

# Učinkovitost fotodinamske terapije diodnim laserom valne duljine 445nm i otopine riboflavina na biofilm mikroorganizama na površini dentalnih implantata

---

**Morelato, Luka**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:106485>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-01**



*Repository / Repozitorij:*

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)





Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Luka Morelato

**UČINKOVITOST FOTODINAMSKE  
TERAPIJE DIODNIM LASEROM VALNE  
DULJINE 445NM I OTOPINE RIBOFLAVINA  
NA BIOFILM MIKROORGANIZAMA NA  
POVRŠINI DENTALNIH IMPLANTATA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Luka Morelato

**UČINKOVITOST FOTODINAMSKE  
TERAPIJE DIODNIM LASEROM VALNE  
DULJINE 445NM I OTOPINE RIBOFLAVINA  
NA BIOFILM MIKROORGANIZAMA NA  
POVRŠINI DENTALNIH IMPLANTATA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

izv. prof. dr. sc. Dragana Gabrić, dr.med.dent.

prof. dr. sc. Ana Budimir

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

School of Dental Medicine

Luka Morelato

**EFFECT OF ANTIMICROBIAL  
PHOTODYNAMIC THERAPY WITH DIODE  
LASER OF 445 NM WAVELENGTH AND  
RIBOFLAVIN DYE ON MICROORGANISMS'  
BIOFILM ON DENTAL IMPLANT SURFACE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

izv. prof. dr. sc. Dragana Gabrić, dr.med.dent.

prof. dr. sc. Ana Budimir

Zagreb, 2023.

Rad je ostvaren na Zavodu za oralnu kirurgiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

**Lektor hrvatskog jezika:** Adriana Pavković, mag.educ.philol.croat.

**Lektor engleskog jezika:** Sanja Rabar, mag.educ.philol.angl.

**Sastav Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada:**

1. Prof.dr.sc. Vlaho Brailo, predsjednik,
2. Izv.prof.dr.sc. Ana Badovinac, član,
3. Izv.prof.dr.sc. Nataša Beader, član.

**Sastav Povjerenstva za obranu doktorskog rada:**

1. Prof.dr.sc. Vlaho Brailo, predsjednik,
2. Izv.prof.dr.sc. Ana Badovinac, član,
3. Izv.prof.dr.sc. Nataša Beader, član,
4. Doc.dr.sc. Petar Đanić, zamjena.

**Datum obrane rada:** \_\_\_\_\_

Rad sadrži: 79 stranica

8 tablica

26 slika

1 CD

Rad je vlastito autorsko djelo, koje je u potpunosti samostalno napisano uz naznaku izvora drugih autora i dokumenata korištenih u radu. Osim ako nije drukčije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu su izvorni doprinos autora poslijediplomskog doktorskog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija odnosno propusta u navođenju njihovog podrijetla.

## **Zahvala**

Zahvaljujem se mentoricama na podršci i pomoći prilikom izrade ovog rada.  
Velike zahvale na ideji i pomoći kolegama Igoru Smojveru i Ivanu Kataliniću.

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji.

## Sažetak

### UČINKOVITOST FOTODINAMSKE TERAPIJE DIODNIM LASEROM VALNE DULJINE 445NM I OTOPINE RIBOFLAVINA NA BIOFILM MIKROORGANIZAMA NA POVRŠINI DENTALNIH IMPLANTATA

Cilj istraživanja bio je utvrditi učinak antimikrobne fotodinamske terapije (PDT) 0,1% riboflavinom kao fotosenzitizirajućim sredstvom aktiviranim diodnim laserom valne duljine 445 nm na biofilm *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans* na površini dentalnih implantata te usporediti s učinkom fotodinamske terapije 0,1% metilenskim modrilom kao fotosenzitizirajućim sredstvom aktiviranim diodnim laserom valne duljine 660 nm i učinkom 0,2% klorheksidina. Istraživanje je provedeno na 80 dentalnih implantata kontaminiranih biofilmom *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*, nasumično podijeljenih u 4 skupine od 20 implantata u svakoj skupini. Negativna kontrolna skupina (NC) je ostavljena bez tretmana površine, pozitivna kontrolna skupina (PC) tretirana je 0,2% otopinom klorheksidina, ispitivana fotodinamska skupina (PDT1) tretirana je 0,1% riboflavinom kao fotosenzitizirajućim sredstvom aktiviranim diodnim laserom valne duljine 445 nm, druga fotodinamska skupina tretirana je 0,1% metilenskim modrilom kao fotosenzitizirajućim sredstvom aktiviranim diodnim laserom valne duljine 660 nm (PDT2). Usporedbom dobivenih rezultata utvrđeno je da je novi fotodinamski protokol dezinfekcije površine implantata diodnim laserom valne duljine 445nm i otopine 0,1% riboflavina usporediv s postojećim protokolima dezinfekcije površine implantata otopinom 0,2% klorheksidinom, kao i diodnim laserom valne duljine 660 nm i 0,1% otopinom metilenskog modrila. Zaključeno je da ispitivani protokol može postaviti temelj daljnjim kliničkim istraživanjima i početku upotrebe nove valne duljine plavoga spektra svjetlosti u kombinaciji s novim fotosenzibilizirajućim sredstvom u kliničkoj praksi.

**Ključne riječi:** fotodinamska terapija; riboflavin; diodni laser; periimplantitis

## Summary

### EFFECT OF ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY WITH DIODE LASER OF 445 NM WAVELENGTH AND RIBOFLAVIN DYE ON MICROORGANISMS' BIOFILM ON DENTAL IMPLANT SURFACE

**Aim:** The occurrence of peri-implantitis was observed with the beginning of the placement of the first dental implants. With the increase in the number of dental implants, the frequency of complications in clinical practice, in the form of peri-implant diseases, has also increased. Antimicrobial photodynamic therapy (PDT) was introduced as a potential periimplantitis treatment option. The aim of the study was to determine the effect of the new antimicrobial photodynamic therapy (PDT) with the novel diode laser light (SiroLase Blue; Dentsply Sirona; Germany) of 445 nm wavelength in combination with the 0.1% riboflavin solution as a photosensitizing agent on the *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* biofilm on the surface of dental implants, and compare it with the effect of PDT with methylene blue 0.1% photosensitizing agent activated by diode laser with a wavelength of 660 nm and the effect of the often used 0.2% chlorhexidine solution.

**Methods:** In the study 80 dental implants contaminated with *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* biofilm was used, randomly divided into 4 groups of 20 implants in each one. The implants were removed from the bacterial–fungal suspension using a sterile forceps, gently dried with sterile gauze to remove the excess bacterial and fungal solution and placed on sterile silicone holders. The negative control group (NC) was left without surface treatment. The positive control group (PC) was treated with a sterile cotton pellet soaked in a 0.2% chlorhexidine-based solution for 60 s using a brushing movement. The examined group was treated with 0.1% riboflavin dye and then radiated with a diode laser at 445 nm (Q power = 100 mW) in the pulsed mode of 100 Hz using an EasyTip 320  $\mu\text{m}$ , with the max power density of 124.34 W/cm<sup>2</sup> and energy density of 1.24 J/cm<sup>2</sup>, for 60 s moving in circles at approximately 1 mm from the implant surface. The second PDT group (PDT2) was treated using a similar procedure, with 0.1% methylene blue as a photosensitizing agent activated by a diode laser with a wavelength of 660 nm (Q power = 100 mW), in continuous-wave mode using an EasyTip 320  $\mu\text{m}$ , with the max power density of 124.34 W/cm<sup>2</sup> and max energy density of 1240 J/cm<sup>2</sup>, for 60 s moving in circles at approximately 1 mm from the implant surface.



**Results:** PDT1 and PDT2 group showed greater reduction of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* compared to NC group, and no significant difference compared to PC group. PDT1 and PDT2 groups compared showed no significant difference in disinfection of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* microorganisms' biofilm on dental implant surface.

**Conclusions:** Analyzing the obtained results, it was determined that the new photodynamic protocol for disinfection of the implant surface with a diode laser of wavelength 445 nm and a 0.1% riboflavin solution is comparable to the existing protocols for disinfection of the implant surface with a solution of 0.2% chlorhexidine, as well as with a diode laser of wavelength 660 nm and 0, 1% methylene blue solution. It was concluded that the investigated protocol can lay the foundation for further clinical research and the beginning of use of a new wavelength of the blue light spectrum in combination with a new photosensitizing agent in clinical practice.

**Keywords:** Photodynamic therapy; riboflavin; diode laser; periimplantitis

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Infekcije oko implantata .....	2
1.1.1. Periimplantatni mukozitis .....	2
1.1.2. Periimplantitis .....	2
1.1.2.1. Etiologija .....	4
1.1.2.2. Faktori rizika za razvoj periimplantitisa .....	5
1.1.2.2.1. Parodontitis u anamnezi.....	5
1.1.2.2.2. Oralna higijena .....	5
1.1.2.2.3. Keratinizirana mukoza.....	6
1.1.2.3. Faktori ovisni o implantatu.....	6
1.1.2.3.1. Površina implantata .....	7
1.1.2.3.2. Pozicija i dizajn spoja implantata i nadogradnje .....	7
1.1.2.4. Sistemski faktori rizika .....	8
1.1.2.4.1. Pušenje.....	8
1.1.2.4.2. Dijabetes .....	9
1.1.2.5. Terapija .....	9
1.1.2.5.1. Nekirurška terapija / Konzervativna terapija.....	10
1.1.2.5.2. Kirurška resektivna terapija.....	10
1.1.2.5.3. Kirurška regenerativna terapija .....	11
1.2. Fotodinamska terapija.....	11
1.2.1. Laseri.....	12
1.2.1.1. Mehanizam djelovanja lasera .....	12
1.2.1.2. Fizika lasera.....	13
1.2.1.3. Interakcija s tkivom .....	14
1.2.1.4. Tipovi lasera .....	15

1.2.1.8.1.	Sigurnost primjene lasera u dentalnoj medicini .....	16
1.2.1.9.	Svojstva laserske zrake .....	17
1.2.1.9.1.	Valna duljina.....	17
1.2.1.9.2.	Antimikrobni potencijal plavog laserskog svjetla valne duljine 445nm .....	18
1.2.1.9.3.	Energija i snaga lasera .....	18
1.2.1.9.4.	Vrijeme ekspozicije .....	19
1.2.1.9.5.	Djelovanje diodnog lasera na mikroorganizme .....	19
1.2.2.	Fotosenzitivna sredstva .....	20
1.2.2.1.1.	Uloga kisika i kisikovih spojeva, molekularni mehanizmi djelovanja.....	21
1.2.2.1.2.	Riboflavin kao fotosenzitivno sredstvo .....	22
1.3.	Diodni laser valne duljine 445 nm u kliničkoj primjeni .....	22
<b>2.</b>	<b>CILJEVI I HIPOTEZE</b> .....	<b>25</b>
2.1.	Primarni cilj istraživanja:.....	26
2.2.	Sekundarni ciljevi istraživanja: .....	26
2.3.	Hipoteze istraživanja: .....	26
<b>3.</b>	<b>MATERIJALI I POSTUPCI/ISPITANICI I POSTUPCI</b> .....	<b>27</b>
3.1.	Uzorci .....	28
3.2.	Uzgoj mikroorganizama i kontaminacija uzoraka .....	29
3.3.	Dezinfekcijski protokoli .....	30
3.4.	Uzorkovanje i analiza uzoraka .....	35
3.5.	SEM analiza.....	37
3.6.	Statistička analiza .....	38
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	<b>50</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>60</b>
<b>8.</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>77</b>

## Popis skraćenica

<b>PDT</b>	fotodinamska terapija <i>(eng. photodynamic therapy)</i>
<b>AAP</b>	Američka parodontološka akademija <i>(eng. American Academy of Periodontology)</i>
<b>EFP</b>	Europska parodontološka federacija <i>(eng. European Federation of Periodontology)</i>
<b>CHX</b>	klorheksidin
<b>CIST</b>	kumulativna interseptivna potporna terapija <i>(eng. Cumulative interceptive supportive therapy)</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	ugljičkov dioksid
<b>Nd:YAG</b>	neodimij: itrij-aluminij-garnet
<b>Er: YAG</b>	erbij: itrij-aluminij-garnet
<b>ROS</b>	reaktivne kisikove vrste <i>(eng. reactive oxygen species)</i>
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	jednostavni singletni kisik
<b>O<sub>2</sub></b>	kisik
<b><sup>3</sup>O<sub>2</sub></b>	pobuđeni singletni kisik
<b>KBC</b>	klinički bolnički centar
<b>MALDI-TOF MS</b>	masena spektrometrija

(eng. *matrix assisted laser desorption/ionisation - time of flight mass spectrometry*)

**NC** negativna kontrolna skupina

**PC** pozitivna kontrolna skupina

**PDT1** prva fotodinamska terapijska skupina

**PDT2** druga fotodinamska terapijska skupina

**SEM** pretražna elektronska mikroskopija

(eng. *scanning electron microscopy*)

**CFU** jedinica koje stvaraju kolonije

(engl. *Colony forming units*)

**FMN** flavin mononukleotid

## **1. UVOD**

## 1.1. Infekcije oko implantata

Pojava periimplantitisa uočena je s početkom postavljanja prvih dentalnih implantata(1). Povećanjem broja ugrađenih dentalnih implantata u kliničkoj se praksi povećava i učestalost komplikacija u vidu periimplantatnih bolesti (2). Najnovija klasifikacija periimplantatnih bolesti i stanja predstavljena je na Svjetskoj radionici Američke parodontološke organizacije i Europske parodontološke federacije (AAP/EFP) 2017. godine, gdje su promjene podijeljene na periimplantatni mukozitis i periimplantitis (3). Obje promjene, i periimplantatni mukozitis, i periimplantitis, smatraju se stanjima povezanim s plakom. Periimplantatni mukozitis prethodi periimplantitisu te ga karakterizira krvarenje pri sondiranju i vizualni znakovi upale mekog tkiva oko implantata u funkciji, dok je periimplantitis definiran kao upalna promjena koja zahvaća uz meka tkiva i kost oko implantata u funkciji (4). Patogeneza periimplantatnih bolesti može biti povezana s brojnim čimbenicima rizika i uzročnicima. Periimplantatne upale moguće je liječiti adekvatnom kontrolom infekcije oko implantata, koja kliničarima predstavlja veliki izazov zbog složene patogeneze bolesti i otežane dekontaminacije hrapave i posebno obrađene površine dentalnih implantata (5–8). Još nisu usuglašeni stavovi oko reverzibilnosti upalne promjene (4).

### 1.1.1. Periimplantatni mukozitis

Povećanjem učestalosti istraživanja potencijalne upale oko implantata ustanovljena je velika prevalencija nekog od oblika periimplantatne bolesti (9). Dokazana je pojava periimplantatnog mukozitisa u čak 80% ispitanika na 50% ispitivanih mjesta oko implantata. Podaci se u literaturi razlikuju zbog različite dijagnostičke definicije bolesti u istraživanjima (10). Periimplantatni mukozitis dijagnosticira se kliničkim znakovima upale, poput krvarenja tijekom sondiranja s ili bez supuracije (11–13).

### 1.1.2. Periimplantitis

Uznapredovali stadij periimplantatne upale koji uz upalne promjene mekog tkiva zahvaća i kost naziva se periimplantitis (4). Periimplantitisu prethodi upala mekog tkiva oko implantata, periimplantatni mukozitis (14). Prijelaz između periimplantatnog mukozitisa i periimplantitisa je postepen i klinički teško odrediv. Periimplantitis ima nešto manju prevalenciju od periimplantatnog mukozitisa, a javlja se u 4,7% - 45% ispitanika na 3,6% - 22,1% ispitivanih

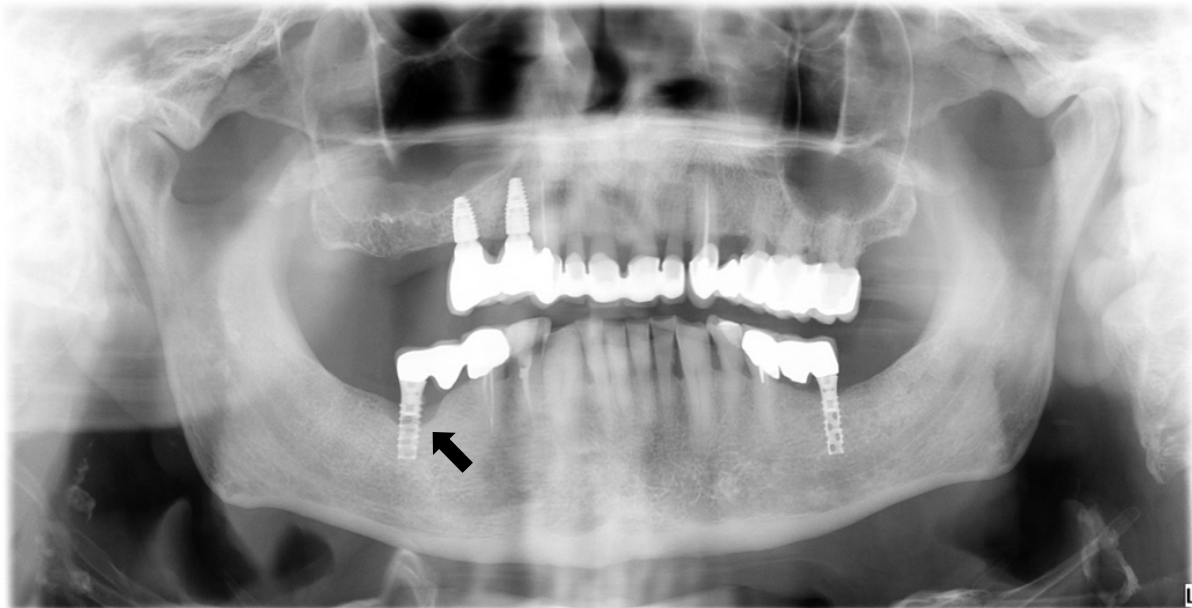
mjesta oko implantata (15–19). Gubitak periimplantatne kosti pokazatelj je periimplantitisa, iako je teško odrediti je li gubitak nastao upravo uslijed progresivne upalne bolesti. Diskutabilna je i granica gubitka kosti koja definira bolest. Preporučeno je da se granica postavi na 2 mm od očekivane granice marginalne kosti nakon remodelacije kosti po postavi dentalnih implantata (13). Čak i unatoč takvoj definiciji očekivana granica marginalne kosti podložna je subjektivnoj procjeni.

Na temelju zajedničkog izvješća radne grupe stručnjaka spomenute svjetske radionice AAP/EFP o klasifikaciji parodontnih i periimplantatnih bolesti i stanja potrebni kriteriji za postavljanje dijagnoze periimplantitisa su:

- prisutnost krvarenja i/ili gnojenja pri sondiranju
- dubina sondiranja  $\geq 6$  mm,
- razina kosti  $\geq 3$  mm apikalno od najkoronalnijeg dijela implantata ili od granice poliranog i hrapavog dijela kod implantata na razini mekog tkiva (20).

