3,97 \pm 0,48$  мм., додека минималната ширина на имплантите изнесува 3,50 мм., а максималната 4,50 мм.

Должината на имплантите варира во интервалот  $10,29 \pm 1,09$  мм., минималната должина на имплантите изнесува 8,00 мм., а максималната 11,00 мм.

Во однос на модифицираната имплантна површина 88,57% импланти биле со киселински обработена и пескарена површина (acid etched and sand blasted AC/SB), додека 11,43% се карактеризирале со подобри хидрофилини карактеристики површина (sand blasted- large grid-acid etched површина).

Во однос на протетичките супраструктури доминираат имплантно носени фиксни конструкции (60,00%) импланти, а кај останатите импланти изведена е соло конструкција.

**Дескриптивен гел** - ако се земат во предвид просечните вредности на про-инфламаторните IL-1 $\beta$  (R1) цитокини пред интервенција, 4 месеци по интервенцијата и 12 месеци од протетичкото оптеретување, за

preparation, bacitracin test for beta haemolytic streptococci, optohin for viridans streptococci / pneumococcus; eskulin for enterococci, WITec identification of different species of viridans streptococci) and anaerobic bacteria (Gram macroscopic preparation and form of bacterial cells coca, bacillus, spirochaete-WITec identification).

## RESULTS

**Analytical Part** - on the maxilla 60.00% of screw implants were analyzed of which 40.00% were inserted implants in posterior region of the maxilla. On the mandible 40.00% of the implants were inserted and 37.14% were in the posterior region of the mandible.

The diameter of implants varies in the range of  $3,97 \pm 0,48$  mm., while the minimum width of the implants is 3.50 mm., and 4.50 mm maximum.

The length of implants varies in the interval:  $10,29 \pm 1,09$  mm., the minimum length of the implants is 8.00 mm., and the maximum - 11.00 mm.

Regarding the modified implantable surface, 88.57% implants were with acid and sand treated surface (acid etched and sand blasted AC / SB), while 11.43% were characterized by surface with enhanced hydrophilic features (sand blasted-large grid-acid etched).

Regarding prosthetic substructures, those worn implants that were fixed structures (60.00%) dominate, and on the remaining implants a solo construction was performed.

**Descriptive part** - if you consider the average values of the pro-inflammatory IL-1 $\beta$  (R1) cytokines before the intervention, 4 months after the intervention and 12 months after prosthetic loading, for  $F = 99,86$  and  $p < 0,001$



$F=99,86$  и  $p<0,001(p=0,000)$  во прикажаната дистрибуција постои сигнификантна разлика.

**Табела 1.** IL-1 $\beta$  промени (R1) / Bonferroni test

На **Табела 1.** прикажани се интеркласните разлики во вредностите на про-инфламаторните IL-1 $\beta$  цитокини пред интервенција, 4 месеци по интервенцијата и 12 месеци од протетичкото оптеретување.

Ако се земат во предвид просечните вредности на антиинфламаторните TGF- $\beta$  (R1) цитокини пред интервенција, 4 месеци по интервенцијата и 12 месеци од протетичкото оптеретување, за  $F=159,63$  и  $p<0,001(p=0,000)$  во прикажаната дистрибуција постои сигнификантна разлика.

**Табела 2.** TGF- $\beta$  промени (R1) / Bonferroni test

На **Табела 2.** прикажани се интеркласните разлики во вредностите на антиинфламаторните TGF- $\beta$  (R1) цитокини пред интервенција, 4 месеци по интервенцијата и 12 месеци од протетичкото оптеретување.

- Концепт на резултати добиени со микробиолошките анализи и семиквантитативната анализа

*Опредување на вкупен број на аеробни бактерии*

- доминантни: Грам позитивни коки, распоредени по вериги, суспектни за стрептококи
- Грам позитивни бацили
- Грам негативни тенки и куси бацили

*Опредување на вкупен број на анаероби и факултативно анаеробни бактерии*

- доминантни Грам позитивни коки (Peptococcus, Peptostreptococcus)

( $p = 0,000$ ) in distribution shown there is a significant difference.

**Table 1.** IL-1 $\beta$  changes (R1) / Bonferroni test

The **Table 1.** shows the intern-classes differences in the values of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  before the intervention, 4 months after the intervention and 12 months after prosthetic loading.