Korištenje radiografskih snimaka potrebno je za utvrđivanje defekta koštanog tkiva oko implantata prilikom postavljanja dijagnoze (Slika 1.). Defekt se može dijagnosticirati dvodimenzionalnim radiografskim snimkama, poput intraoralne radiološke snimke ili panoramskim slike, ili pak s trodimenzionalnim snimkama kao što je računalna tomografija i računalna tomografija s konusnim snopom (21). Uporaba intraoralnih radioloških snimaka je najčešća u svakodnevnoj praksi, ali je ograničena na dvodimenzionalni prikaz defekta te zbog superpozicije struktura ne može uvijek prikazati točnu razinu periimplantatne kosti (22). Nepostojanje 3D informacija kod intraoralnih radioloških snimaka otežava procjenu i razlikovanje periimplantatnih koštanih defekata (23).





Slika 1. Ortopantomografska snimka na kojoj je strelicom označen implantat s periimplantatnim defektom kosti većim od 2mm koji ukazuje na periimplantitis. Preostali implantati koji se uočavaju na panoramskoj snimci su bez znakova periimplantitisa, s urednom razinom periimplantatne kosti.

#### 1.1.2.1. Etiologija

Više od dvadeset različitih vrsta mikroorganizama identificirano je kao potencijalna komponenta plaka oko implantata koji dovodi do upale, prvo periimplantatnog mekog tkiva te progresijom i do resorpcije kosti, što posljedično dovodi do potencijalnog gubitka implantata (8).

Primarni etiološki čimbenik razvoja periimplantatnih bolesti je mikrobní biofilm u kombinaciji s drugim čimbenicima rizika. Dokazano je da se biofilm povezan s periimplantitisom sastoji od parodontnih patogena, ali je po prirodi složeniji (24). Kliničke studije na ljudima izvijestile su o povezanosti specifičnih patogena s lezijama periimplantitisa, koji se sastoje pretežno od bakterija, ali i određenih gljiva i virusa (25).

Parodontni patogeni u periimplantatnom džepu implantata povezanih s periimplantitisom su: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* te *Parvimonas micra* (26). Dubina parodontnog džepa u pozitivnoj je korelaciji s bakterijskim vrstama *Porphyromonas spp.*, *Fusobacterium spp.* i *Tannerella forsythia* (27). Također je dokazano je da su određene specifične bakterijske vrste povezane s pojedinim

stanjima poput *Enterococcus faecalis* koja je važna bakterija u gubitku koštane mase oko implantata (28). *Staphylococcus aureus*, iako nije tipičan parodontni patogen, naveden je kao ključni mikroorganizam koji uzrokuje periimplantitis (29,30). Budući da *S. aureus* ima visok afinitet prema titanskoj površini implantata, prepoznat je kao rani kolonizator i snažno povezan sa stvaranjem biofilma na titanskim implantatima (31). Nadalje, prisutnost visokih razina *S. aureus* u dubokim periimplantatnim džepovima također je povezana s prisutnošću supuracije i krvarenja pri sondiranju (32). Studije o subgingivalnim biofilmovima izvijestile su o povezanosti *Candida albicans* s periimplantitisom, češće kod dijabetičara (33). Za razliku od mnogih vrsta bakterija za koje je dokazano da uzrokuju periimplantitis, gljiva vrste *Candida* je najčešće izolirana gljiva u periimplantatnim bolestima gdje razvija biofilmove na površini implantata (34). Učinak gljiva vrste *Candida* već je povezan s podržavanjem parodontne upale u parodontitisu i stvaranjem debelih biofilмова na površini implantata (35).

#### 1.1.2.2. Faktori rizika za razvoj periimplantitisa

S obzirom na sve veći broj postavljenih implantata i sve veću potrebu za postavljanjem dentalnih implantata, periimplantitis predstavlja javnozdravstveni problem (36,37). Unatoč pretežno bakterijskoj etiologiji, različiti čimbenici mogu povećati rizik od razvoja periimplantitisa (38).

Sljedeći čimbenici ili okolnosti prijavljeni su kao čimbenici rizika.

##### 1.1.2.2.1. Parodontitis u anamnezi

Postoje brojni dokazi da implantati postavljeni kod pacijenata s poviješću parodontne bolesti imaju veći rizik za razvoj periimplantitisa, što rezultira nižim stopama preživljavanja i uspjeha implantološke terapije (6,39–41). Posebno su ugroženi implantati koji se ugrađuju pacijentima s parodontnom bolešću na susjednim prirodnim zubima, a dodatan rizik predstavlja i prisutnost dubljih džepova te gubitak pričvrstka oko preostalih prirodnih zuba (42–45).

##### 1.1.2.2.2. Oralna higijena

Periimplantitis je upala čije je glavni uzrok bakterijski biofilm, odnosno plak (20). Zbog toga su pacijentove navike i sposobnosti čišćenja od ključne važnosti za održavanje zdravlja

oko implantata. Međutim, različiti čimbenici također utječu na mogućnost čišćenja oko implantata, kao što su oblik i položaj suprastrukture implantata i prisutnost keratinizirane sluznice oko implantata (46). Dakako, redovite kontrole i posjete doktoru dentalne medicine važne su za održavanje dobre oralne higijene, periimplantatnog zdravlja i motivaciju pacijenata (47).

#### 1.1.2.2.3. Keratinizirana mukoza

Uloga periimplantatnog mekog tkiva oko implantata pokazala se kao značajan čimbenik u ishodu implantološke terapije zbog sposobnosti poboljšanja estetike, zdravlja i dugoročne stabilnost implantata.

Stanje mekog tkiva oko implantata može utjecati na njegovu osjetljivost na periimplantatnu bolest. Pacijenti s tankim paradontnim fenotipom skloniji su recesiji periimplantatne sluznice (48). Izlaganje hrapave površine implantata mediju usne šupljine otežava kontrolu plaka i povećava akumulaciju bakterija, što dovodi do potencijalnog povećanja osjetljivosti implantata na periimplantitis (49).

Minimalna zona od 2 mm keratiniziranog mekog tkiva zagovara se kao poželjnom za zdravlje periimplantatnog tkiva i dugoročnu stabilnost. Ipak, njegova apsolutna nužnost još je uvijek predmet rasprave na stručnim skupovima (50).

#### 1.1.2.3. Faktori ovisni o implantatu

Iako se u literaturi navodi da broj implantata ne utječe na rizik od periimplantitisa, položaj implantata je kritičan za dugoročan uspjeh (51,52). Loša pozicija implantata predstavlja značajan faktor rizika za periimplantitis (52). Resorpcija krestalne kosti može se pojaviti ukoliko se implantat postavi preblizu prirodnim zubima ili drugim implantatima. Nepravilan položaj može kompromitirati adekvatan pristup za kontrolu plaka i tako dodatno povećati rizik od periimplantatne bolesti. Također, pozicije implantata koje se nalaze izvan koštane ovojnice ili one s tankom bukalnom kosti (< 1 mm) sklonije su recesiji sluznice, osobito u bolesnika s tankim biotipovima gingive (48).

#### 1.1.2.3.1. Površina implantata

Utjecaj površine implantata na njegovu osjetljivost na periimplantitis još uvijek je diskutabilan (36,39). Hrapavost i površinska morfologija implantata olakšavaju početno stvaranje biofilma, ali njegov dugoročni učinak na upalni proces i stabilnost kosti još nije u potpunosti razjašnjen.

Do sada je titan bio materijal izbora u implantološkoj terapiji. Unatoč tome, implantati od cirkonijevog dioksida postupno dolaze na tržište (53). Najveće prednosti cirkonijevog dioksida leže u njegovoj biokompatibilnosti, odličnoj integraciji u meko tkivo, niskom afinitetu prema plaku i smanjenim upalnim procesima u usporedbi s titanom (54–56).

#### 1.1.2.3.2. Pozicija i dizajn spoja implantata i nadogradnje

Dizajn protetske rekonstrukcije također uvelike pridonosi dugoročnom uspjehu implantata. Loše dizajnirane suprastrukture ometaju kontrolu plaka, što povećava rizik od razvoja periimplantatne bolesti (57). Loše rubno zatvaranje ključni je faktor rizika za razvoj periimplantitisa (58).

Implantati s cementiranim protetskim komponentama su 3,6 puta skloniji periimplantitisu u usporedbi s onima kod kojih su protetske komponente retinirane vijkom (16). To se uglavnom pripisuje riziku od ostavljanja viška cementa u submukoznom području, osobito kada se kao sredstva za cementiranje koriste kompozitni cementi (59). Stoga treba izbjegavati duboke submukozne rubove kako bi se osigurala dovoljna vidljivost i pristup za uklanjanje cementa (60).

Fiksne rekonstrukcije cijele čeljusti poduprte implantatima povezane su sa 16-strukim rizikom od periimplantitisa u usporedbi s pojedinačnim krunicama (16). To je uglavnom zbog loše dostupnosti za kontrolu plaka. Nadalje, uzrok tomu se može naći i u anamnezi uznapredovale parodontne bolesti koja je dovela do gubitka prirodne denticije.

Implantati dizajnirani za postavljanje u razini s kosti, u kombinaciji s konveksnim nadomjescima pod kutom većim od 30°, značajno povećavaju rizik od periimplantitisa (61). Promjena platforme nadogradnje (engl. platform swich) preporuča se kako bi se smanjio gubitak periimplantatne koštane mase (61,62).

Stoga se implantati dizajnirani za postavljanje u razinu s mekim tkivom (engl. *tissue level* implantati) često preporučaju za neestetske restauracije zbog supramukoznog položaja mikropukotine i dostupnosti za kontrolu plaka. U estetskoj zoni kada su indicirani implantati na razini kosti, preporučljivo je korištenje implantata koji imaju promjenu platforme sa suprastrukturama pričvršćenim vijcima i anatomski oblikovanim izlaznim profilima. Protetski radovi pričvršćeni vijcima također se lako uklanjaju u situaciji kada je potrebna bolja vidljivost i pristup za liječenje periimplantitisa.

#### 1.1.2.4. Sistemske faktori rizika

Osim navedenih lokalnih faktora rizika, i sistemska oboljenja mogu dovesti od povećanog rizika od periimplantitisa.

Osteoporoza, metabolički poremećaj kostiju, također se smatrao mogućim faktorom rizika za razvoj periimplantitisa. Međutim, iako su zabilježene nešto veće razine resorpcije kosti kod bolesnika s osteoporozom, nema jasnih dokaza o povećanoj incidenciji periimplantitisa ili gubitka implantata (63).

Pretilost je još jedno vrlo rašireno stanje sa štetnim učincima i na zdravlje parodonta (64). Definiše se kao abnormalno ili prekomjerno nakupljanje tjelesne masti s negativnim učincima na opće zdravlje. Pretilost je veliki medicinski problem povezan s izrazitim fiziološkim promjenama, uključujući dijabetes i koronarnu bolest srca. Pretilost je također povezana s generaliziranim i stalnim hiperupalnim stanjem, što uzrokuje izmijenjeni imunološki odgovor i povećanu proizvodnju proupalnih citokina koji nepovoljno utječu na zdravlje parodontnih tkiva i razinu alveolarne kosti (65). Kliničke studije su utvrdile da je pretilost faktor rizika za periimplantitis (66).

##### 1.1.2.4.1. Pušenje

Negativni učinci pušenja na zdravlje parodonta odavno su dobro utvrđeni. Pušenje utječe na imunološki odgovor, oštećujući obrambene mehanizme domaćina i odgovor na mikrobe (67). Pušenje cigareta također nepovoljno utječe na cijeljenje rana te je štetno jer ometa cijeljenje prilikom terapija parodontne i periimplantatne upale (57,68). Pušenje dodatno povećava oksidativni stres i upalu s izraženim promjenama u mikrobnjoj flori. Jednako tako

utječe i na kolonizaciju implantata parodontnim patogenima kao što su *Porphyromonas gingivalis* i *Fusobacterium nucleatum* (69).

Pušači su gotovo dvostruko više izloženi riziku od razvoja periimplantitisa u usporedbi s nepušačima (39). Štoviše, pušenje je povezano s povećanom težinom periimplantitisa lezija, dok je količina konzumiranih cigareta proporcionalna količini razaranja tkiva (58).

#### 1.1.2.4.2. Dijabetes

Zbog svoje sve veće incidencije dijabetes je jedno od najtemeljitiše istraženih stanja. Bolest utječe na lučenje inzulina, njegovu funkciju ili oboje, uzrokujući poremećaj razine glikemije. Loša kontrola glikemije ima ključnu ulogu u napredovanju i težini parodontitisa (70). Ova povezanost je objašnjena s više vaskularnih i staničnih odgovora koje dovode do pojačanog razaranja tkiva i oslabljenog odgovora na cijeljenje. Slični mehanizmi pokreću se u periimplantatnim tkivima, što rezultira većom osjetljivošću na periimplantitis kod osoba koje pate od hiperglikemije (71). Loše kontrolirani dijabetičari imaju 46% veći rizik od razvoja periimplantitisa, s dubljim periimplantatnim džepovima i većim rubnim gubitkom koštane mase, u usporedbi s normoglikemičnim osobama (72).

#### 1.1.2.5. Terapija

Liječenje periimplantitisa kliničarima predstavlja veliki izazov zbog složene patogeneze bolesti i otežane dekontaminacije hrapave i posebno obrađene površine dentalnih implantata (5). Iako su u literaturi predloženi različiti načini terapije, nekiruski ručni debridman kiretama se i dalje smatra zlatnim standardom u liječenju periimplantatne upale (73). Uz fizikalne metode dodatno se koriste i različiti kemijski preparati za dekontaminaciju površine implantata, uključujući klorheksidin, antimikrobna sredstva i vodikov peroksid (5). Strukturne nepravilnosti različito tretiranih površina titanskih dentalnih implantata, koje imaju ulogu bolje oseointegracije povećavanjem potencijalne kontaktne površine implantata i kosti, pogoduju nakupljanje bakterija i sprječavaju potpunu dekontaminaciju (74). Osim toga, dizajn dentalnih implantata u obliku vijaka s navojima različite izraženosti i dubine otežava pristup i temeljito čišćenje svih površina (75). Uporabom pojedinih sredstava moguće je uzrokovati i oštećenje mikrostrukture površine implantata (76).

Za liječenje periimplantitisa mogu se primijeniti konzervativne (nekirurške) i kirurške terapije. Pri tome se kirurško liječenje može izvesti resektivnim ili regenerativnim pristupom.

#### 1.1.2.5.1. Nekirurška terapija / Konzervativna terapija

Osnovni tretman ručnim instrumentima moguće je izvesti teflonskim, karbonskim i plastičnim kiretama. Zbog činjenice da terapija konvencionalnim kiretama može oštetiti površinu implantata i učiniti ju dodatno hrapavom, preporučuje se da materijal kireta bude mekši od titana (77).

Uz tretman ručnim instrumentima preporuča se i tretman ultrazvučnim instrumentima i instrumentima za poliranje zrakom/prahom. Oštećenje površine implantata može se spriječiti korištenjem ultrazvučnih instrumenata s nemetalnim vrhom (78).

Dodatna terapijska opcija su lokalni ili sistemski antibiotici. Primjena antibiotika u kombinaciji s drugim konzervativnim ili kirurškim tretmanima rezultira učinkovitijim smanjenjem kliničkih simptoma periimplantitisa, iako samo davanje antibiotika nije opcija liječenja (79).

Zbog svojih minimalnih lokalnih i sistemskih nuspojava, jedno od u praksi najčešće korištenih antiseptika za liječenje periimplantitisa je klorheksidin (CHX). CHX je antiseptik širokog spektra koji ima i bakteriostatsko i baktericidno djelovanje ovisno o koncentraciji (80).

Dokazano je da zbog različitih anatomskih odnosa i složenosti površine implantata nijedna od poznatih metoda ne može u potpunosti ukloniti ili deaktivirati periimplantatne patogene (76). Zbog toga se u suvremenoj stomatologiji opsežno istražuju dodatne terapijske opcije, a mnoge *in vitro* studije, studije na životinjama i kliničke studije već su pokazale da neinvazivna fotodinamska terapija (PDT) može poslužiti kao uspješan i siguran dodatni terapijski protokol za liječenje periimplantitisa (65,81,82).

#### 1.1.2.5.2. Kirurška resektivna terapija

Kirurška terapija kombinira spomenutu nekiruršku terapiju s konceptima resektivnih i/ili regenerativnih zahvata. Indikacije za odgovarajuću strategiju liječenja ispitivane u studijama na pacijentima dovele su do razvoja koncepta "kumulativne interceptivne potporne terapije (eng. *cumulative interceptive supportive therapy*) (83). Osnova takvog koncepta su redovite

kontrole pacijenta s periimplantitisom i opetovana procjena plaka, krvarenja, gnojenja, džepova i radioloških dokaza gubitka koštane mase.

Kiruršku intervenciju se može izvesti ako dubina sondiranja prelazi 5 mm, kao i kod pojave lokalnih znakova upale.

Analogno parodontitisu, resektivna kirurgija se pokazala učinkovitom u smanjenju krvarenja pri sondiranju, dubini sondiranja i kliničkih znakova upale. Osnovni principi uključuju uklanjanje periimplantatnog koštanog defekta primjenom ostektomije i osteoplastike te bakterijsku dekontaminaciju (84). Dodatno se može primijeniti zaglađivanje (uklanjanje navoja) i poliranje površine dijela implantata izvan kosti (implantoplastika).

Osteoplastika u kombinaciji s implantoplastikom predstavljaju učinkovitu terapiju za smanjenje ili čak zaustavljanje progresije periimplantitisa. Ipak, zbog povećanih postoperativnih recesija, ovaj zahvat ostaje u estetskoj zoni (85).

#### 1.1.2.5.3. Kirurška regenerativna terapija

Resektivna kirurška terapija se ne provodi s ciljem re-osteointegracije, za razliku od regenerativne terapije kod koje se teži potpunoj regeneraciji i re-osteointegraciji.

Općenito, postupci vođene regeneracije kosti (engl. *guided bone regeneration*) i punjenje koštanog defekta pokazali su se učinkovitijima od samog debridmana u pogledu regeneracije kosti i re-osteointegracije (86).

#### 1.2. Fotodinamska terapija

Fotodinamska terapija, je relativno nova, neinvazivna metoda liječenja temeljena na fotokemijskoj reakciji koja se sastoji od fotosenzibilizatora, svjetla i kisika. Nakon vezanja fotoosjetljivih molekula na ciljne stanice, površina implantata se obasjava svjetlom određene valne duljine u prisutnosti kisika. Pobuđeni fotosenzibilizatori mogu biti podvrgnuti reakcijama tipa I (prijenos elektrona) i/ili tipa II (prijenos energije) za proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), što uzrokuje poremećaj bakterijske stanične stijenke i/ili normalnog metabolizma te dovodi do oštećenja ili smrti bakterijske stanice (87). Opisani mehanizmi ne uzrokuju oštećenje stanice domaćina budući da ljudska stanica ima mehanizme za preživljavanje oksidativnog stresa, poput onih koji uključuju enzime katalazu i superoksid dismutazu (88).