If we consider the average values of anti-inflammatory TGF- $\beta$  (R1) cytokines before the intervention, 4 months after the intervention and 12 months after prosthetic loading, for  $F = 159,63$  and  $p < 0,001$  ( $p = 0,000$ ) there is a significant difference in distribution.

**Table 2.** TGF- $\beta$  changes (R1) / Bonferroni test

The **Table 2.** shows the intern-classes differences in the values of anti-inflammatory cytokines TGF- $\beta$  (R1) before the intervention, 4 months after the intervention and 12 months after prosthetic loading.

- Concept of results obtained by microbiological analysis and semiquantitative analysis

*Determining the total number of aerobic bacteria*

- dominant: Gram positive cocci, arranged in chains, suspected to be streptococcal
- a Gram positive bacilli
- a Gram negative bacilli (thin and short)

*Determining the total number of anaerobic bacteria and optional anaerobic bacteria*

- dominant Gram positive cocci (Peptococcus, Peptostreptococcus)



- Грам негативни коки, суспектни за *Velonella*
- Грам негативни бацили суспектни за периодонтопатогени (*Bacteroides*, *Fusobacterium*)
- Грам негативни спирални бактерии
- Грам позитивни бацили, суспектни за лактобацили

Односот помеѓу аеробните и анаеробните бактерии беше *ana partes* или доминираа анаеробите. Поголемиот дел на периодонтопатогените бактерии претставуваат грам негативни, анаеробни бактерии, најчесто бацили. Но во групата на периодонтопатогени се застапени и грам позитивните, анаеробни, пептострептококи.

Ако се земат во предвид просечните вредности на про-инфламаторните IL-1 $\beta$  (R1) цитокини 4 месеци по интервенцијата и 12 месеци од протетичкото оптеретување, во релација со оптеретување со микроорганизми, за  $F=9,35$  и  $p<0,01$  ( $p=0,004$ ) во прикажаната дистрибуција постои сигнификантна разлика (**Графикон 1.**).

**Графикон 1.** Просечните вредности на про-инфламаторни IL-1 $\beta$  во однос на товарот на микроорганизми

Просечните вредности ( $x=219,61$  pg/mg) на про-инфламаторните IL-1 $\beta$  (R1) цитокини 4 месеци по интервенцијата (при оптеретување со микроорганизми во нормални граници) значајно ( $p<0,001$ ) е поголема од просечната вредност ( $x=175,95$  pg/mg) на цитокините 12 месеци од протетичкото оптеретување (при оптеретување со микроорганизми во нормални граници).

Просечните вредности ( $x=197,30$  pg/mg) на про-инфламаторните IL-1 $\beta$  (R1) цитокини 4 месеци по интервенцијата (при значајно оптеретување со микроорганизми) незначајно ( $p>0,05$ ) е поголема од просечната вредност

- a Gram negative cocci, suspected to be *Velonella*
- a Gram negative bacilli, suspected to be periodontopathogeni (*Bacteroides*, *Fusobacterium*)
- a Gram negative spiral bacteria
- a Gram positive bacilli, suspected to be lactobacilli

The relationship between aerobic and anaerobic bacteria was *ana partes* or the anaerobes dominated. Most of the periodontopathogenic bacteria are gram-negative, anaerobic bacteria, most bacilli.

But in the group of periodontopathogens also gram positive, anaerobic, peptostreptococci were included.

If we consider the average values of the pro-inflammatory IL-1 $\beta$  (R1) cytokines 4 months after the intervention and 12 months after the prosthetic loading in relation to the load of microorganisms, for  $F = 9,35$  and  $p < 0,01$  ( $p = 0.004$ ) there will be a significant difference in the distribution shown on **Graph 1.**

**Graph 1.** The average values of the pro-inflammatory IL-1 $\beta$  in relation to the load of microorganisms

The average values ( $x = 219,61$  pg / mg) of pro-inflammatory IL-1 $\beta$  (R1) cytokines 4 months after the intervention (the load of microorganisms is in the normal range) significantly ( $p < 0,001$ ) is greater than the average value ( $x = 175,95$  pg / mg) of cytokines 12 months after prosthetic loading (the load of microorganisms is in the normal range).