Razvoj otpornosti mikroba na PDT nije vjerojatan jer se baktericidni učinak postiže djelovanjem kisikovih radikala na stanične komponente mikroorganizama (89). Važno je i napomenuti da nijedna od komponenti ključnih za postizanje učinka PDT-a nije zasebno citotoksična i štetna. Zbog navedenih prednosti PDT je predmet intenzivnog istraživanja u dentalnoj medicini kao i u medicini općenito, kako bi se pronašle najučinkovitije valne duljine i fotosenzibilizatori (90).

Kao izvor svjetlosti prilikom aktivacije fotosenzibilnog sredstva u dentalnoj medicini najčešće su korišteni laseri.

### 1.2.1. Laseri

Pojam LASER je akronim od engleskih riječi "*Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation*", što u prijevodu znači pojačavanje svjetlosti stimuliranom emisijom zračenja.

Početak 20-og stoljeća Albert Einstein predstavlja glavni koncept rada lasera na temelju stimulirane emisije, gdje foton (kvant elektromagnetskog zračenja) koji s pobuđenom molekulom ili atomom pri sudaru stvara emisiju, tj. novi foton koji je istog smjera širenja, frekvencije, faze i polarizacije. Prvu primjenu laserske tehnologije u stomatologiji opisao je Goldman 1964. godine, četiri godine nakon što je Maiman 1960. godine predstavio prvi laserski uređaj (91). Na tvrdim tkivima laser se koristi za prevenciju i dijagnostiku karijesa, izbjeljivanje, uklanjanje karijesa i pripremu kaviteta, stvrđnjavanje ispuna i smanjivanje dentinske preosjetljivosti, dok se na mekim tkivima primjenjuje u svrhu poticanje cijeljenja rana, uklanjanje hipertrofičnog tkiva, otkrivanja impaktiranih ili djelomično impaktiranih zuba, te za fotodinamsku terapiju (92).

#### 1.2.1.1. Mehanizam djelovanja lasera

Lasersko svjetlo je monokromatsko svjetlo zbog toga što se sastoji od svjetlosti jedne valne duljine. Laser se od ostalih izvora svjetlosti razlikuje po tome što emitira koherentnu svjetlost. Prostorna koherencija je svojstvo „uređenog“ širenja fotona iste valne duljine, smjera i faze, što omogućuje laseru da bude fokusiran na usku točku. To svojstvo je primijenjeno kod laserskog rezanja. Prostorna koherencija ujedno omogućuje da laserska zraka ostane uska čak i na velikim udaljenostima (kolimacija), što se primjenjuje kod laserskih pokazivača ili laserskog mjerenja.

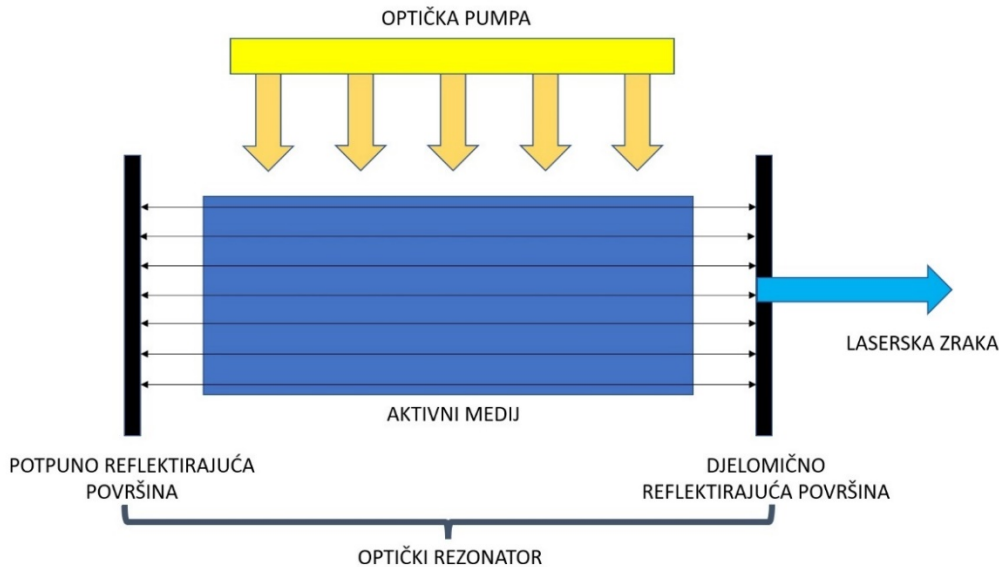
Laser se sastoji se od tri glavna dijela: izvora energije, laserskog medija (optičkog pojačala) i dva ili više zrcala koja tvore optički rezonator (93).

#### 1.2.1.2. Fizika lasera

Kako bi se pojasnio mehanizam djelovanja lasera, potrebno je pojasniti osnovne pojmove koji se događaju s atomom: spontanu apsorpciju, spontanu emisiju i stimuliranu emisiju.

Spontana apsorpcija se odnosi na prelazak elektrona u sklopu atoma u pobuđeno stanje nakon što primi određenu količinu energije (foton). Nakon kratkog perioda elektrona u pobuđenom stanju elektron se vraća u nepobuđeno stanje otpuštajući energiju (foton) u procesu koji se naziva spontana emisija. Ukoliko se elektronu u već pobuđenom stanju dovede dodatna količina energije, elektron pri povratku u nepobuđeno stanje emitira energiju (foton), ali ta energija je sada iste valne duljine i smjera koju je prethodno primio (koherentnu energiju). Kako je period boravka elektrona u pobuđenom stanju iznimno kratak, stimulirana emisija se može provocirati u atomima materijala koji mogu postojati u djelomično pobuđenom, metastabilnom stanju (93).

Primijenjeno u praksi, energija se laserskom sustavu dovodi pomoću optičke pumpe, poput bljeskalice, električne struje ili zavojnice. Ta se energija pumpa u aktivni medij, materijal čiji su elektroni u metastabilnom stanju koji se nalazi unutar optičkog rezonatora, stvarajući spontanu emisiju fotona. Pojačavanje gustoće fotona dobivenih stimuliranom emisijom odvija se odbijanjem fotona od zrcala naprijed-nazad kroz medij pomoću reflektirajućih površina optičkog rezonatora. Optički rezonator se sastoji od paralelno postavljenih, s jedne strane nepropusnih, a s druge strane djelomično propusnih, zrcala (uski prozor). Opisani sustav stvara visoko fokusirani laserski snop koji izlazi kroz djelomično propusnu stranu zrcala u obliku laserske zrake (Slika 2.)(93).



Slika 2. Shematski prikaz konstrukcije laserskog sustava.

Kod lasera korištenih u stomatologiji lasersko se svjetlo isporučuje od lasera do ciljnog tkiva putem fiberoptičkog kabela ili zglobne ruke. Optička vlakna praktičniji su način isporuke svjetlosti posebno u suženom polju rada kao što su dijelovi usne šupljine. Tipični materijali optičkih vlakana su stakla na bazi silikata i različite plastike, poput polimetilmetakrilata i perfluoriranih polimera (94).

Leće za fokusiranje i sustav za hlađenje također su važan dio laserskog sustava. Valna duljina i druga svojstva lasera određena su prvenstveno sastavom aktivnog medija, koji može biti plin, kristal ili poluvodič u čvrstom stanju (93).

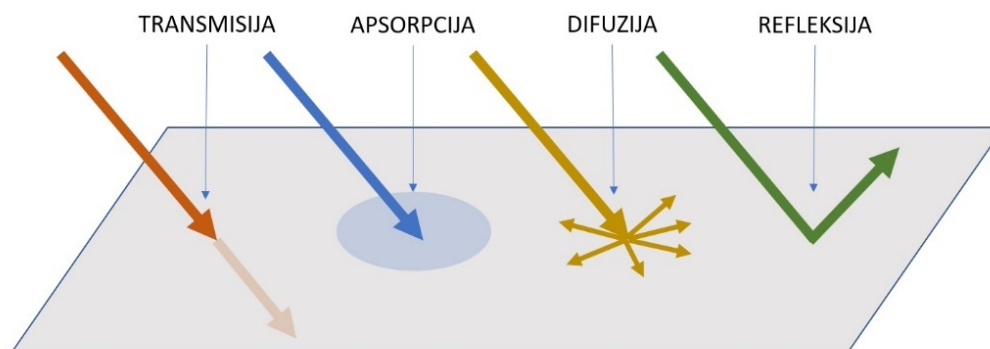
### 1.2.1.3. Interakcija s tkivom

Svjetlosna energija koju proizvodi laser može imati četiri različite interakcije s ciljnim tkivom: odbijanje od površine tkiva (refleksija), prolazak kroz tkivo bez izazivanja promjena u tkivu (transmisija), raspršenje (difuzija) i upijanje u ciljnom tkivu (apsorpcija) (95) (Slika 3.).

Zbog svojstva refleksije laserske zrake i njenog rasapa u prostori u kojoj se koristi, postoji opasnost od oštećenja oka te je u radu s laserima uvijek potrebno nositi zaštitne naočale sa zaštitnim faktorom za korištenu valnu duljinu, dok na vratima prostorije mora biti jasan znak da se koristi lasersko svjetlo. Raspršena energija (difuzija) lasera je odgovorna za terapijske

učinke određenih valnih duljina (npr. fotobiomodulacija tkiva s crvenim i infracrvenim svjetlom). Apsorpcija laserske zrake podiže temperaturu i proizvodi fotokemijske učinke ovisno o sadržaju vode u tkivima. Na temperaturama iznad približno 60°C, ali i ispod 100°C, proteini počinju denaturirati, bez isparavanja vode iz tkiva. Kada se postigne temperatura od 100°C, dolazi do isparavanja vode unutar tkiva u procesu koji se naziva ablacija. Nasuprot tome, na temperaturama iznad 200°C tkivo se dehidrira, a zatim izgori, što rezultira u tkivu obično neželjenim učinkom koji se naziva karbonizacija (96).

Za apsorpciju su potrebne tvari u tkivu koje će apsorbirati svjetlost, nazvani i kromofori, a imaju afinitet za svjetlost određene valne duljine. Primarni kromofori u intraoralnom mekom tkivu su melanin, hemoglobin i voda, a u tvrdim tkivima zuba voda i hidroksiapatit. Različite valne duljine lasera imaju različite koeficijente apsorpcije u odnosu na sastav tkiva, temeljem čega se i odabiru laseri ovisno o namjeni (97,98).



Slika 3. Prikaz moguće interakcije laserske zrake s ciljanim tkivom.

#### 1.2.1.4. Tipovi lasera

Laseri koji se korišteni u stomatološkoj praksi mogu se različito klasificirati: prema aktivnom mediju lasera po kojem najčešće dobivaju ime; prema tkivu na koje se primjenjuju; kao laseri za tvrda i meka tkiva; prema rasponu valnih duljina (92).

Aktivni medij određuje valnu duljinu laserske zrake, samim time i svojstva lasera. Aktivni medij lasera mogu biti plinovi (ugljik dioksid – CO<sub>2</sub> laser), kristali ili poluvodičke diode (diodni laser) (99).

#### 1.2.1.5. Laser na bazi ugljičnog dioksida (CO<sub>2</sub>)

Valna duljina CO<sub>2</sub> lasera ima vrlo visok afinitet za vodu, što rezultira brzim uklanjanjem mekog tkiva i hemostazom s vrlo malom dubinom prodiranja. Iako posjeduje najveću apsorpciju od svih lasera, nedostaci CO<sub>2</sub> lasera su njegova veličina i visoka cijena te neželjena destrukcija tvrdog tkiva (100,101).

#### 1.2.1.6. Neodimijski laseri

Valnu duljinu neodimij itrij-aluminij-garnet (Nd:YAG) lasera jako apsorbira pigmentirano tkivo, što ga čini vrlo učinkovitim kirurškim laserom za rezanje i koagulaciju mekih zubnih tkiva, s dobrom hemostazom (102).

#### 1.2.1.7. Erbijevi laser

Skupina erbijevih lasera ima dvije različite valne duljine, od kojih je poznatiji erbij itrij-aluminij-garnet (Er: YAG) laser. Erbijeve valne duljine imaju visok afinitet za hidroksiapatit i najveću apsorpciju u vodi u svim valnim duljinama dentalnih lasera. Stoga je takav laser izbor za liječenje tvrdih zubnih tkiva (103,104).

#### 1.2.1.8. Diodni laser

Aktivni medij diodnog lasera je poluvodič čvrstog stanja izrađen od aluminijske, galijne, arsenidne i indijske, koji isporučuje valne duljine u rasponu od približno 440 nm do 980 nm. Sve valne duljine diodnog lasera primarno apsorbiraju pigmenti tkiva melanin i hemoglobin. Nasuprot tome, slabo ih apsorbiraju hidroksiapatit i voda prisutni u caklini. Zbog ovih svojstava diodni laseri se često koriste u kirurgiji oralnih mekih tkiva, ali i za dezinfekciju kod parodontoloških i endodontskih zahvata (105,106).

##### 1.2.1.8.1. Sigurnost primjene lasera u dentalnoj medicini

Iako je većina dentalnih lasera relativno jednostavna za korištenje, potrebno je poduzeti određene zaštitne mjere kako bi se osigurao njihov siguran i učinkovit rad. Obavezno je, dok je

laser u uporabi, korištenje zaštitnih naočala za sve koji su u blizini lasera. To uključuje doktora dentalne medicine, asistenta i pacijenta, kao i sve eventualne promatrače. Zaštitne naočale koje se nose moraju biti specifične za valne duljine koje laser emitira. Osim toga, važno je ograničiti pristup kirurškom polju, minimizirati reflektirajuće površine i obavezna je postava znakova upozorenja o korištenju lasera na vratima prostorije. Laser koji se koristi mora biti redovito servisiran i adekvatno kalibriran, uz sve zaštitne mjere na uređaju koji proizvođač propisuje (107).

Zbog prevencije izlaganja zaraznim patogenima u aerosolu koji nastaje tijekom korištenja lasera, potrebno je koristiti aspiratore za uklanjanje isparavanja te se treba pridržavati uobičajenih protokola zaštite od infekcije.

#### 1.2.1.9. Svojstva laserske zrake

Svojstva laserske zrake određuje više parametara: valna duljina, energija lasera, snaga lasera, vrijeme ekspozicije i vrsta zračenja.

##### 1.2.1.9.1. Valna duljina

Valna duljina je iznimno bitan parametar koji određuje svojstva i namjenu samog lasera. Valna duljina predstavlja udaljenost između najbližih točaka vala koje imaju istu fazu titranja i obrnuto je proporcionalna frekvenciji (Hz), gustoći vala unutar jedne sekunde. Valna duljina svjetlosti izravno je proporcionalna prodoru u tkivo, pri čemu je svjetlost koja se lako prenosi kroz tkiva optimalna za upotrebu u PDT-u (108).

Prilikom fotodinamske terapije valna duljina lasera se bira ovisno o korištenom fotosenzitivnom sredstvu. Kako su u dentalnoj medicini najčešće istraživani fotosenzibilizatori metilensko i toluidinsko modrilo, valna duljina za njihovu aktivaciju je u crvenom dijelu vidljivog spektra u rasponu između 600 – 660 nm. Prilikom korištenja indocijanin zelenog koristi se valna duljina od 970 nm. Kao nova valna duljina za fotodinamsku terapiju u dentalnoj medicini koristi se 445nm u kombinaciji sa žuto obojenim fotosenzibilizatorima kurkuminom i riboflavinom (109).

#### 1.2.1.9.2. Antimikrobni potencijal plavog laserskog svjetla valne duljine 445nm

U literaturi postoji malo studija koje se bave antimikrobnim učinkom plavog laserskog svjetla (110–112). Plavo svjetlo valne duljine 445nm prvenstveno se počelo koristiti i uspješno se i dalje primjenjuje prilikom kirurških zahvata na mekom tkivu. Tek se u recentnije vrijeme počeo istraživati njegov antimikrobni učinak u kombinaciji s adekvatnim fotosenzibilnim molekulama poput kurkumina i riboflavina. Dodatni se pozitivan učinak korištenja plavog svjetla vidljivog spektra uočava prilikom fotodinamske terapije kada su ciljani mikroorganizmi crno pigmentirane bakterije koje su upravo jedan od glavnih uzročnika paradontitisa i periimplantitisa, poput *Porphyromonas gingivalis* i *Prevotella intermedia* čije stanice u sebi sadrže endogene pigmente  $\mu$ -okso bis i hematin, a koje proizvode same bakterije i djeluju kao fotosenzibilizatori (113).

Slično prethodno spomenutim crno pigmentiranim bakterijama, eliminacija *C. albicans* korištenjem plavog svjetla pokazala se vrlo učinkovitom, vjerojatno zbog prisutnosti unutarstaničnih porfirina i flavina (114,115).

#### 1.2.1.9.3. Energija i snaga lasera

Snaga lasera (W) je sposobnost obavljanja rada u jedinici vremena te rezultira isporučenoj energiji (J) lasera. Snaga laserske zrake se određuje ovisno o indikacijama i vrsti lasera. Kod lasera je zbog djelovanja na određeno usko područje vrlo bitna i mjera gustoća snage ili intenzitet koji se može definirati kao koncentracija snage lasera na određenoj površini ( $W/m^2$ ). U stomatologiji se zbog malog polja djelovanja gustoća snage češće izražava u  $W/cm^2$ . Jednako tako se može na temelju poznatih i zadanih parametara izračunati i isporučena gustoća energije laserske zrake na određenoj površini ( $J/m^2$ ).

Kako bi se izbjegli neželjeni učinci, a opet koristila željena snaga lasera, laserski uređaji primjenjivani u kliničkoj praksi mogu se primjenjivati u kontinuiranom ili u pulsnom modalitetu rada. Kontinuirani modalitet rada označava kontinuirano zračenje lasera pri kojem laserska zraka od početka pa sve do prestanka rada ima jednak intenzitet i jednaka svojstva. Pulsni modalitet rada karakterizira nekontinuirano zračenje, pri kojem se u pravilnim određenim razmacima emitira laserska zraka željenih svojstava. Period između emitiranja laserske zrake između dva susjedna impulsa naziva se frekvencijom i moguće ga je prilagoditi na laserskom uređaju (109).

Pulsni modalitet rada omogućava djelovanje laserske energije velike gustoće na maloj površini, bez termalnog oštećenja okolnog tkiva. Takav način rada se često primjenjuje u dezinfekcijskim protokolima.

#### 1.2.1.9.4. Vrijeme ekspozicije

Vrijeme ekspozicije je duljina obasjavanja ciljnog tkiva laserskom zrakom i mjeri se u sekundama (s) te je vrlo bitna u postizanju željenog učinka i sprečavanju neželjenog zagrijavanja tretirane površine. Kako je željeni učinak PDT dezinfekcija, a ne zagrijavanje površine ili promjenu strukture same površine, vrlo je važno pomicanje lasera prilikom ekspozicije tretirane površine.