The average values ( $x = 197,30$  pg / mg) of pro-inflammatory IL-1 $\beta$  (R1) cytokines 4 months after the intervention (at significant load of microorganisms) insignificantly ( $p > 0,05$ ) is greater than the average value ( $x = 183,52$  pg



( $x=183,52$  pg/mg) на цитокините 12 месеци од протетичкото оптеретување (при значајно оптеретување со микроорганизми) (Табела 3.).

**Табела 3.** IL-1 $\beta$  промени / оптеретување со микроорганизми/ Bonferroni test

Ако се земат во предвид просечните вредности на антиинфламаторните TGF- $\beta$  (R1) цитокини 4 месеци по интервенцијата и 12 месеци од протетичкото оптеретување, во релација со оптеретување со микроорганизми, за  $F=106,91$  и  $p<0,001$ ( $p=0,000$ ) во прикажаната дистрибуција постои сигнификантна разлика (Графикон 2.).

**Графикон 2.** Просечните вредности на антиинфламаторни TGF- $\beta$  цитокини во однос на товарот на микроорганизми

Просечните вредности ( $x=15347,0$  pg/mg.) на антиинфламаторните TGF- $\beta$  (R1) цитокини 4 месеци по интервенцијата (при оптеретување со микроорганизми во нормални граници) значајно ( $p<0,001$ ) е поголема од просечната вредност ( $x=13279,0$  pg/mg.) на цитокините 12 месеци од протетичкото оптеретување (при оптеретување со микроорганизми во нормални граници).

Просечните вредности ( $x=19562,0$  pg/mg.) на антиинфламаторните TGF- $\beta$  (R1) цитокини 4 месеци по интервенцијата (при значајно оптеретување со микроорганизми) значајно ( $p<0,001$ ) е поголема од просечната вредност ( $x=10989,0$  pg/mg.) на цитокините 12 месеци од протетичкото оптеретување (при значајно оптеретување со микроорганизми) (Табела 4.).

**Табела 4.** TGF- $\beta$  промени / оптеретување со микроорганизми/ Bonferroni test

/ mg) of cytokines 12 months after prosthetic loading (with significant load of organisms) (Table 3).

**Table 3.** IL-1 $\beta$  changes/ load of microorganisms / Bonferroni test

If we consider the average values of anti-inflammatory TGF- $\beta$  (R1) cytokines 4 months after the intervention and 12 months after prosthetic loading in relation to the load of microorganisms, for  $F = 106,91$  and  $p < 0,001$  ( $p = 0,000$ ) there is a significant difference in distribution (Graph 2.).

**Graph 2.** The average values of anti-inflammatory TGF- $\beta$  cytokines in relation to the load of microorganisms

The average values ( $x = 15347,0$  pg / mg.) of anti-inflammatory TGF- $\beta$  (R1) cytokines 4 months after the intervention (the load of microorganisms is in the normal range) significantly ( $p < 0,001$ ) is greater than the average value ( $x = 13279,0$  pg / mg.) of the cytokines 12 months after prosthetic loading (the load of microorganisms is in the normal range).

The average values ( $x = 19562,0$  pg / mg.) of anti-inflammatory TGF- $\beta$  (R1) cytokines 4 months after the intervention (at significant load of microorganisms) significantly ( $p < 0,001$ ) is greater than the average value ( $x = 10989,0$  pg / mg.) of cytokine 12 months after prosthetic loading (with significant load of organisms) (Table 4).

**Table 4.** TGF- $\beta$  changes/ load of microorganisms / Bonferroni test



## ДИСКУСИЈА

Цитокините учествуваат во комплексните каскади на осеоинтеграцијата како и во заздравувањето на мекоткивните рани и тоа во трите фази: фазата на инфламација (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , PDGF), пролиферативната фаза (citoкин-активираниите макрофаги секретираат ангиогенетски фактори- VEGF и фибробласт-стимулирачки цитокини) и фазата на ремоделирање (TGF- $\beta$ ). TGF- $\beta$  зазема централна улога во процесот на заздравување на раните. TGF- $\beta$  ја инхибира функцијата на активираниите инфламаторни клетки, го забрзува процесот на заздравување преку пролиферација и ангажирање на фибробластите вклучувајќи ги и периосталните мезенхимални клетки кои ја промовираат матрикс синтезата. Ја стимулира синтезата на колаген (колаген I и III) од страна на фибробластите, влијае на интегрин експресијата и на тој начин учествува во составот и меѓусебното поврзување на колагенските структури (фазата на ремоделирање). Овој цитокин предизвикува поголема доминација на процесите за коскената формација во однос на коскената ресорпција во тек на коскено ремоделирање.

Исто така TGF- $\beta$  влијае и врз процесот на ангиогенеза. Schierano and Bassi<sup>15</sup>, Schierano and Bellone<sup>16</sup> забележале пораст на TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 во периимплантните ткива во постимплантациониот период и констатираат дека успешната осеоинтеграција зависи од модулатијата и балансирањето на коскните фактори за ремоделирање и тоа преку зголемена експресија на TGF- $\beta$  во тек на целиот постимплантационен период, отсуство на зголемени нивоа на проинфламаторните цитокини и експресија на таков цитокинский профил кој е способен да го модулира остеокластичното формирање како и фосфатазната активност во примарните остеобласти.

## DISCUSSION

Cytokines participate in complex cascades of osseointegration as in healing soft-tissue wounds in three phases: phase of inflammation (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , PDGF), proliferative phase (cytokine-activated macrophages secrete angiogenic factors - VEGF and fibroblast - stimulating cytokines) and the phase of remodeling (TGF- $\beta$ ). TGF- $\beta$  occupies a central role in the healing process of wounds. TGF- $\beta$  inhibits the function of activated inflammatory cells, accelerate the healing process through the proliferation and engaging of fibroblasts including periosteal mesenchymal cells which promote matrix synthesis.

It stimulates the synthesis of collagen (collagen I and III) by fibroblasts, affects integrin expression and thus participate in the composition and interconnection of collagen structures (remodeling phase).

This cytokine causes greater predominance of bone formation processes in terms of bone resorption during bone remodeling.

Also TGF- $\beta$  affects the process of angiogenesis. Schierano and Bassi<sup>15</sup>, Schierano and Bellone<sup>16</sup> noticed an increase of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 in peri-implant tissues during post-implantation period and conclude that successful osseointegration depends on the modulation and balance of bone factors for remodeling, through increased expression of TGF- $\beta$  during the post-implantation period, through the absence of increased levels of pro-inflammatory cytokines and expression of such a cytokine profile that is able to modulate osteoclastic formation and phosphatase activity in primary osteoblasts.



### **Општоварување со орални микроорганизми (microbial load)**

Со помош на концептот на резултатите добиени со микробиолошките анализи и семиквантитативната анализа дидактички ги поделивме поединечните имплантни случаи како импланти кај кои постои оптеретување со микроорганизми во нормални граници (помал број на избројани микроорганизми каде е подеднаков бројот на анаероби и аероби) и импланти кај кои се детектира значајно оптеретување со микроорганизми (голем број на микроорганизми каде доминираат анаеробите). Анализирајќи ги добиените резултати утврдивме дека населувањето на микроорганизмите на супраструктурата и нивното присуство во перимплантниот сулкус има сигнификантно влијание врз цитокинскиот профил на перимплантните ткива. Кај имплантите кои значајно се општерети со микроорганизми се детектира помал степен на пад на проинфламаторните цитокини кој кренра едно проинфламаторно миље за понтензивна реакција на маргиналната коска („marginal bone loss“).

### **Бактериска адхезија и микробно општоварување**

Микрофлората околу имплантите е слична на онаа која постои околу природните заби<sup>2</sup>. Квантитетот и квалитетот на плак адхезијата на имплантната површина е битна за долг успех на имплантната терапија. Иницијалниот настан во патогенезата на поголем број на бактериски предизвикани заболувања претставува првобитната адхезија на бактериите на имплантната површина. Од тука произлегува фактот дека превенцијата на бактериската адхезија на интароралните меки и цврсти ткива е од особено значење. Биофилмовите се создаваат на сите имплантни површини. Колонизацијата со микроорганизми на имплантната површина и перимплантните ткива може да се јави дури и за неколку минути<sup>3</sup>. Карактеристи-

### **Load of oral microorganisms (microbial load)**

Using the concept of the results obtained by the microbiological analysis and the semiquantitative analysis didactically we have divided individual implant cases to implants which has a load of microorganisms within normal limits (less is the number of the counted microorganisms where there is an equal number of anaerobic and aerobic) and implants in which significant load of microorganisms is detected (great number of microorganisms in which anaerobes dominate).