#### 1.2.1.9.5. Djelovanje diodnog lasera na mikroorganizme

Učinak diodnog lasera na mikroorganizme može se opisati kao fototermalni učinak koji se postiže zagrijavanjem prilikom interakcije svjetla određene valne duljine i pigmentiranih molekula unutar tkiva i fotoaktivni učinak koji nije povezan sa zagrijavanjem, već zahtijeva foto-aktivnu tvar koja se apsorbira unutar stanice (116).

#### 1.2.1.10. Fototermalni učinak diodnog lasera

Fototermalni učinak ovisi o stvorenoj toplinskoj energiji. Toplinu stvara lasersko svjetlo u interakciji s pigmentom unutar bakterijske stanice, okoline ili podloge. Na bakterijsku stanicu se toplina prenosi direktno ili indirektno, preko okoliša koji okružuje bakteriju. Pigmentirane bakterijske stanice su podložnije fototermalnom učinku, dok se fototermalni učinak na nepigmentirane bakterije ostvaruje kratkotrajnim lokaliziranim zagrijavanjem bakterijskog mikrookoliša do letalnih temperatura (117,118).

#### 1.2.1.11. Fotodinamski učinak diodnog lasera

Za postizanje fotodinamskog učinka potrebno je odgovarajuće fotosenzitivno sredstvo. Fotosenzitivno sredstvo se nanosi na ciljano područje djelovanja. Nakon određenog vremena sredstvo se apsorbira unutar bakterijske stanice. Nakon obasjavanja polja svjetlom određene valne duljine komplementarne s pigmentom fotosenzitivnog sredstva dolazi do pobuđivanja molekula i nastanak slobodnih radikala (tzv. reakcija tip I) i/ili interakcija fotosenzitivnog



sredstva s molekulama kisika unutar stanice (tzv. reakcija tip II) uslijed čega nastaju reaktivne kisikove vrste, tzv. „ROS“ – *reactive oxygen species* (119,120).

Većinu sastava ROS čine slobodni radikali, poput aniona ili superoksida, hidroksilni radikal, peroksilni radikal i alkoksilni radikal i hidroksilni radikal. Reaktivne kisikove jedinice koje nisu slobodni radikali su vodikov peroksid, hipokloritna kiselina, ozon i jednostavni singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ) (121),

Opisani radikali reagiraju s molekulama stijenke bakterija i/ili unutarstaničnim mehanizmima i izazivaju smrt bakterijske stanice.

Važno je napomenuti da svaki element ključan za postizanje fotodinamskog učinka je zasebno netoksičan, tek interakcijom fotosenzitivnog sredstva sa svjetlom određene valne duljine, nastala kemijska reakcija rezultira stvaranjem toksičnih vrsta koje izazivaju željeni učinak na ciljanoj stanici (122).

#### 1.2.2. Fotosenzitivna sredstva

Fotosenzitivna sredstva su posebni spojevi koji se koriste u fotodinamskoj terapiji. Ovisno o vrsti agensa koji se koristi, fotosenzitivno sredstvo se može ili intravenozno ubrizgati u krvotok (gdje će putovati do ciljanog područja), uzimati oralno ili se primjenjuje lokalno (122). Fotosenzitivna sredstva su obično makrociklički spojevi s heterocikličkom prstenastom strukturom koja je slična klorofilu ili hemu (122,123).

Najčešće se dijele u tri generacije na temelju kliničkih karakteristika (124).

Prva generacija fotosenzitivnih sredstava dostupna je od 1970-ih i ranih 1980-ih i većina ovih spojeva su derivati porfirina, klorina i bakterioklorina, dok su klinički relevantni spojevi najčešće strukturni derivati hematoporfirina (122,123). Hematoporfirin je komercijalno poznat kao photofrin, koji je do danas najopsežnije proučavan i klinički korišten fotosenzibilizator (125). U ovu skupinu od u stomatologiji često korištenih fotosenzitivnih sredstava spada metilensko modrilo (126) (Slika 4).

Druga generacija fotosenzitivnih sredstava razvijena je kasnih 1980-ih kako bi se poboljšala učinkovitost, uz postizanje boljih farmakokinetičkih svojstava i niže toksičnosti. Fotosenzitivna sredstva ove generacije karakterizira apsorpcija blizu infracrvenog zračenja i viša produkcija ROS-a u usporedbi sa spojevima prve generacije.

Fotosenzitivna sredstva treće generacije su najnovije razvijeni spojevi koji u sebi sadrže molekulu nosača poput monoklonskih antitijela, proteinske nosače na bazi antitijela, monosaharide, polimere, polimerne nano čestice ili liposome (127).

Zahtjevi za optimalni fotosenzibilizator su sljedeći: komercijalna dostupnost, isplativost, jednostavnost primjene, sposobnost apsorpcije dugih valnih duljina, niska toksičnost dok nije obasjan svjetlošću određene valne duljine, ali jaka fotocitotoksičnost kada je aktiviran svjetlom, dobra selektivnost prema ciljnim stanicama i brza eliminacija (128).

Fotosenzitivna sredstva prikladna za korištenje u PDT terapiji uparaju se s valnim duljinama po principu komplementarnosti (određena boja bolje upija svjetlo točno određene valne duljine), primjer su derivati hematoporfirina (620 – 650 nm), fenotiazini (620 – 700 nm), cijanini (600 – 805 nm) i klorini (129).

#### 1.2.2.1.1. Uloga kisika i kisikovih spojeva, molekularni mehanizmi djelovanja

Kisik ( $O_2$ ) je zadnja komponenta potrebna za odvijanje fotodinamske reakcije. Više je studija dokazalo da je učinkovitost PDT procesa ovisna o kisiku (87). Kisik je potreban za stvaranje  $^1O_2$  i ROS-a, za koje se vjeruje da su odgovorni za većinu fotodinamičkih učinaka u stanici (130).

U svom osnovnom stanju fotosenzibilizator ima dva elektrona u suprotnim spinovima u molekularnim orbitalama niske energije. Prilikom apsorpcije svjetlosti jedan od ovih elektrona prelazi u molekularnu orbitalu više energije, bez promjene svog spina; to se naziva singletno pobuđeno stanje (131). Prilikom povratka elektrona u osnovno stanje oslobađa se energija koja može ili zračiti u obliku svjetlosti (fluorescencija) ili rezultirati neradijacijskim raspadanjem kroz oslobađanje toplinske energije (132,133).

Ako elektroni u molekuli fotosenzitivnog sredstva iz singletnog stanja postanu dodatno pobuđeni na višu energetska razinu (putem apsorpcije zračenja), mogu formirati pobuđeni  $^1O_2$  (gdje par elektrona na istoj energetska razini ima suprotne spinove) ili  $^3O_2$  (pobuđeni elektron je paralelan, tj. imaju isti spin kao i elektron u osnovnom stanju) (131–133). Tijekom PDTA, pobuđeno stanje  $^3O_2$  će ili izravno reagirati sa staničnim molekulama prijenosom elektrona i proizvesti produkte obogaćene kisikom (reakcija tipa I) ili će prenijeti energiju na molekularni kisik, što dovodi do stvaranja visoko reaktivnih vrsta  $^1O_2$  (tip II reakcija) unutar biološkog

okoliša (134,135). Kisik  $^1\text{O}_2$  je najštetnija vrsta jer reagira s biološkim molekulama, npr. nezasićenim lipidima i aminokiselinama proteina.

#### 1.2.2.1.2. Riboflavin kao fotosenzitivno sredstvo

Riboflavin (vitamin B2) je vitamin prirodno prisutan u hrani, karakteriziran žutom bojom koja ne uzrokuje ozbiljne promjene boje zuba ili okolnog tkiva, za razliku od toluidinskog ili metilenskog modrila, te se stoga može koristiti u estetskoj zoni (136) (Slika 4.). Porast razine reaktivnih vodikovih molekula u riboflavinu prilikom izloženosti svjetlosti plavog spektra maksimalne apsorpcije valne duljine od ~ 450 nm 200% je veći u usporedbi s drugim tvarima žute boje koje se aktiviraju istim spektrom plave svjetlosti poput kurkumina (25).



Slika 4. Otopina fotosenzibilizatora, metilenskog modrila (tamnoplave boje), i riboflavina (žute boje) u špricama namijenjenim primjeni istraživanju.

#### 1.3. Diodni laser valne duljine 445 nm u kliničkoj primjeni

Plava laserska zraka valne duljine 445 nm za uporabu u dentalnoj medicini je prvi put predstavljena u diodnom laseru SiroLaser Blue kompanije Dentsply Sirona (Dentsply Sirona, Bensheim, Njemačka) (Slika 5.). SiroLaser Blue posjeduje tri odvojene diode koje emitiraju

svjetlo valnih duljina 445, 660 i 970 nm. Mogućnost uređaja da emitira tri valne duljine omogućuje vrlo širok spektar primjene u kliničkom radu.

SiroLaser Blue prema sigurnosnoj klasifikaciji lasera spada u uređaje klase IV kod kojih postoji velika opasnost za oštećenje oka i kože.

Plava laserska svjetlost ima mnogo veću apsorpciju u mekom tkivu (tj. hemoglobin i melanin) od infracrvenih valnih duljina lasera (810nm, 940nm, 970nm). To dovodi do poboljšanja učinkovitosti rezanja mekog tkiva i omogućuje rezanje bez kontakta s površinom. Zbog visokog stupnja apsorpcije u hemoglobinu hemostatski učinak je izvanredan (137).

Izlazna snaga uređaja može biti postavljena u rasponu od 0.2 – 3.0 W, u izbor kontinuiranog ili pulsnog modaliteta emitiranja energije (do 10000 Hz). Nastavci za isporuku svjetlosti različitih su oblika i promjera, ovisno o ciljanom mediju i namjeni. Dostupni su nastavci promjera 200 mikrona (endodontski nastavak), 320 mikrona (univerzalni nastavak) te 4 i 8 mm (biostimulacijski nastavci). Promjer nastavka određuje gustoću isporučena energije. Uz tanje nastavke proizvođač isporučuje i specijalni keramički nož s kojim je moguće prilagoditi duljinu optičkog vlakna.

Prilikom kliničkog rada nastavke je potrebno redovito čistiti gazom natopljenom fiziološkom otopinom kako se ostatci tkiva i bakterija ne bi zalijepili na površinu optičkog vlakna i time spriječili („začepili“) isporuku svjetlosti. U slučaju da se gazom ne mogu ukloniti ostatci, potrebno je vrh vlakna odrezati dobivenim keramičkim nožem.



Slika 5. SiroLaser Blue kompanije Dentsply Sirona prvi je diodni laser s mogućnošću emitiranja plavog svjetla u pulsnom načinu prikladnom za fotodinamsku terapiju površine implantata.

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**

### 2.1. Primarni cilj istraživanja:

Utvrđiti učinak fotodinamske terapije 0,1% riboflavinom kao fotosenzitizirajućim sredstvom aktiviranim diodnim laserom valne duljine 445 nm na biofilm *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans* na površini dentalnih implantata

### 2.2. Sekundarni ciljevi istraživanja:

Usporediti učinak fotodinamske terapije 0,1% riboflavinom kao fotosenzitizirajućim sredstvom aktiviranim diodnim laserom valne duljine 445 nm s učinkom fotodinamske terapije 0,1% metilenskim modrilom kao fotosenzitizirajućim sredstvom aktiviranim diodnim laserom valne duljine 660 nm

Usporediti učinak fotodinamske terapije 0,1% riboflavinom kao fotosenzitizirajućim sredstvom aktiviranim diodnim laserom valne duljine 445 nm s učinkom 0,2% klorheksidin.

### 2.3. Hipoteze istraživanja:

1. Nema statistički značajne razlike u broju jedinica koje tvore koloniju (engl. Colony forming units - CFU), netretirane površine dentalnih implantata i nakon tretiranja fotodinamskom terapijom 0,1% riboflavinom kao fotosenzitizirajućim sredstvom aktiviranim diodnim laserom valne duljine 445 nm.

2. Nema statistički značajne razlike u broju CFU-a nakon tretiranja površine dentalnih implantata fotodinamskom terapijom 0,1% metilenskim modrilom kao fotosenzitizirajućim sredstvom aktiviranog diodnim laserom valne duljine 660 nm u i fotodinamskom terapijom 0,1% riboflavinom kao fotosenzitizirajućim sredstvom aktiviranim diodnim laserom valne duljine 445 nm.

3. Nema statistički značajne razlike u broju CFU-a nakon tretiranja površine dentalnih implantata 0,2 % otopinom klorheksidina i nakon tretiranja fotodinamskom terapijom 0,1% riboflavinom kao fotosenzitizirajućim sredstvom aktiviranim diodnim laserom valne duljine 445 nm.

### **3. MATERIJALI I POSTUPCI/ISPITANICI I POSTUPCI**



### 3.1. Uzorci

Istraživanje je provedeno na 80 titanijskih dentalnih implantata (GC Aadv Standard Implants; GCTech.Europe GmbH, Breckerfeld, Njemačka) promjera 4,0 mm i duljine 10 mm (Slika 6.). Titanska legura u istraživanju korištenih implantata je stupnja 5. Površina implantata po navodima proizvođača tretirana je homogenim pjeskarenjem čestica aluminijevog oksida visoke čistoće i jetkanjem kiselinom kako bi se poboljšala topografija površine, hidrofilnost i stimulirala oseointegracija. (Anchor® površinska tehnologija, GCTech.Europe GmbH, Breckerfeld, Njemačka). Korišteni su implantati koji su dostupni na tržištu i dolaze u dvostruko sterilnom pakiranju spremni za ugradnju.

Veličina uzorka po skupini izračunata je pomoću programa G\* Power na temelju razlike u brojčanim varijablama između dva mjerenja, s razinom značajnosti postavljenom na 0,05 i snagom na 0,8 (veličina velikog učinka od 0,8) te je dobivena minimalna potrebna veličina uzorka od 20 uzoraka po skupini.



Slika 6. Dentalni implantat u tržišnom pakiranju s navedenim dimenzijama i prikazom oblika implantata.

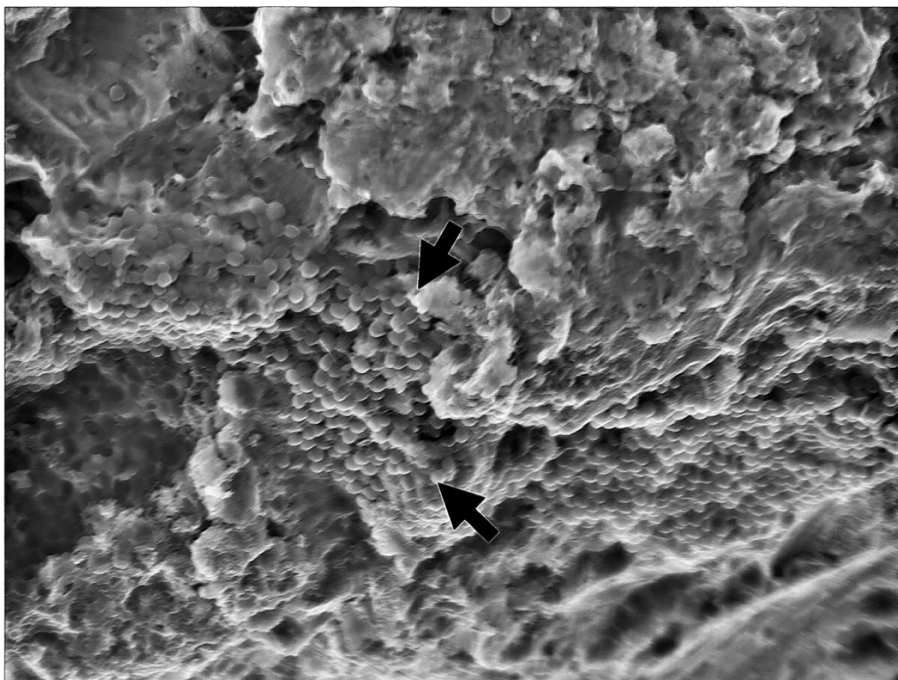
### 3.2. Uzgoj mikroorganizama i kontaminacija uzoraka

Svi mikrobiološki postupci obavljani su u laboratoriju Zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Za kontaminaciju dentalnih implantata korišteni su sojevi *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans* izolirani iz kliničkih uzoraka u KBC-u Zagreb. Brisevi usne šupljine uzeti od pacijenta nacijepljeni su na pločicu krvnog agara (Columbia agar ploča s 5% ovčje krvi). Kolonije s jasnom morfologijom identificirane su kao *S. aureus* korištenjem laserske desorpcije uz pomoć matrice/ ionization time-of-flight (MALDI TOF) tehnologijom (Bruker Daltonics, Billerica, USA), a testiranje osjetljivosti je provedeno prema EUCAST standardima. Za mikološke uzorke *C. Albicans* brisevi su inokulirani na Saburaudovu ploču i glukozni bujon, a nakon inkubacije na temperaturi od 28°C tijekom 48 sati kolonije su identificirane pomoću MALDI TOF kao *Candida albicans*. Bakterije i gljivice su uzgajane odvojeno u Columbia Agar 72 sata. Zatim je pripravljena odvojena suspenzija moždano-srčanog (Brain heart infusion broth) bujona od mikroorganizama, a oni su zatim pomiješani da se dobije zajednička suspenzija u jednakim omjerima. Optički denzitometar (Densimat, Biomerieux, Marcy l'Etoile, Francuska) korišten je za postavljanje gustoće od 600 nm, što je ekvivalentno  $1 \times 10^8$  jedinica koje stvaraju kolonije po mililitru (CFU/mL). Koncentracija suspenzije je podešena na 0,5 prema McFarland standardu.

Svi dentalni implantati su izvađeni iz sterilnog pakiranja i potom uronjeni na 14 dana, u aerobnim uvjetima, u 300 µL miješane bakterijsko-gljivične suspenzije (koja sadrži *S. aureus* i *C. albicans* u gustoći od 0,5 McFarland jedinica). Suspenzija mikroorganizama je pripravljena i dodavana svakih 48-72 h.

Pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM) (JSM-7800 F Schottky Field Emission Scanning Electron Microscope, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) potvrđeno je stvaranje biofilma mikroorganizama na površini implantata (Slika 7.).



Slika 7. Stvaranje biofilma potvrđeno korištenjem SEM-a (3000 $\times$ )—strelice pokazuju nakupine kugličastog oblika što potvrđuje stvaranje biofilma mikroorganizma.

### 3.3. Dezinfekcijski protokoli

Pripremljeni uzorci kontaminirani dentalnih implantata su uklonjeni iz bakterijsko-gljivične suspenzije pomoću sterilnih pinceta, nježno osušeni sterilnom gazom kako bi se uklonio višak otopine bakterija i gljivica i postavljeni na sterilne silikonske držače (Zetaplus, Zhermack, S.p.A., Badia Polesine, Italija) kako bi se spriječilo okretanje i pomicanje tijekom dekontaminacije i uzimanja uzorka (Slika 8.).