Analyzing the results we found that the microorganisms populating the supra-structure and their presence in the peri-implant sulcus has a significant impact on the cytokine profile of the peri-implant tissues.

The implants that are significantly loaded by microorganisms have lower levels of proinflammatory cytokines drop that creates a proinflammatory milieu of intense reaction of marginal bone („marginal bone loss“).

### **Bacterial adhesion and microbial load**

The microflora around implants is similar to that which exists around natural teeth<sup>(2)</sup>. The quantity and quality of plaque adhesion of the implant surface is important for the long success of implant therapy.

The initial event in the pathogenesis of a number of diseases caused by bacteria is an initial adhesion of bacteria to the implant surface. Hence the fact that the prevention of bacterial adhesion to intraoral soft and hard tissues is of particular importance.

Biofilms are created on all implant surfaces. Colonization with microorganisms on the implant surface and peri-implant tissues can occur even for a few minutes<sup>3</sup>.



ките на површината и хемискиот состав на имплантната површина влијаат на количеството и на композицијата на биофилмот. Површинските карактеристики на трансгингивалниот дел на имплантните компоненти исто така се важни детерминанти на бактериската адхезија. Бактериската адхезија покажува директна позитивна поврзаност со површинската рапавост на имплантната површина. Во зависност од површинската рапавост според Albrektsson and Wennerberg<sup>1</sup>, имплантите се категоризирани како: мазни ( $Ra < 0.5 \mu m$ ), минимално рапави ( $Ra 0.5-1.0 \mu m$ ), умерено рапави ( $Ra 1.1-2.0 \mu m$ ), рапави ( $Ra > 2.0 \mu m$ ). Механизмите на атеренција на оралните бактерии за цврстите површини се уште не се во потполност разјаснети. Во усната празнина имплантните површини се покрени со стекната обвивка која се формира преку адсорпција на саливарни компоненти на површината на трансгингивалниот абатмент или на гингивоформерите („healing implant components“). Оралните бактерии подоцна реагираат со саливарните компоненти со цел да се адхерираат за површините. По неколку дена на слободна плак формација, на површината доаѓа до матурација на плакот со зголемен процент на подвижни микроорганизми и спирохети<sup>23</sup>. Површинската модификација и употребата на различни материјали игра релевантна улога во бактериската адхезија на имплантната површина. Бактериите покажуваат различни афинитети на адхезија за различни материјали. Циркониум оксидните, циркониум нитридните како и титаниум нитрид (TiN) покрените површини<sup>24</sup> покажувале сигнификантна редукција на бактериска адхезија, иако поседувале слични карактеристики на површинска рапавост ( $Ra 0.75 \pm 0.05 \mu m$  за титаниум,  $0.76 \pm 0.06 \mu m$  за циркониум оксид). Нискиот колонизациски потенцијал на циркониум оксидот најверојатно се должи на неговата суперфи-

The characteristics of the surface and the chemical composition of the implant surface affect the quantity and composition of biofilms. Surface features of transgingival part of implant components are also important determinants of bacterial adhesion. Bacterial adhesion shows a direct positive relationship with surface roughness of implant area.

Depending on surface roughness according to Albrektsson and Wennerberg<sup>1</sup>, implants are categorized as: smooth ( $Ra < 0.5 \mu m$ ), minimally rough ( $Ra 0.5-1.0 \mu m$ ), moderately rough ( $Ra 1.1-2.0 \mu m$ ), rough ( $Ra > 2.0 \mu m$ ).

Mechanisms of adherence of oral bacteria for solid surfaces have not yet been fully clarified. In the oral cavity the implantable surfaces are covered with acquired layer that forms through adsorption of salivary components on the surface of trans-gingival abatement or gingival-formers („healing implant components“).

Oral bacteria subsequently react with salivary components to adhere to surfaces. After a few days of free plaque formation, the surface comes to the maturation of the plaque with increased percentage of moving microorganisms and spirochaetes<sup>23</sup>.

Surface modification and use of different materials play a relevant role in bacterial adhesion to implant area. Bacteria show different affinities of adhesion to various materials.

The surfaces covered with zirconium oxide, zirconium and titanium nitride (TiN)<sup>24</sup> showed significant reduction in bacterial adhesion, although they possessed similar characteristics of surface roughness ( $Ra 0.75 + 0.05 \mu m$  for titanium,  $0.76 + 0.06 \mu m$  for zirconium oxide).

The low potential for colonization of zirconium oxide is probably due to its superficial structure i.e. the degree of its electrical conductivity. During adhesion, depending on the specific



цијална структура односно на степенот на електропроводливост. Во тек на адхезијата, во зависност од специфичната отпорност на субстратот бактериите или донираат или акцептираат електрони од субстратот, односно бактериите кои донираат електрони адхерираат посилено во однос на бактериите кои акцептираат електрони од субстратот. Добиените резултати од поголемиот број на анализирани студии, ја потенцираат потребата за пронаоѓање на оптимални физичко-хемиски параметри на трансгингивалните делови на имплантните површини и на абатмените кои би го довелеле на минимум колонизацискиот потенцијал.

При поставување на протетскиот абатмен за имплантот се формира микропукнатина (microgap) помеѓу двете компоненти која може да се однесува како резервоар на микроорганизми<sup>3</sup>. Присуството на микропукнатината (микропросторот) на спојот помеѓу абатменот и имплантот во блиска релација со коската може да игра улога во маргинално губење на коска. Дизајнот на спојот помеѓу имплантот и абатменот може да има одредено влијание на количеството на бактериска пенетрација во внатрешниот дел на денгалните импланти (екстерен хексагонален спој, интерен хексагонален спој, конусен спој, три-канален интерен спој или сл.). Tesmer et al.<sup>47</sup> во својата студија, утврдиле минимална пенетрација на периодонтопатогени бактерии во внатрешниот дел на имплантот кај имплантите со конусна врска помеѓу имплантот и абатменот за разлика од имплантите со три-канален интерен спој.

Оклузалното оптеретување на имплантите и силите на двакопритисок можат исто така да придонесат за бактериската колонизација на имплант-абатмен микропросторот. Неколку фактори можат да придонесат за потенцијална колонизација на оралните микроорганизми на имплант-абатмен микропросторот и тоа: степенот на прециз-

resistance of substrate bacteria they either donated or accepted electrons from the substrate, i.e. the bacteria which donate electrons adhere more strongly against the bacteria that accepted electrons from the substrate.

The results of most of the analyzed studies emphasize the need to find the optimal physical-chemical parameters of trans-gingival parts of implantable surfaces and abatement that would bring the colonization potential to its minimum.

The setting of prosthetic abatement for the implant form microgap between the two components that can act as a reservoir of microorganisms<sup>3</sup>.

The presence of the microgap (microspace) on the connection between the implant and abatement closely involved with bone may play a role in marginal bone loss.

The design of the connection between the implant and abatement may have some impact on the amount of bacterial penetration into the inner part of dental implants (external hexagonal connection, internal hexagonal connection, cone-circuit, three-channel internal circuit, etc.).

Tesmer et al.<sup>47</sup> in their study found minimal penetration of periodontopathogenic bacteria inside the implant in implants with conical connection between the implant and abatement unlike implants with internal three-channel connection.

Occlusal load of implants and the forces of chewing pressure can also contribute to bacterial colonization of the implant-abatement microspace. Several factors may contribute to the potential colonization of oral microorganisms in implant-abatement microspace including: the degree of precise matching of implant



но совпаѓање на имплантните компоненти (implant-abatmen interface), силите кои се употребуваат при поставување на абатменти (торк 25Ncm, 35Ncm) и силите на протетичкото оптеретување при функција на имплантите -pumping effect<sup>18</sup>.