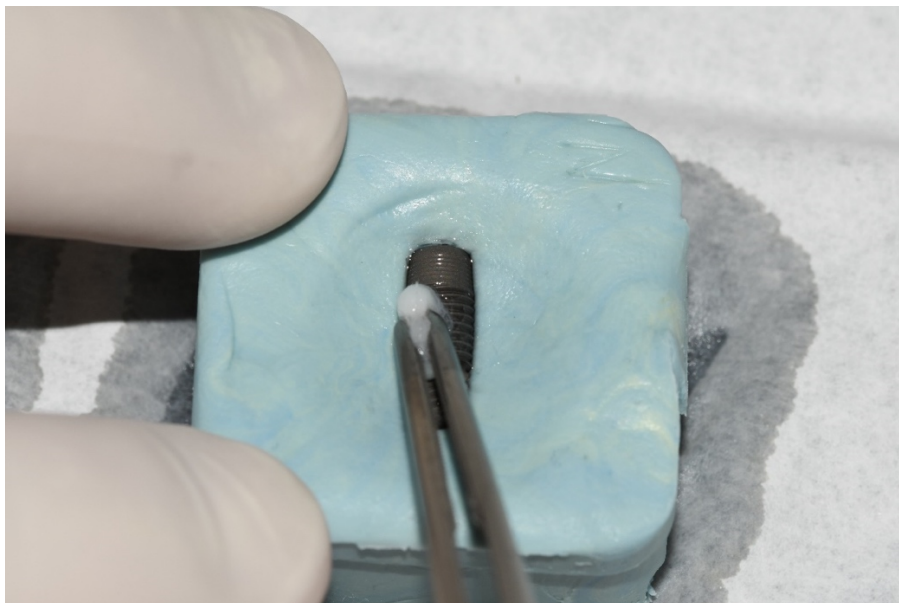
Slika 8. Implantat postavljen u sterilan silikonski držač kako bi se spriječilo okretanje i pomicanje tijekom dekontaminacije i uzimanja uzorka.

Implantati su nasumičnim odabirom bili podijeljeni u četiri skupine ( $n = 20$ ) na temelju planirane površinske obrade nakon kontaminacije i stvaranja biofilma. Uzorci su tretirani po grupama kako slijedi:

Grupa 1. Negativna kontrolna skupina (NC) nije bila podvrgnuta površinskoj obradi. Nakon uklanjanja dentalnih implantata iz bakterijsko-gljivične suspenzije pomoću sterilnih pinceta, implantati su nježno osušeni sterilnom gazom kako bi se uklonio višak otopine bakterija i gljivica i postavljeni na sterilne silikonske držače kako bi se spriječilo okretanje i pomicanje tijekom uzorkovanja.

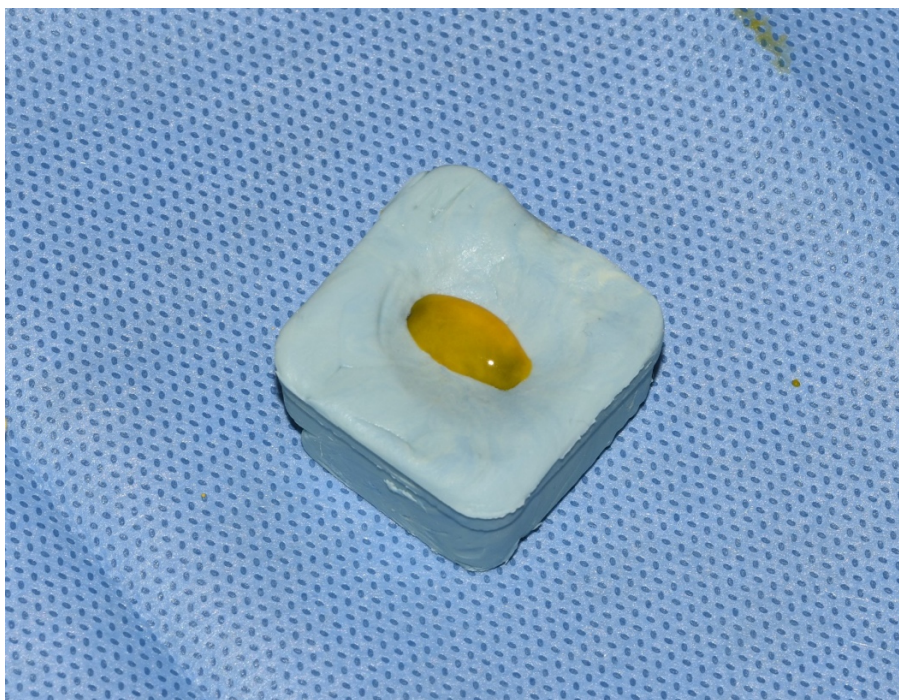
Grupa 2. Pozitivna kontrolna skupina (PC) je nakon uklanjanja dentalnih implantata iz bakterijsko-gljivične suspenzije pomoću sterilnih pinceta, nježnog sušenja sterilnom gazom kako bi se uklonio višak otopine bakterija i gljivica, postavljana na sterilne silikonske držače. Kako bi se spriječilo okretanje i pomicanje tijekom dezinfekcije i uzorkovanja, tretirana je sterilnom vatom namočenom u 0,2% otopinu na bazi klorheksidina (Curasept ADS 220,

Curaden AG, Kriens, Švicarska) u trajanju od 60 s pokretima četkanja u smjeru navoja implantata (Slika 9.).

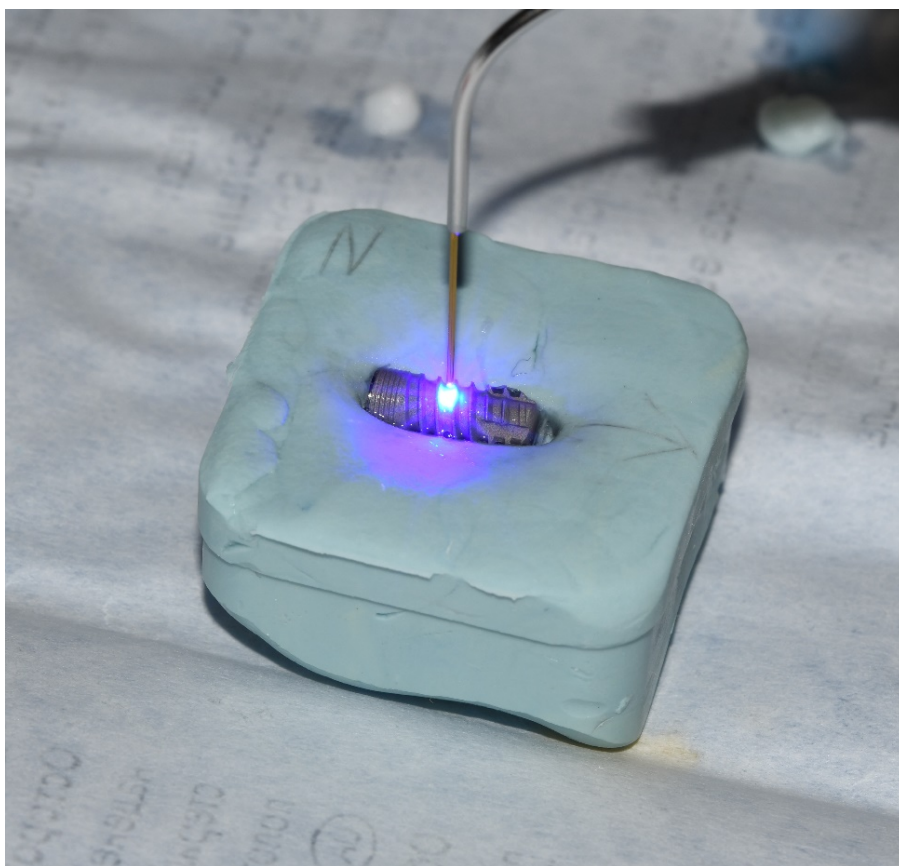


Slika 9. Površina implantata pozitivne kontrolne skupine tretirana je sterilnom vatom namočenom u 0,2% otopinu na bazi klorheksidina pokretima četkanja u smjeru navoja implantata.

Grupa 3. Površina kontaminiranih implantata prve fotodinamske terapijske skupine (PDT1) je nakon istog postupka uklanjanja dentalnih implantata iz bakterijsko-gljivične suspenzije pomoću sterilnih pinceta, nježnog sušenja sterilnom gazom kako bi se uklonio višak otopine bakterija i gljivica i postavljanja na sterilne silikonske držače kako bi se spriječilo okretanje i pomicanje tijekom dezinfekcije i uzorkovanja, tretirana 0,1% otopinom riboflavina (ista koncentracija otopine metilenskog modrila u skupini PDT2) pripremljenoj u bolničkoj ljekarni. Otopina je aplicirana sterilnom štrcaljkom i ostavljena na uzorku 60 s, nakon čega je slijedilo ispiranje sterilnom fiziološkom otopinom i nježno sušenje sterilnom gazom (Slika 10.). Tako tretirana površina implantata zatim je ozračena plavim svjetlom diodnog lasera (SiroLaser Blue, Dentsply Sirona, Bensheim, Njemačka) valne duljine 445 nm (Q snaga = 100 mW) u pulsnom načinu rada od 100 Hz pomoću EasyTip 320  $\mu$ m optičkog vlakna, s maksimalnom snagom gustoće od 124,34 W/cm<sup>2</sup> i energijom gustoće od 1,24 J/cm<sup>2</sup>, tijekom 60 sekundi krećući se kružnim pokretima na približno 1 mm od površine implantata (Slika 11.). Proces je proveo iskusni operater koristeći potrebnu zaštitnu opremu u vidu zaštitnih naočala.

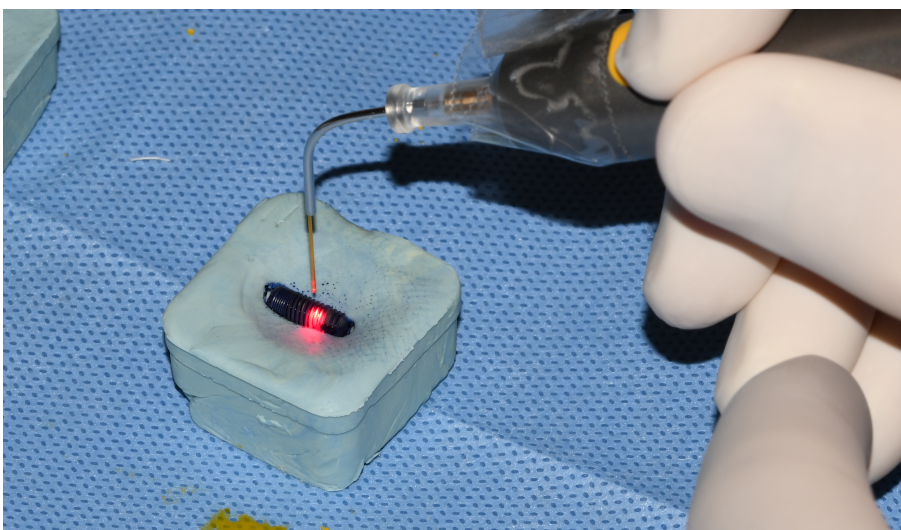


Slika 10. Površina implantata tretirana 0,1% otopinom riboflavina pripremljenoj u bolničkoj ljekarni ostavljena na uzorku 60 s.



Slika 11. Površina implantata tretirana plavim svjetlom vidljivog spektra valne duljine 445 nm emitiranim diodnim laserom u pulsnom načinu rada pomoću EasyTip 320  $\mu\text{m}$  optičkog vlakna.

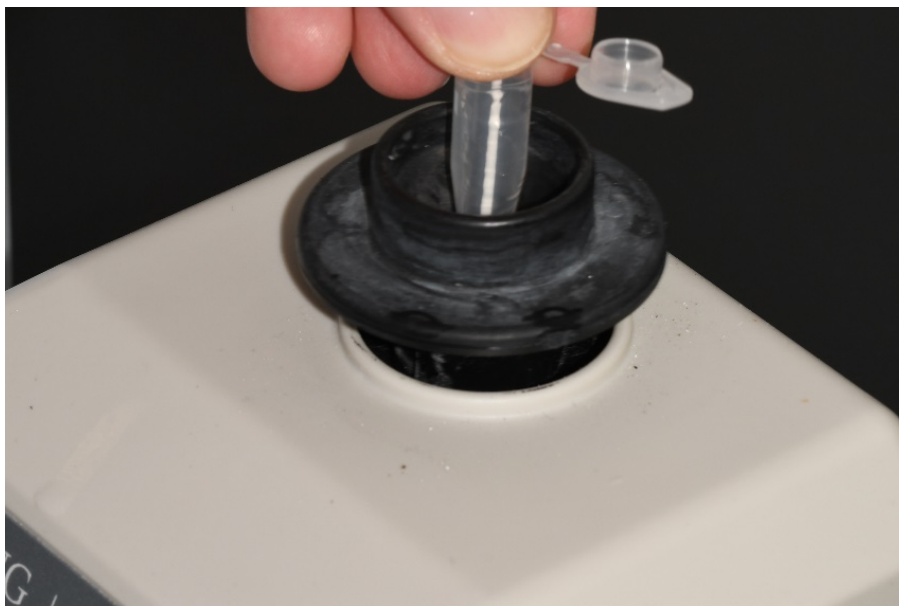
Grupa 4. Površina implantata druge fotodinamske terapijske skupine (PDT2) je nakon uklanjanja dentalnih implantata iz bakterijsko-gljivične suspenzije pomoću sterilnih pinceta, nježnog sušenja sterilnom gazom kako bi se uklonio višak otopine bakterija i gljivica i postavljanja na sterilne silikonske držače kako bi se spriječilo okretanje i pomicanje tijekom dezinfekcije i uzorkovanja, tretirana 0,1% otopinom metilenskog modrila (kao fotosenzibilizator) prethodno pripremljenoj u bolničkoj ljekarni. Pripremljena otopina je nanescena pomoću sterilne štrcaljke tijekom 60 s, nakon čega je slijedilo nježno ispiranje sterilnom fiziološkom otopinom. Površina implantata je zatim osušena sterilnom gazom i tretirana svjetlom crvenog spektra diodnim laserom (SiroLaser Blue, Dentsply Sirona, Bensheim, Njemačka) valne duljine 660 nm (Q snaga = 100 mW), u načinu kontinuiranog vala pomoću EasyTip 320  $\mu\text{m}$  optičkog vlakna, s maksimalnom snagom gustoće od 124,34 W/cm<sup>2</sup> i maksimalne gustoće energije od 1240 J/cm<sup>2</sup>, tijekom 60 s krećući se kružnim pokretima na približno 1 mm od površine implantata (Slika 12.). Ovaj proces je proveo isti iskusni operater koristeći potrebnu zaštitnu opremu u vidu zaštitnih naočala.



Slika 12. Površina implantata tretirana crvenim svjetlom vidljivog spektra spektrom valne duljine 660 nm, u načinu kontinuiranog vala pomoću EasyTip 320  $\mu\text{m}$  optičkog vlakna.

### 3.4. Uzorkovanje i analiza uzoraka

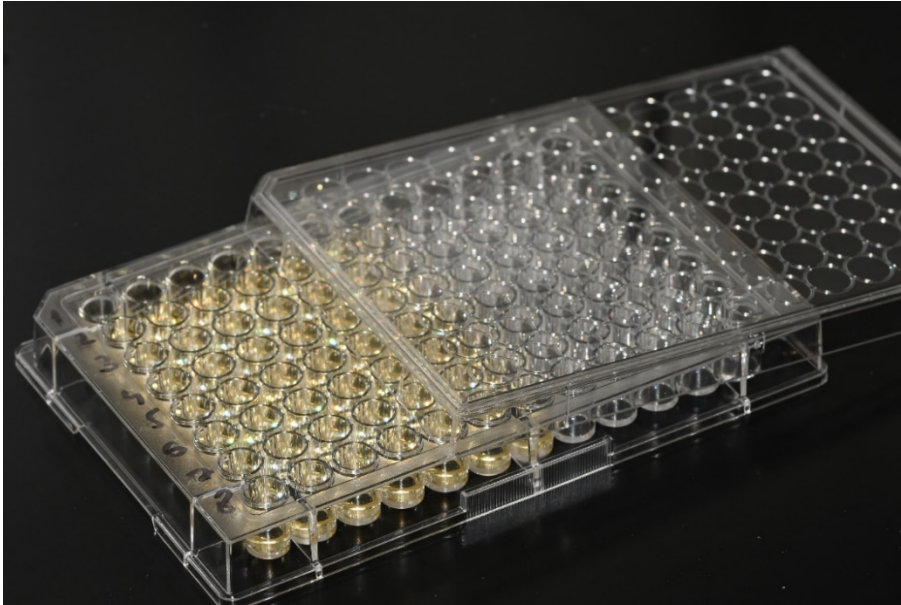
Uzorci su prikupljeni pomoću sterilnih plastičnih mikrobioloških eza za inokulaciju. Uzorkovanje je provedeno pomoću pet vodoravnih pokreta četkanja između drugog i petog navoja implantata. Plastične eze s uzorcima su zatim uronjene u 0,5 mL sterilne infuzije mozga i srca. Svaka epruveta, koja sadrži infuziju i plastičnu petlju za inokulaciju, zatim je vorteksirana (vrtložni mikser Corning LSE, Corning, NY, SAD) 60 s (Slika 13.).



Slika 13. Vorteksiranje u vrtložnom mikseru epruvete sa sterilnom infuzijom mozga i srca i uronjenom plastičnom ezom nakon uzorkovanja.

Kako bi se kvantificirao broj mikroorganizama nakon uzorkovanja, provedena su serijska razrjeđenja u 96 mikrotitarskih mikropločica na način da je 20  $\mu\text{L}$  suspenzije dodano u 180  $\mu\text{L}$  hranjivog bujona i promiješano, a 20  $\mu\text{L}$  novodobivene otopine je prebačeno u sljedeću jažicu i razrijeđeno s dodatnih 180  $\mu\text{L}$  hranjivog bujona. Tako je provedeno serijsko razrjeđivanje do 8 razrjeđenja (Slika 14.). Iz svake jažice 50  $\mu\text{L}$  otopine je nasadeno na ploču krvnog agara (Slika 15.). Nakon perioda inkubacije od 48 sati na 37 °C izbrojane su nastale kolonije mikroorganizama (*colony forming units* - CFU) na najvećem razrjeđenju.