Можните фактори кои можат да предизвикаат губење на маргинална коска обсервирани во првата година на функција на имплантите, инволвираат бактериска адхезија на имплантата површина, хируршка траума, оклузално преоптеретување, присуство на микропукнатина помеѓу имплантот и абатменот, неадекватна биолошка ширина, имплантен крестален модул и сл.

components (implant-abatement interface), the forces used in setting abatements (Torquay 25Ncm, 35Ncm) and the forces of prosthetic loading during implant function - pumping effect<sup>18</sup>.

Possible factors that may cause marginal bone loss observed in the first year of implant function, involved bacterial adhesion to implant surface, surgical trauma, occlusal overload, the presence of microgap between the implant and abatement, inadequate biological width implant crestal module etc.



Слика 1 / Figure 1

Слика 1. Протетичка супраструктура

Figure 1. Prosthetic suprastructure

Табела 1. IL-1 $\beta$  промени (R1) / Bonferroni test / Table 1. IL-1 $\beta$  changes (R1) / Bonferroni test

	IL-1 $\beta$ промени (R1)	{1}	{2}	{3}
		70,61	216,42	177,03
1	IL-1 $\beta$ / пред		***	***
2	IL-1 $\beta$ / 4 мес. по	***		***
3	IL-1 $\beta$ / 12 мес. од	***	***	

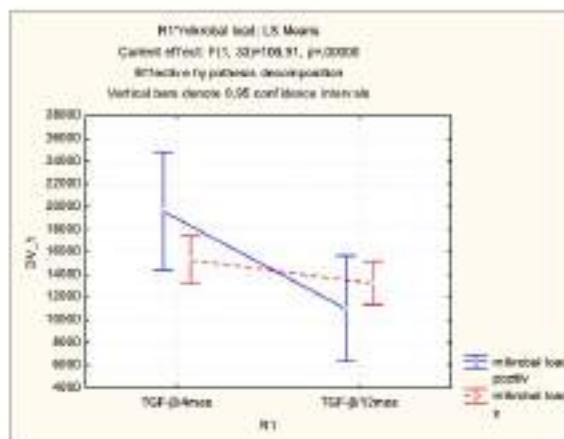
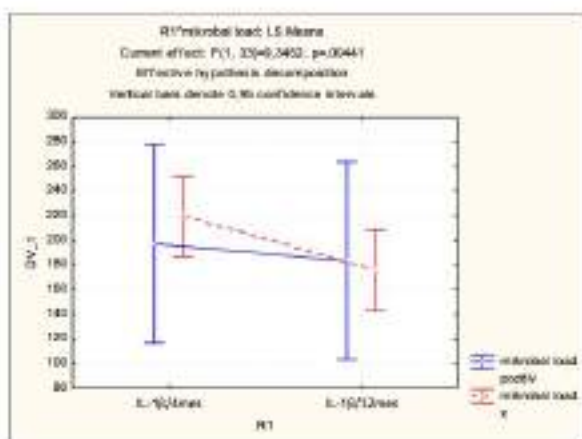
p<0,001\*\*\*

Табела 2. TGF- $\beta$  промени (R1) / Bonferroni test / Table 2. TGF- $\beta$  changes (R1) / Bonferroni test

	TGF- $\beta$ промени (R1)	{1}	{2}	{3}
		3014,6	15952,0	12952,0
1	TGF- $\beta$ / пред		***	***
2	TGF- $\beta$ / 4 месеци по	***		***
3	TGF- $\beta$ / 12 месеци од	***	***	

p<0,001\*\*\*





**Графикон 1.** Просечните вредности на про-инфламаторни IL-1β во однос на товарот на микроорганизми

**Chart 1.** The average values of the pro-inflammatory IL-1β in relation to the load of microorganisms

**Графикон 2.** Просечните вредности на анти-инфламаторни TGF-β цитокини во однос на товарот на микроорганизми

**Chart 2.** The average values of anti-inflammatory TGF-β cytokines in relation to the load of microorganisms

**Табела 3.** IL-1β промени / оптеретување со микроорганизми/ Bonferroni test

**Table 3.** IL-1β changes/ load of microorganisms / Bonferroni test

	Mikrobal load	IL-1β промени (R1)	{1}	{2}	{3}	{4}
			219,61	175,95	197,30	183,52
1	Нормални граници	IL-1 β / 4 мес. по		***		
2	Нормални граници	IL-1 β / 12 мес. од	***			
3	Значајно оптеретување	IL-1 β / 4 мес. по				
4	Значајно оптеретување	IL-1 β / 12 мес. од				