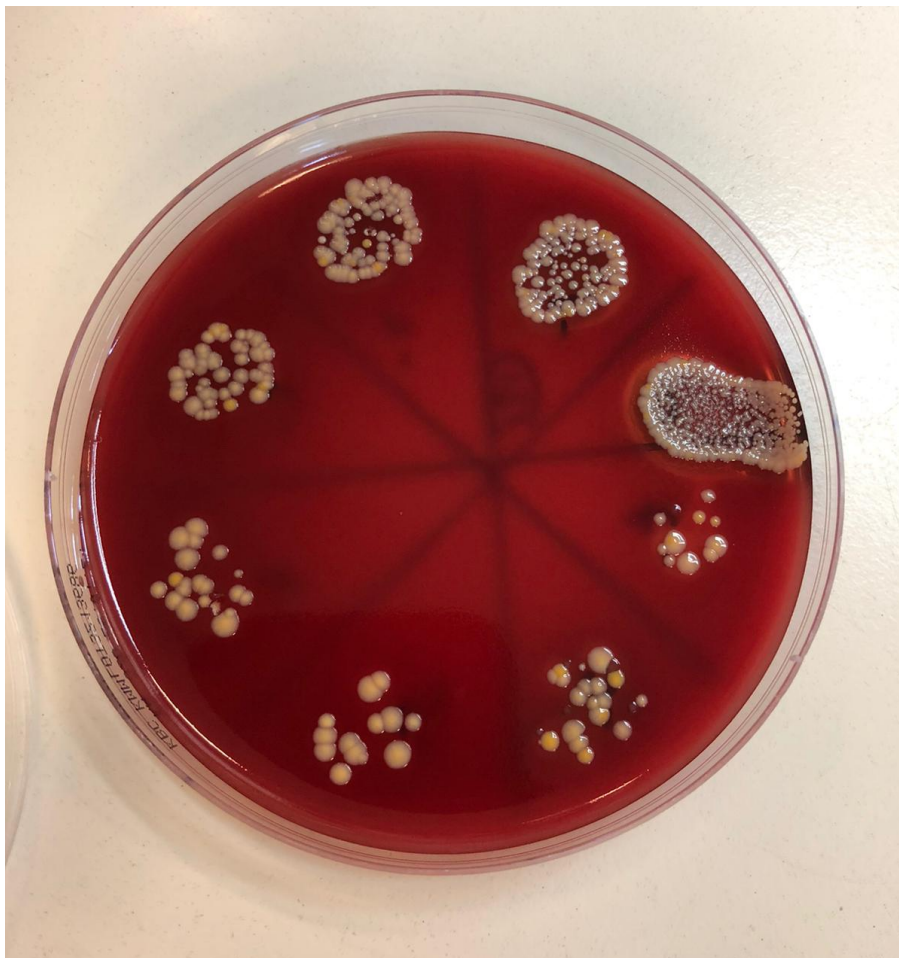


Slika 14. Jažice sa otopinama sa serijskim razrjeđenjem.



Slika 15. Ploče krvnog agara numerirane i spremne za nasađivanje otopina serijskog razrjeđenja.

Makroskopski različite kolonije potvrđene su pomoću uređaja MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Hamburg, Njemačka), a dobiveni rezultati broj kolonija i stupanj razrjeđenja uneseni su u pripremljene tablice (Slika 16.).



Slika 16. Kolonije mikroorganizama nakon perioda inkubacije od 48 sati na 37 °C; izbrojane su kolonije na najvećem razrjeđenju.

### 3.5. SEM analiza

Četiri uzorka odabrana su za SEM analizu elektronskim mikroskopom na Fakultetu za fiziku Sveučilišta u Rijeci (Slika 17.); uzorak negativne kontrolne skupine (NC) bez dezinfekcijskog protokola, kako bi se potvrdilo postojanje biofilma, uzorak pozitivne kontrolne skupine (PC) tretiran 0,2% otopinom na bazi klorheksidina, uzorak fotodinamske terapijske skupine (PDT1) tretiran 0,1% otopinom riboflavina i diodnim laserom plavim svjetlom valne duljine 445 nm i uzorak druge fotodinamičke terapijske skupine (PDT2) tretiran 0,1% otopinom metileng modrila i diodnim laserom valne duljine 660nm kako bi se prikazao antimikrobni efekt korištenih protokola i dokazala prisutnost mikroorganizama na površini implantata. Uzorci namijenjeni SEM analizi pohranjeni su u 10 % formalin.

Uzorci su napareni zlato-paladij slitinom debljine do 20  $\mu\text{m}$  u vakuumu te potom pregledani pod elektronskim mikroskopom, s time da je ciljani središnji dio svakog uzorka. Povećanje svakog uzorka navedeno je u opisu slika.



Slika 17. Pretražni elektronski mikroskop SEM (JSM-7800 F Schottky Field Emission Scanning Electron Microscope, JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

### 3.6. Statistička analiza

Normalnost raspodjele kontinuiranih varijabli procijenjena je Shapiro–Wilkovim testom. U ovisnosti o normalnosti raspodjele kontinuirani podaci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, ili medijanom s granicama interkvartilnog raspona. Za testiranje razlika između dvije nezavisne skupine koristio se Studentov t-test za kontinuirane podatke koji slijede normalnu razdiobu, a u ostalim slučajevima Mann–Whitneyjev U test (s Hodges–Lehmannovom razlikom medijana i pripadnim 95% rasponom pouzdanosti razlike). Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ . Statistička analiza provedena je korištenjem MedCalc® Statistical Software version 20.218 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2023)

## **4. REZULTATI**

Istraživanje je provedeno na 20 uzoraka skupina negativne (NC) i pozitivne kontrole (PC) te prve fotodinamske terapijske skupine (PDT1) tretirane 0,1% riboflavinom kao fotosenzitizirajućim sredstvom aktiviranim diodnim laserom pomoću svjetla plavog vidljivog spektra valne duljine 445 nm i druge fotodinamske terapijske skupine (PDT2) tretirane 0,1% metilenskim modrilom kao fotosenzitizirajućim sredstvom aktiviranim diodnim laserom pomoću svjetla crvenog vidljivog spektra valne duljine 660 nm. Mjere sredine i raspršenja te minimalnih i maksimalnih vrijednosti u broju kolonija *Staphylococcus aureus* CFU/ml i logCFU/ml prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Broj kolonija *Staphylococcus aureus*.

[CFU/ml]	Broj uzoraka	Minimalna vrijednost	Maksimalna vrijednost	Medijan	Interkvartilni raspon (25%-75%)
NC	20	10	$10^8$	$3,2 \times 10^6$	$10^4 - 1,5 \times 10^7$
PC	20	0	$10^7$	0	0 – 0
PDT1	20	0	$10^5$	0,5	0 - 1
PDT2	20	0	$3 \times 10^4$	0	0 – 5,5
[logCFU/ml]				Aritmetička sredina	Standardna devijacija
NC	20	1	8	5,44	2,11
PC	20	0	7	3,50	4,04
PDT1	20	0	5	1,06	1,99
PDT2	20	0	4,48	1,50	1,65

Značajno je veći broj kolonija [CFU/ml] *Staphylococcus aureus* u negativnoj kontroli (medijan  $3,2 \times 10^6$ ) u odnosu na broj kolonija u prvoj fotodinamskoj terapijskoj skupini (medijan 0,5) (Mann Whitney U test,  $P < 0,001$ ), i u negativnoj kontroli (medijan  $3,2 \times 10^6$ ) u odnosu na drugu fotodinamsku terapijsku skupinu (medijan 0) (Mann Whitney U test,  $P < 0,001$ ). Uspoređujemo li negativnu i pozitivnu kontrolu, uočavamo da je broj kolonija značajno veći (medijan  $3,2 \times 10^6$ ) kod negativne u odnosu na pozitivnu kontrolu (Mann Whitney U test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 2.)

Tablica 2. Razlika u broju kolonija (CFU/ml) *Staphylococcus aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>	Medijan (interkvartilni raspon) broja kolonija	Razlika <sup>†</sup>	95% CI	P*
PDT1	0,5 (0 – 1)	3,15 x 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup> do 10 <sup>7</sup>	<0,001
NC	3,2 x 10 <sup>6</sup> (10 <sup>4</sup> – 1,5 x 10 <sup>7</sup> )			
PDT1	0,5 (0 – 1)	0	-1 do 0	0,09
PC	0 (0 – 0)			
PDT2	0 (0 – 5,5)	3,19 x 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup> do 10 <sup>7</sup>	<0,001
NC	3,2·10 <sup>6</sup> (10 <sup>4</sup> – 1,5·10 <sup>7</sup> )			
PDT2	0 (0 – 0,51)	0	0 do 0	0,34
PC	0 (0 – 0)			
NC	3,2 x 10 <sup>6</sup> (10 <sup>4</sup> – 1,5 x 10 <sup>7</sup> )	-4 x 10 <sup>5</sup>	-1x10 <sup>7</sup> do -1x10 <sup>4</sup>	<0,001
PC	0 (0 – 0)			

CI – raspon pouzdanosti (eng. *Confidence interval*); \*Mann Whitney U test; <sup>†</sup>Hodges-Lehmannova razlika medijana

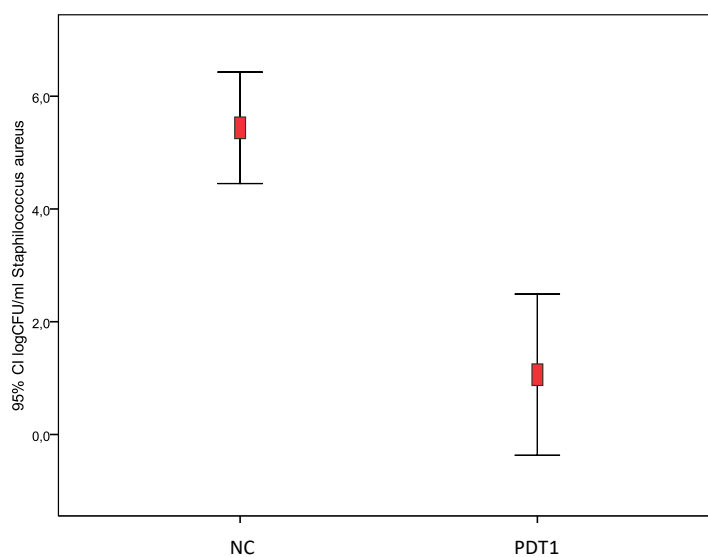
Nakon logaritmiranja potvrđen je značajno veći broj kolonija [logCFU/ml] *Staphylococcus aureus* kod negativne kontrole u odnosu na prvu fotodinamsku terapijsku skupinu (t- test, P < 0,001) i negativne kontrole u odnosu na drugu fotodinamsku terapijsku skupinu (t- test, P < 0,001), dok su razlike između negativne i pozitivne kontrole bez statističke značajnosti (Tablica 3., Slika 18., Slika 19.).

Tablica 3. Razlika u broju kolonija (logCFU/ml) *Staphylococcus aureus*.

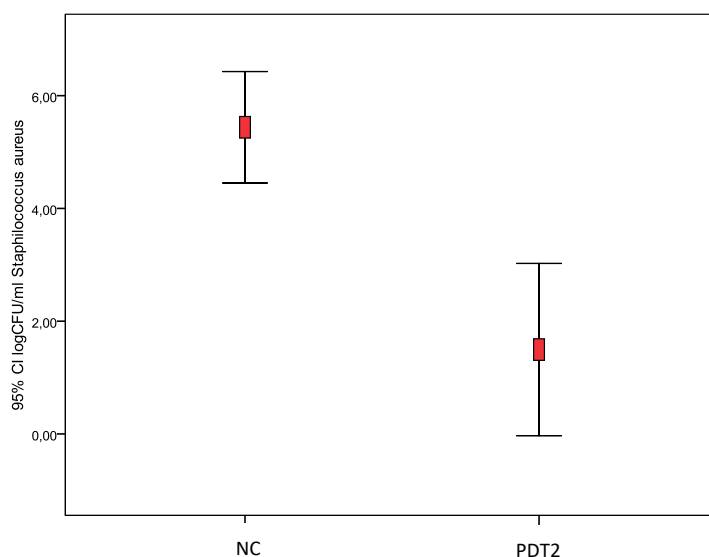
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aritmetička sredina (SD) broja kolonija [logCFU/ml]	Razlika	95% CI	P*
PDT1	1,06 (1,99)	4,4	2,73 do 6,03	<0,001
NC	5,44 (2,11)			
PDT1	1,06 (1,99)	2,4	-0,98 do 5,86	0,15
PC	3,50 (4,04)			

PDT2	1,50 (1,65)	3,9	2,10 do 5,80	<0,001
NC	5,44 (2,11)			
PDT2	1,50 (1,65)	2,0	-1,81 do 5,82	0,27
PC	3,50 (4,0)			
NC	5,44 (2,11)	-1,9	-4,74 do 0,86	0,17
PC	3,50 (4,04)			

SD – standardna devijacija; CI – raspon pouzdanosti (eng. *Confidence interval*); \*t-test



Slika 18. Razlike i 95% raspon pouzdanosti logCFU/ml *Staphylococcus aureus* između negativne kontrole i prve fotodinamičke terapijske skupine ( $P < 0,001$ ).



Slika 19. Razlike i 95% raspon pouzdanosti logCFU/ml *Staphylococcus aureus* između negativne kontrole i druge fotodinamičke terapijske skupine ( $P < 0,001$ ).

Mjere sredine i raspršenja te minimalnih i maksimalnih vrijednosti u broju kolonija *Candida Albicans* CFU/ml i logCFU/ml prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Broj kolonija *Candida Albicans*.

[CFU/ml]	Broj uzoraka	Minimalna vrijednost	Maksimalna vrijednost	Medijan	Interkvartilni raspon (25%-75%)
NC	20	0	$2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$	$20 - 1,5 \times 10^4$
PC	20	0	$10^2$	0	0 – 0
PDT1	20	0	$10^4$	0	0 – 0
PDT2	20	0	$10^4$	0	0 – 1

[logCFU/ml]		Aritmetička sredina	Standardna devijacija
NC	20	1,3	5,3
PC	20	1	2
PDT1	20	0	4
PDT2	20	0	4



Značajno je veći broj kolonija [CFU/ml] *Candida Albicans* u negativnoj kontroli (medijan  $1,5 \times 10^3$ ) u odnosu na prvu fotodinamsku terapijsku skupinu (Mann Whitney U test,  $P < 0,001$ ), i u negativnoj kontroli (medijan  $1,5 \times 10^3$ ) u odnosu na drugu fotodinamsku terapijsku skupinu (Mann Whitney U test,  $P < 0,001$ ). Uspoređujemo li negativnu i pozitivnu kontrolu, uočavamo da je broj kolonija značajno veći kod negativne (medijan  $1,5 \times 10^3$ ) u odnosu na pozitivnu kontrolu (medijan 0) (Mann Whitney U test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 5.).

Tablica 5. Razlika u broju kolonija (CFU/ml) *Candida Albicans*.

<i>Candida Albicans</i>	Medijan (interkvartilni raspon) broja kolonija	Razlika <sup>†</sup>	95% CI	<i>P</i> *
PDT1	0 (0 – 0)	$10^3$	$10^4$ do $10^7$	<0,001
NC	$1,5 \times 10^3$ (20 – $1,5 \times 10^4$ )			
PDT1	0 (0 – 0)	0	-1 do 0	0,09
PC	0 (0 – 0)			
PDT2	0 (0 – 0)	$10^3$	$10^4$ do $10^7$	<0,001
NC	$1,5 \times 10^3$ (20 – $1,5 \times 10^4$ )			
PDT2	0 (0 – 0)	0	-1 do 0	0,09
PC	0 (0 – 0)			
NC	$1,5 \times 10^3$ (20 – $1,5 \times 10^4$ )	$-1,45 \times 10^3$	$-1 \times 10^7$ do $-1 \times 10^4$	<0,001
PC	0 (0 – 0)			

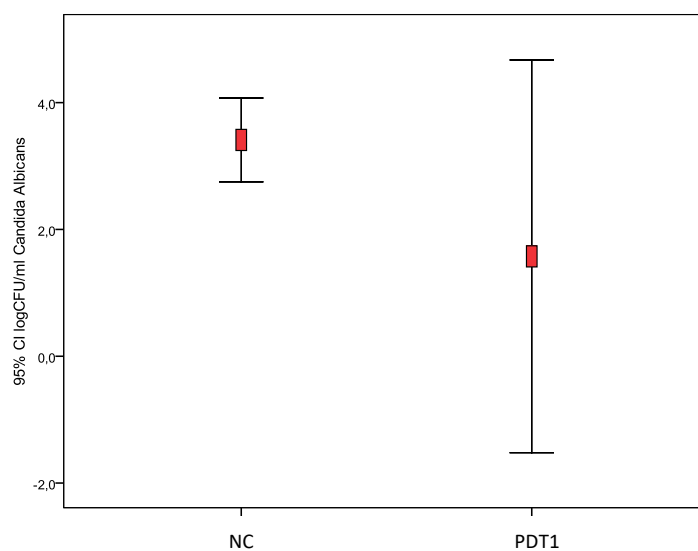
CI – raspon pouzdanosti (eng. *Confidence interval*); \*Mann Whitney U test; <sup>†</sup>Hodges-Lehmannova razlika medijana

Nakon logaritmiranja potvrđen je značajno veći broj kolonija [logCFU/ml] *Candida Albicans* kod negativne kontrole u odnosu na prvu fotodinamsku terapijsku skupinu (t-test,  $P = 0,03$ ) i negativne kontrole u odnosu na drugu fotodinamsku terapijsku skupinu (t- test,  $P = 0,002$ ). Negativna kontrola ima nešto veći broj kolonija od pozitivne kontrole, ali je razlika s graničnom značajnošću (t-test,  $P = 0,05$ ) (Tablica 6., Slika 20., Slika 21., Slika 22.).

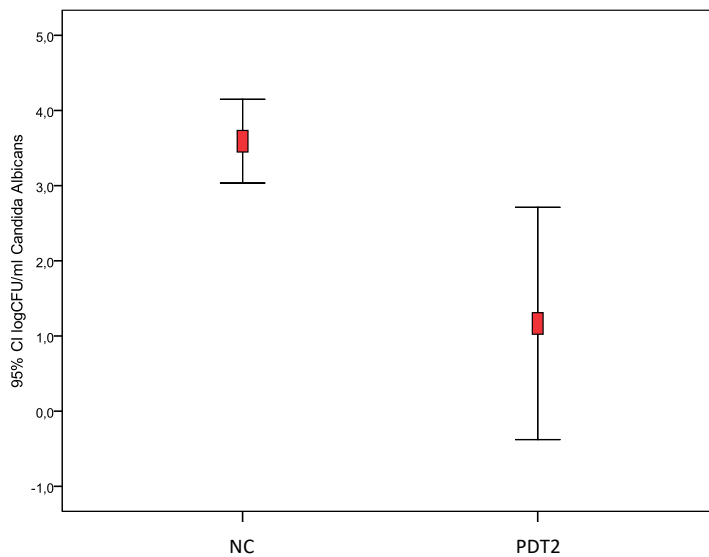
Tablica 6. Razlika u broju kolonija (logCFU/ml) *Candida Albicans*.

<i>Candida Albicans</i>	Aritmetička sredina (SD)			
	broja kolonija [logCFU/ml]	Razlika	95% CI	<i>P</i> *
PDT1	1,58 (1,95)	-1,84	-3,46 do -0,21	0,03
NC	3,41 (1,24)			
PDT1	1,58 (1,95)	-0,08	-4,22 do 4,07	0,96
PC	1,50 (0,71)			
PDT2	1,17 (1,47)	-2,24	-3,55 do -0,94	0,002
NC	3,41 (1,24)			
PDT2	1,17 (1,47)	0,33	-2,41 do 3,08	0,78
PC	1,50 (0,71)			
NC	3,41 (1,24)	-1,91	-3,84 do 0,02	0,05
PC	1,50 (0,71)			

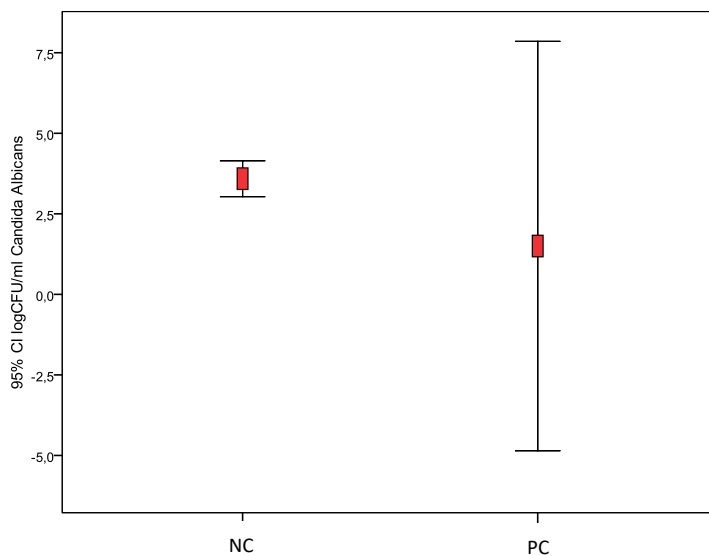
SD – standardna devijacija; CI – raspon pouzdanosti (eng. *Confidence interval*); \*t-test



Slika 20. Razlike i 95% raspon pouzdanosti logCFU/ml *Candida Albicans* između negativne kontrole i prve fotodinamske terapijske skupine ( $P = 0,03$ ).



Slika 21. Razlike i 95% raspon pouzdanosti logCFU/ml *Candida Albicans* između negativne kontrole i druge fotodinamske terapijske skupine ( $P = 0,002$ ).



Slika 22. Razlike i 95% raspon pouzdanosti logCFU/ml *Candida Albicans* između negativne i pozitivne kontrole ( $P = 0,05$ ).

Nema značajnih razlika u broju kolonija [CFU/ml] *Staphylococcus aureus* i *Candida Albicans* u odnosu na to radi li se o prvoj fotodinamskoj terapijskoj skupini ili drugoj fotodinamskoj terapijskoj skupini (Tablica 7.).

Tablica 7. Razlika u broju kolonija (CFU/ml) između prve fotodinamske terapijske skupine i druge fotodinamske terapijske skupine.

	Medijan (interkvartilni rapon)		Razlika <sup>†</sup>	95% CI	P*
	PDT1	PDT2			
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5 (0 – 1)	0 (0 – 5,5)	0	-1 do 0	0,55
<i>Candida Albicans</i>	0 (0 – 0)	0 (0 - 1)	0	0 do 0	0,49

CI – raspon pouzdanosti (eng. *Confidence interval*); \*Mann Whitney U test; <sup>†</sup>Hodges-Lehmann razlika medijana

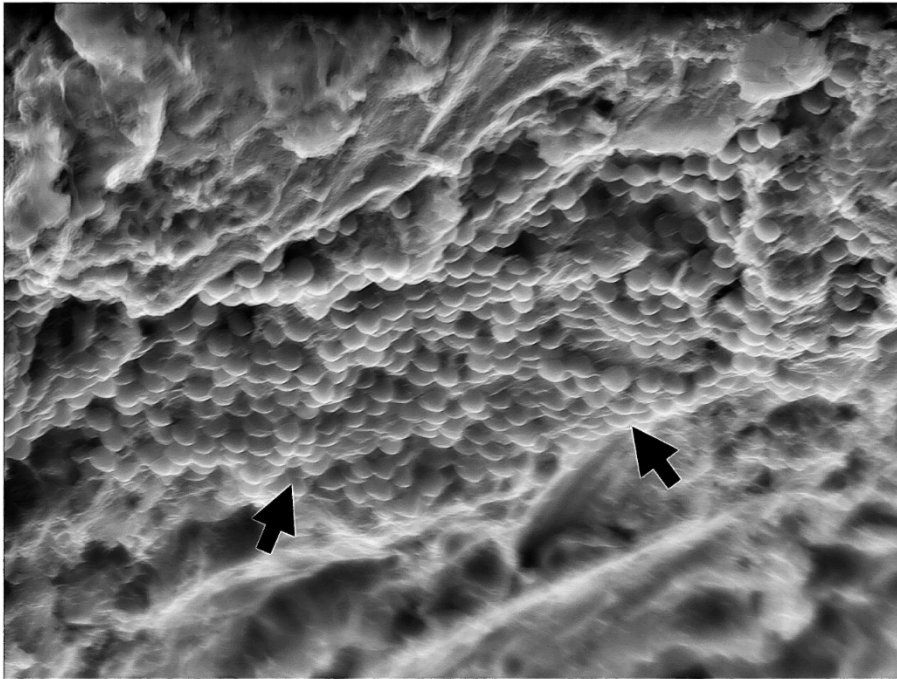
Niti nakon logaritmiranja nema značajnih razlika u broju kolonija [logCFU/ml] *Staphylococcus aureus* i *Candida Albicans* u odnosu na to radi li se o prvoj ili drugoj fotodinamskoj terapijskoj skupini (Tablica 8.).

Tablica 8. Razlika u broju kolonija (logCFU/ml) između prve i druge fotodinamske terapijske skupine.

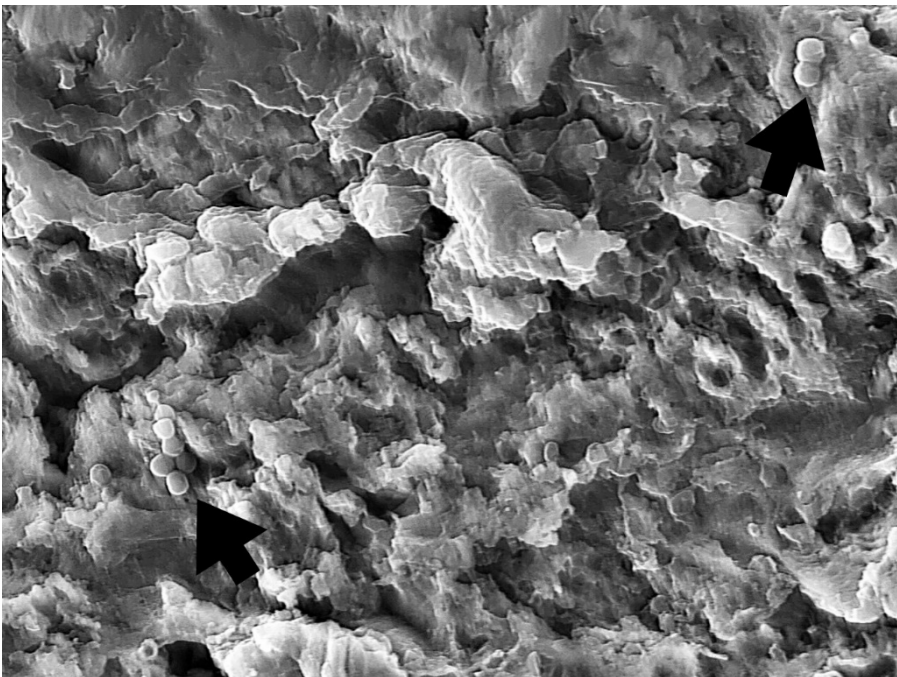
	Aritmetička sredina (SD)		Razlika	95% CI	P*
	broja kolonija [logCFU/ml]				
	PDT1	PDT2			
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,06 (1,99)	1,50 (1,65)	0,44	-1,52 do 2,39	0,64
<i>Candida Albicans</i>	1,58 (1,95)	1,17 (1,47)	-0,41	-2,89 do 2,07	0,71

SD – standardna devijacija; CI – raspon pouzdanosti (eng. *Confidence interval*); \*t-test

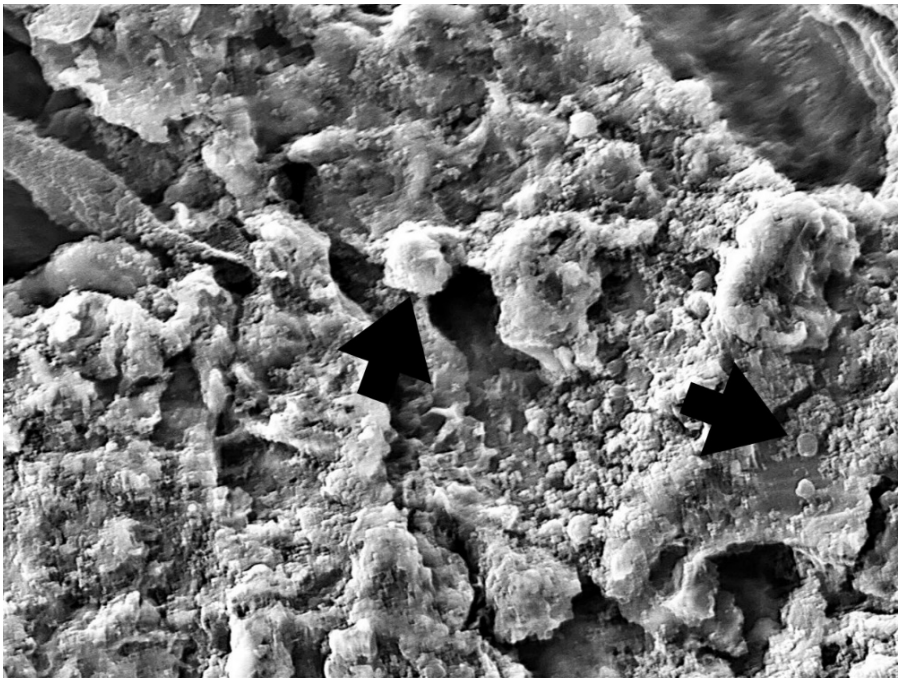
Stvaranje gustog, ravnomjerno raspoređenog biofilma mikroorganizama vidljivo je u SEM analizi negativne kontrolne skupine (Slika 23.). U pozitivnoj kontrolnoj skupini, PDT1 i PDT2 može se naći nekoliko pojedinačnih ili manjih skupina mikroorganizama neravnomjerno raspoređenih na hrapavoj površini implantata (Slika 24., Slika 25., Slika 26.). SEM analizom se ne može potvrditi vitalitet stanica.



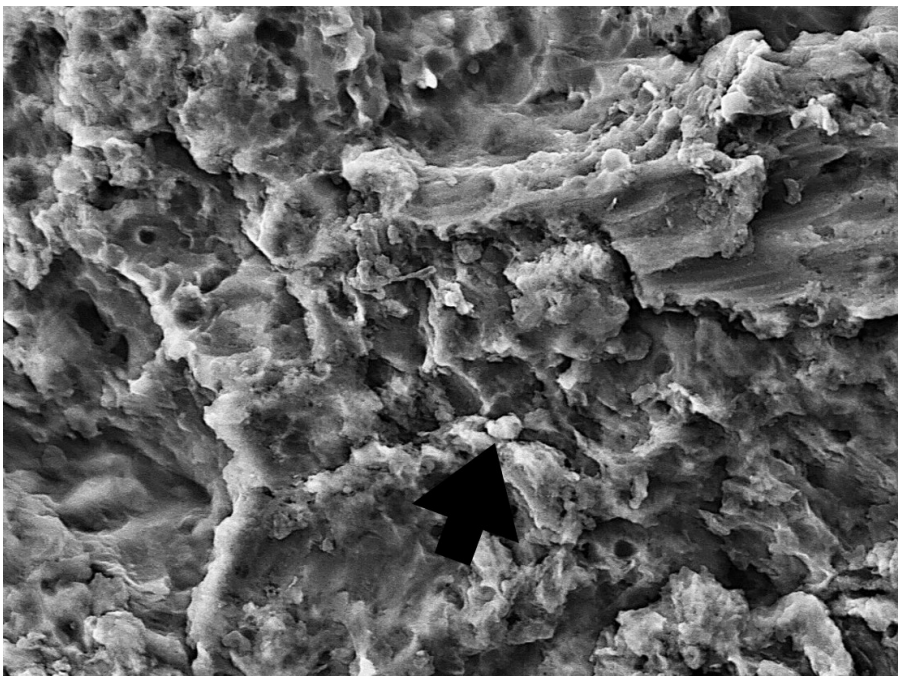
Slika 23. Stvaranje biofilma potvrđeno pomoću SEM-a (5000 $\times$ ) — strelice pokazuju stanice mikroorganizama, čija nakupina prikazuje stvaranje biofilma na površini implantata.



Slika 24. Pozitivna kontrolna skupina — uočava se smanjenje biofilma bakterija i gljivica nakon tretmana s 0,2% CHX (5000 $\times$ ). Još je uvijek moguće uočiti poneke stanice mikroorganizama (prikazano strelicama).



Slika 25. Fotodinamske terapijske skupina (PDT1) — smanjenje bakterija i gljivica nakon tretmana 0,1% metilenskim modrilom i diodnim laserom valne duljine 660 nm (5000×). Stanice mikroorganizama još se mogu uočiti (veće stanice *C. Albicans*, manje stanice *S. Aureus*) (strelica).



Slika 26. Fotodinamske terapijske skupina (PDT2) — smanjenje bakterija i gljivica nakon tretiranja površine implantata 0,1% riboflavinom i diodnim laserom sa svjetlom valne duljine 445 nm (5000×). Stanice mikroorganizama još se mogu uočiti (strelica) iako se vitalnost stanice ne može odrediti.

## **5. RASPRAVA**

Dekontaminacija površine implantata glavni je cilj liječenja periimplantitisa iako nije dokazano da je proces reverzibilan i upitna je mogućnost potpune regeneracije jednom nastalog periimplantatnog defekta (81). U svim do danas provedenim *in vivo*, pa čak i *in vitro* istraživanjima, nije postignuta potpuna dezinfekcija površine kod koje je dokazana potpuna odsutnost bakterija. Glavni problem otežane dezinfekcije površine leži u strukturnim nepravilnostima različito obrađenih površina titanskih dentalnih implantata, a koje imaju ulogu u boljoj oseointegraciji samog implantata s kosti u koju je implantat ugrađen. Površinske nepravilnosti dentalnih implantata povećavaju potencijalnu kontaktnu površinu titanskih oksida i kosti. Takve površinske nepravilnosti ujedno i olakšavaju nakupljanje bakterija (138). U skladu s rezultatima prethodnih istraživanja i u ovom istraživanju, iako je testiranim dezinfekcijskim protokolom značajno smanjen broj bakterija u odnosu na netretiranu skupinu, ne uspijeva se postići potpuna dekontaminacija površine. Vitalitet zaostalih mikroorganizama se dokazao nasađivanjem uzoraka nakon dezinfekcije na podlogu, inkubacijom i porastom kolonija mikroorganizama, dok se njihova prisutnost dodatno potvrdila SEM mikroskopijom.

Gustumhaugen i suradnici, pri ispitivanju učinkovitosti nakupljanja i uklanjanja bakterija na titanskim diskovima različite hrapavosti, pokazali su da glatkija površina dovodi do nižih razina zadržavanja biomase nakon kemijskog i mehaničkog čišćenja (75). Zbog takvih nalaza se često u literaturi u neestetskim područjima preporučaju implantati koji su dizajnirani za postavljanje u razini zubnog mesa te imaju poliran koronarni dio koji omogućuje lakše čišćenje i u situacijama povlačenja zubnog mesa i izlaganja (poliranog) dijela implantata okolišu usne šupljine.

Današnji trendovi u dentalnoj implantologiji propagiraju postekstrakcijsko postavljanje dentalnih implantata i imedijatno opterećenje istih u cilju ranije protetske opskrbe pacijenta. Zbog toga se implantati dizajniraju na način kako bi ostvarili veliku primarnu stabilnost po ugradnji. Dizajn implantata s ciljem ostvarivanja velike primarne stabilnosti je obično konusni s vrlo izraženim samonarezujućim navojima. U slučaju razvoja periimplantitisa oko implantata takvog dizajna vrlo je otežan pristup i temeljito čišćenje svih površina implantata (138). Uporaba ručnih instrumenata koji se smatraju zlatnim standardom u mehaničkom uklanjanju plaka mikroorganizama je slabo efikasna ili praktički nemoguća, te se zbog toga pribjegava pjeskarenju površine, ili tretiranju s rotirajućim titanijskim ili plastičnim rotirajućim četkicama. Nakon mehaničkog debridmana površine implantata od biofilma cilj PDT-a je inaktivacija i uništavanje svih zaostalih bakterijskih stanica. Mehanički debridman i PDT se moraju



kombinirati jer sama primjena PDT-a nije učinkovita u uklanjanju debrisa mikroorganizama, već dovodi do smanjenja biološkog opterećenje.

U većini postojećih *in vitro* studija dekontaminacije površine dentalnih implantata korišteni su titanijski diskovi. Zbog prethodno navedenih razloga, specifičnog dizajna površine implantata, takve *in vitro* studije na ravnim titanijskim diskovima ne mogu dati realan prikaz i simulirati *in vivo* situaciju što se tiče dekontaminacije dijelova između navoja implantata. Testovi provedeni na dentalnim implantatima koji su namijenjeni kliničkoj upotrebi poput GC Aadvia implantata korištenih u ovom istraživanju, iako značajno podižu troškove istraživanja, trebali bi dati realnije rezultate od studija provedenih na titanskim diskovima jer je površinska mikro- i makromorfologija ista kao u kliničkim situacijama. U ovom istraživanju testiranja su provedena na implantatima koji, iako nisu iz linije koničnih implantata koji ostvaruju velike vrijednosti primarne stabilnosti, imaju vrlo izražene navoje (Slika 7.).