p<0,001\*\*\*

**Табела 4.** TGF-β промени / оптеретување со микроорганизми/ Bonferroni test

**Table 4.** TGF-β changes/ load of microorganisms / Bonferroni test

	Mikrobal load	TGF-β промени (R1)	{1}	{2}	{3}	{4}
			15347,0	13279,0	19582,0	10989,0
1	Нормални граници	TGF- β / 4 месеци по		***		
2	Нормални граници	TGF- β / 12 месеци од	***			
3	Значајно оптеретување	TGF- β / 4 месеци по				***
4	Значајно оптеретување	TGF- β / 12 месеци од			***	

p<0,001\*\*\*



## ЛИТЕРАТУРА

## REFERENCES

1. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1 – review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *International Journal of Prosthodontics*. 2004;17: 536–543.
2. Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *J Periodont Res*. 1989;24:96–105.
3. Callan DP, Cobb CM, Williams KB. DNA probe identification of bacteria colonizing internal-surfaces of the implant-abutment interface: A preliminary study. *J Periodontol*. 2005 ;76:115-120.
4. Dixon DR, Bainbridge BW and Darveau RP. Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontology* 2000. 2004: 35, 53–74.
5. Furst MM, Salvi G, Lang NP, Persson R. 2007 Bacterial colonization immediately after installation of oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res*;18:501-508.
6. Hooper LV. 2009 Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nature Reviews in Microbiology* 7, 367–374.
7. James JA, Poulton KV, Haworth SE, Payne D, McKay IJ, Clarke FM, Hughes FJ & Linden GJ 2007 Polymorphisms of TLR4 but not CD14 are associated with a decreased risk of aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* ;34, 111–117.
8. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 2003;149, 279–294.
9. Mitsugi O, Fumico H, Yoshiko S, Xiabo Z, Kazuo M, Katsuyuki K. Intrafamilial distribution of nine putative periodontopathogenes in dental plaque samples analyzed by PCR, Mitsugi Okada, Fumico Hayasky et al. *Journal of Oral Science*. 2004;46(3):149-156.
10. Nonnenmacher C, Dalpke A, Zimmermann S, Flores-De-Jacoby L, Mutters R & Heeg, K. DNA from periodontopathogenic bacteria is immunostimulatory for mouse and human immune cells. *Infection and Immunity* 2003;71, 850–856.
11. Odila P, Salete M, Beatriz C. Periodontopathogenes in the saliva and subgingival dental plaque of group of mothers, *Pesqm.Odontol.Bras*. 2002 :16, 4, Sao Paulo.
12. Petrovic A, Vojdic D. Determination of Inflammatory cytokine concentrations in gingival fluid samples of dental implants and control teeth, *Serbian dental Journal*. 2000;47 (1):15
13. Quirinen M, Bollen CML, Papaionnou W, van Eldere J, van Steenberghe D. The influence of titanium abutments surface roughness on plaque accumulation and gingivitis.Sort term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants Res*.2002;13:1-19
14. Scarano A, Piattelli M, Vrespa G, Caputi S, Piattelli A. Bacterial adhesion on titanium nitride coated and uncoated implant: an in vivo human study, *Journal of Oral Implantology*. 2003. Vol. XXIX/No. 2, pp:80-85.
15. Schierano G, Bassi F. Cytokine production and bone remodeling in a patient wearing overdentures on oral implants, *Journal of Dental Research*. 2000. Vol.79, 1675-1682.
16. Schierano G, Bellone G. TGF- $\beta$  and IL-10 around implants, *J Dent Res* 2003. 82(6):428-432
17. Tesmer M, Wallet S, Koutouzis T and Lundgren T. Bacterial Colonization of the Dental Implant Fixture–Abutment Interface: An In Vitro Study, *J Periodontol*. 2009. 80(12) :1991-1997
18. Zipprich H, Weigl P, Lange B, Lauer H-C. Micromovements at the implant-abutment interface: Measurement,causes, and consequences. *Implantologie*. 2007. 15:31-46.