U provođenju fotodinamske terapije uporaba fotosenzitivnih sredstava za liječenje paradontitisa ili periimplantitisa ima različite prednosti. Fotosenzitivna sredstva mogu prodrijeti u pore implantata i površine korijena koje nisu dostupne pri korištenju mehaničkog protokola dekontaminacije (139). Prema Deppeu i suradnicima fotodinamska terapija nema štetnih učinaka na površinu implantata, ali toplinske promjene koje se događaju prilikom aplikacije svjetla određene valne duljine diodnim laserom mogu varirati i utjecati na modifikaciju površine dentalnih implantata. Isti je autor zaključio da uporaba diodnog lasera od 445 nm u načinu kontinuiranog vala (CW) ( $\geq 0,8$  W) i veće izlazne snage ( $\geq 1,0$  W) u pulsirajućem načinu rada pri duljem vremenu ekspozicije ( $>10$  s) može uzrokovati štetna povećanja temperature više od 10 °C (140). Međutim, i CW i pulsirajuće lasersko zračenje mogu spriječiti štetne poraste temperature kada se koriste pri umjerenim parametrima (1 W, 10 s, 50% DC ili 3 W, 20 s, 10% DC). [29]. Kako bi se izbjegao takav potencijalno štetan utjecaj na površinu dentalnih implantata, u istraživanju korišten diodni laser od 445 nm (320  $\mu$ m, 60 s, 200 mW, Q snaga = 100 mW, 100 Hz, 124,34 W/cm<sup>2</sup>, 1,24 J/cm<sup>2</sup>) primjenjivan je s izlaznom snagom od 100 mW koja je sigurna za korištenje, a pulsni način rada čini njegovo korištenje sigurnijim i sprječava potencijalni porast temperature.

Unatoč tome, stalno kretanje optičkog vlakana unutar periimplantatnog defekta iznad površine implantata također je važno za održavanje što nižeg porasta temperature u jednoj točki kako bi se izbjeglo potencijalno toplinsko oštećenje susjednih tkiva (141).

Klorheksidin se dugo smatrao zlatnim standardom u dezinfekciji površine implantata i u kliničkoj praksi upravo se klorheksidin najčešće koristi u kombinaciji s mehaničkim debridmanom. Iako je manje poznato, klorheksidin može utjecati na promjenu topografije površine dentalnih implantata i posjeduje dokazan citotoksični učinak na stanice domaćina, što može spriječiti potencijalnu re-oseointegracije dentalnih implantata. Stoga se ne preporuča upotrebu klorheksidina kao površinskog sredstva dekontaminacije kod periimplantitisa, već primjena drugih antimikrobnih sredstava (142).

U ovoj studiji 0,2% klorheksidin (CHX) je korišten kao pozitivna kontrola. Prilikom procesa dekontaminacije klorheksidin je apliciran na površinu implantata kuglicom vate i pokretima četkanja, simulirajući tako najučestaliji način *in vivo* upotrebe. Nisu dokazane statistički značajne razlike u usporedbi dekontaminacije površine implantata klorheksidinom i PDT protokolima. U studiji koju su proveli Widodo i suradnici, izvijestili su da je u usporedbi s PDT-om s metilenskim modrilom bojom i diodnim laserom od 660 nm, tretman s 0,2% CHX imao manji učinak na površine implantata različite hrapavosti kontaminirane *S. aureusom* (143). Razlika u rezultatima ovih studija se može pronaći u načinu aplikacije klorheksidina, odnosno mehaničkom debridmanu površine vaticom u našoj studiji. U prethodno spomenutoj studiji Widodo i suradnici su titanijske diskove na kojima je studija provedena uronili u otopinu klorheksidina bez mehaničke površinske obrade kuglicama vate. Ovaj zaključak se može dodatno potkrijepiti kasnijim rezultatima u kojima su izvijestili o učinkovitijem smanjenju bakterijskog opterećenja korištenjem pokreta četkanja samo sa sterilnom vatom (bez CHX-a) na glatkoj površini implantata. Međutim, rezultate antimikrobnog djelovanja CHX-a treba oprezno tumačiti zbog njegova svojstva CHX vezanja na površinu implantata s naknadnim postupnim otpuštanjem, čime je opisan baktericidni učinak koji traje i do 24 sata nakon prestanka aplikacije i ispiranja. Također, zbog svojstva vezivanja na površinu implantata postoji i mogućnost unošenja CHX uzorkovanjem na hranjive podloge, što može rezultirati trajnim baktericidnim učinkom (144).

Različite bakterije pokazuju različitu osjetljivost na svjetlost određenih valnih duljina zbog mogućih izravnih učinaka na bakterije, koje proizvode endogene fotosenzibilizatore, i različitog afiniteta apsorpcije prema različitim fotosenzibilizatorima (136). Bärenfaller i suradnici dokazali su da plavo svjetlo ima isti učinak na parodontne patogene *Porphyromonas gingivalis* i *Prevotella intermedia* kada se koriste s fotosenzibilizatorom ili u njegovoj odsutnosti i zaključili da endogene tvari  $\mu$ -okso bis i hematin koje proizvode same bakterije djeluju kao fotosenzibilizatori koji dovode do smrti bakterijske stanice (113). Poznavajući etiologiju

parodontitis i periimplantitisa, korištenje svjetla plavog spektra moglo bi se pokazati kao vrlo učinkovito, te je zbog toga vrijedno daljnjeg istraživanja. Za razliku od plavog svjetla, korištenje crvenog svjetla nije rezultiralo značajnim smanjenjem ovih parodontnih patogena. Prethodne studije su izvijestile o umjerenim učincima crvenog svjetla na *P. intermedia* i *P. gingivalis* budući da je apsorpcija endogenih porfirina u crvenom spektru relativno niska (145). Sve navedene pigmentirane bakterije koje su primarni parodontni patogeni su anaerobne bakterijske vrste te je za njihovo istraživanje potrebna posebna oprema za postizanje anaerobnih uvjeta kako bi se istraživanje moglo adekvatno provesti te kako bi daljnja *in vitro* istraživanja mogla ići u tom smjeru.

Poznavajući ograničenja, u našoj smo studiji odabrali korištenje prozirne aerobne vrste bakterije *Staphylococcus* kako bismo isključili potencijalne učinke same svjetlosti određene valne duljine (crvene ili plave) i ispitali učinak novog fotosenzitivnog sredstva riboflavina. Slično prethodno spomenutim crno pigmentiranim bakterijama, eliminacija *C. albicans* korištenjem plavog svjetla pokazala se vrlo učinkovitom, vjerojatno zbog prisutnosti unutarstaničnih porfirina i flavina (114,115). Koliko je nama poznato, u literaturi nema prijavljenih učinaka na gljivu *C. albicans* ukoliko se koristi samo crveno svjetlo.

Fotosenzibilizirajuće sredstvo nakon aplikacije apsorbira se i veže za dijelove stanice. Važno je znati da je potrebno različito vrijeme za vezivanje molekula fotosenzibilizirajućeg sredstva, a tu najveći utjecaj ima stanična stijenka mikroorganizama koja otežava apsorpciju sredstva unutar stanice. Wiench i suradnici su tako izvijestili da zbog veličine stanica *Candide* i prisutnosti stanične stijenke, vrijeme inkubacije fotosenzibilizatora ima utjecaj na učinkovitost PDT-a te je predloženo vrijeme od 7-10 minuta kao najučinkovitije razdoblje (146). Unatoč tim nalazima, primjena i razdoblje inkubacije fotosenzibilizirajuće otopine u usnoj šupljini je otežana, što zbog protokom sline kroz sulkus, što zbog potrebe za dugotrajnim radom kliničara. Zbog navedenog, ovo vrijeme se u kliničkoj praksi čini nepraktičnim i teško je provedivo. Dosadašnji ispitivani protokoli koriste vrijeme od 60 sekundi te je ono odabrano za našu studiju. Zanimljivo bi bilo istražiti *in vivo* utjecaj vremena na učinak PDT-a te odabrati najpovoljniji.

U ovoj studiji ispitivan je riboflavin kao inovativni fotosenzibilizirajući agens aktiviran plavim svjetlom diodnog lasera valne duljine 445 nm te je uspoređen s često korištenim protokolom upotrebe metilenskog modrila, kao fotosenzibilizirajućeg agensa aktiviranog svjetlom crvenog diodnog lasera valne duljine 660 nm. Riboflavin (vitamin B2) je vitamin prirodno prisutan u hrani, karakterističan po svojoj žutoj boji i tome što ne uzrokuje ozbiljnu promjenu boje zuba

ili okolnog tkiva, za razliku od toluidina ili metilenskog modrila, te se stoga može koristiti u estetskoj zoni (136).

Za željeni učinak fotosenzibilizirajućeg sredstva nakon apsorpcije svjetlosti određene valne duljine od iznimne je važnosti sposobnost stvaranja kisikovih radikala (reakcija tip II i reaktivnih kisikovih vrsta (reakcija tipa II). Povećanje razina ROS-a koji nastaju kao rezultat obasjavanja riboflavina korištenjem spektra plave svjetlosti s maksimalnom apsorpcijskom valnom duljinom od ~450 nm, pokazalo se da je 200% viša u usporedbi s drugim fotosenzibilizirajućim agensima žute boje aktiviranim istim izvorom plave svjetlosti (147).

U isto vrijeme, razine ROS riboflavina pet puta su niže od onih toluidinskog modrila (0,51 naspram 2,70 ROS/ $\mu$ M) (148). Iako je u studiji Bärenfallera i suradnici zaključeno da je antimikrobni učinak riboflavina u kombinaciji s plavim svjetlom inferioran učinku toluidinskog plavog aktiviranog crvenim svjetlom, rezultati se ne mogu usporediti s rezultatima naše studije zbog upotrebe različitih vrsta bakterija (113). Studija Bärenfallera i suradnici je isto tako provedena na mikroorganizmima u planktonskom obliku, a ne na površinama implantata, a izvor svjetlosti je LED lampa za polimerizaciju koja daje manju maksimalnu gustoću snage i energije po  $\text{cm}^2$  nego lasersko svjetlo.

Koncentracija riboflavina korištena u studiji odabrana je na temelju koncentracije korištene u prethodno spomenutoj studiji Bärenfallera i suradnici i studiji Katalinića i suradnici U daljnjim istraživanjima mogao bi se ispitati učinak različitih koncentracija koje mogu biti adekvatnije. U ovoj studiji uočeno je da da boja riboflavina ima slabu topljivost te se brzo taloži, zbog toga prije upotrebe mora biti dobro protresena. Katalinić i suradnici u svojoj studij navode da bi korištenje E101a (riboflavin-5'-fosfata) koji je bolje topljiv u vodi moglo biti rješenje ovom problemu (118).

Leelanarathiwat i suradnici testirali su flavin mononukleotid (FMN), koji je važan kofaktor riboflavina sa sličnom kemijskom formulom, u kojoj je primarna hidroksi skupina pretvorena u dihidrogen fosfatni ester. FMN je testiran kao PS za dekontaminaciju *S. aureusa* na diskovima pjeskarenim i kiselinom tretiranim titanom, aktiviranim plavim LED svjetlom velike snage (FotoSan® BLUE LAD, CMS Dental APS, Kopenhagen, Danska) s valnim duljinama u rasponu od 450-470 nm. Oni su uspoređeni sa skupinom u kojoj je kao sustav za dezinfekciju korišteno metilensko modrilo aktivirano crvenim svjetlom i nisu uočene razlike između dva PDT sustava (149). Iako kao izvor svjetlosti nije korišten diodni laser s puno većom gustoćom

snage (LED svjetlost 3,7–4 W/cm<sup>2</sup> naspram diodnog lasera 124,34 W/cm<sup>2</sup>), kao u ovom istraživanju, rezultati studije bili su skladu s rezultatima prikazanog istraživanja.

Studiju koja je koristila iste vrste bakterija i gljivica te sa sličnim protokolom dezinfekcije diodnim laserom riboflavin–445 nm proveli su Katalinic i suradnici. Njihovi rezultati bili su slični onima iz ovog istraživanja na dentalnim implantatima, ali rezultate treba oprezno uspoređivati zbog razlika u ispitivanoj površini (dentinski tubulusi i površina implantata), kao i zbog razlike u dostupnosti mjesta dezinfekcije (korijenski kanal zuba u odnosu na navoje titanskog implantata) (118).

Za razliku od rijetko ispitivane uporabe riboflavina, za koju postoji samo nekoliko studija, postoje brojne studije koje koriste metilensko modriilo i aktivaciju crvenim svjetlom, a one pokazuju pozitivne antimikrobne rezultate za *in vivo* i *in vitro* liječenje periimplantitisa. Iako je često u fotodinamskoj terapiji korišteno metilensko modriilo kao fotosenzibilno sredstvo, ono pokazuje određene nedostatke. Osim prethodno spomenutog plavog obojenja okolnog tkiva koje je najuočljivije tijekom primijene, i vrlo se teško uklanja, metilensko modriilo pokazuje negativan citotoksični učinak na fibroblaste (bilo inaktivirano ili aktivirano izvorom svjetlosti); usprkos tome, njegov citotoksični učinak mnogo je manji od onog 2% CHX (150).

Antimikrobni učinak metilenskog modrila, kao fotosenzibilizatora, na *C. albicans* dokazan je u raznim studijama (151,152). U ovom istraživanju potvrđen je antimikrobni učinak pri usporedbi s negativnom kontrolnom skupinom koja je ostavljena bez dezinfekcijskih protokola, a i rezultati prikazuju da je učinak istraživanog svjetla od 445 nm u kombinaciji s riboflavinom sličan dekontaminacijskom učinku metilenskog modrila u kombinaciji sa svjetlom od 660 nm. Nekoliko je studija potvrdilo antibakterijsko djelovanje metilensko modriilo na biofilmove *S. aureusa* pomoću fotoaktivacije crvenim laserom (153,154). Istraživanja su također pokazala da produljena primjena PDT-a u kombinaciji s metilenskim modrilom, uz tretman od 1 do 5 minuta, može dovesti do značajnog smanjenja prisutnosti biofilma (155). Tijekom kliničkog rada mogućnost dugotrajnije primjene dugotrajnih PDT-a je upitna jer ovisi o broju tretiranih implantata kod jednog pacijenta i broju mjesta na kojim se pojavljuju periimplantatni defekti mjesta oko implantata, također utrošeno vrijeme ovisi o pacijentovu strpljenu i raspoloživosti medicinskog osoblja. Treba napomenuti da su svi istraživani učinci postignuti nakon jednog tretmana od 60 s, što sugerira da bi ponavljanje tretmana moglo dati dodatne pozitivne rezultate.

U sistematskom pregledu dotadašnjih istraživanja Alasqaha i suradnici sve uključene *in vitro* PDT studije, unatoč korištenju različitih bakterija, površina implantata, fotosenzibilizatora i

valnih duljina, pokazale su značajno smanjenje broja bakterija. U preglednom radu autori su također zaključili da PDT ne može poremetiti i ukloniti strukturu biofilma na površinama dentalnih implantata, ali može smanjiti vitalnost bakterija, budući da je dodatna SEM analiza u svim studijama pokazala prisutnost bakterija na površini titana, bez obzira na korišteni tretman dezinfekcije (156). U ovoj studiji, kao i drugim studijama, SEM analizom je dokazana prisutnost bakterija na površini titana, bez obzira na primijenjeni tretman dezinfekcije. Stoga se može podržati zaključak da bi PDT mogao igrati ključnu ulogu u smanjenju bakterijskog opterećenja oko dentalnih implantata samo kao dodatna tehnika dezinfekcije površine koja nadopunjuje mehanički debridman (157).

Konačno, rezultati ovog *in vitro* istraživanja imaju određena ograničenja i možda se neće u potpunosti prenijeti ili primijeniti na *in vivo* uvjete. Čimbenici okoliša unutar usne šupljine i unutar samog periimplantatnog defekta, poput ograničene dostupnosti, pogodnih uvjeta za nakupljanje plaka, salivacije, kao i vrlo važnog djelovanja imunološkog sustava, ne mogu se utvrditi ni u potpunosti simulirati korištenjem *in vitro* istraživanja. Ipak i unatoč ograničenjima ovog *in vitro* istraživanja, dobiveni rezultati mogu potaknuti daljnja istraživanja *in vitro* i *in vivo* učinaka novih dezinfekcijskih terapija korištenjem riboflavina i plavog svjetla valne duljine 445 nm.

## **6. ZAKLJUČAK**

Protokol dezinfekcije površine implantata diodnim laserom valne duljine 445nm i otopine 0,1% riboflavina usporediv je s postojećim protokolima dezinfekcije površine implantata klorheksidinom i diodnim laserom valne duljine 660 nm i 0,1% otopinom metilenskog modrila. Vodeći se rezultatima dobivenim ovom studijom, svi ispitani protokoli dezinfekcije površine dentalnih implantat mogu se primjenjivati samo kao dodatak klasičnom mehaničkom debridmanu instrumentima jer nijedan od protokola ne može samostalno uništiti sve mikrororganizme na površini dentalnih implantata.



## **7. LITERATURA**

1. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981;10(6):387–416.
2. Wada M, Mameno T, Otsuki M, Kani M, Tsujioka Y, Ikebe K. Prevalence and risk indicators for peri-implant diseases: A literature review. *Jpn Dent Sci Rev.* 2021;57(1):78–84.
3. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* 2018;45(20):1–8.
4. Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8):282–285.
5. Mellado-Valero A, Buitrago-Vera P, Solá-Ruiz MF, Ferrer-García JC. Decontamination of dental implant surface in peri-implantitis treatment: a literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18(6):869-876.
6. Schwarz F, Sahm N, Iglhaut G, Becker J. Impact of the method of surface debridement and decontamination on the clinical outcome following combined surgical therapy of peri-implantitis: a randomized controlled clinical study. *J Clin Periodontol.* 2011;38(3):276–284.
7. Ntrouka V, Hoogenkamp M, Zaura E, van der Weijden F. The effect of chemotherapeutic agents on titanium-adherent biofilms. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(11):1227–1234.
8. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2008;35(1):286–291.
9. Heitz-Mayfield LJA. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8):292–304.
10. Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. Prevalence of peri-implantitis related to severity of the disease with different degrees of bone loss. *J Periodontol.* 2010;81(2):231–238.
11. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 1998;17(1):63–76.

12. Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol.* 2002;29(3):197-212
13. Sanz M, Chapple IL, Working Group 4 of the VIII European Workshop on Periodontology. Clinical research on peri-implant diseases: consensus report of Working Group 4. *J Clin Periodontol.* 2012;39(12):202–206.
14. Jepsen S, Berglundh T, Genco R, Aass AM, Demirel K, Derks J, et al. Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol.* 2015;42(16):152-157.
15. Derks J, Schaller D, Håkansson J, Wennström JL, Tomasi C, Berglundh T. Effectiveness of Implant Therapy Analyzed in a Swedish Population: Prevalence of Peri-implantitis. *J Dent Res.* 2016;95(1):43–49.
16. Dalago HR, Schuldt Filho G, Rodrigues MAP, Renvert S, Bianchini MA. Risk indicators for Peri-implantitis. A cross-sectional study with 916 implants. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(2):144-150.
17. Rokn A, Aslroosta H, Akbari S, Najafi H, Zayeri F, Hashemi K. Prevalence of peri-implantitis in patients not participating in well-designed supportive periodontal treatments: a cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(3):314-319.
18. French D, Grandin HM, Ofec R. Retrospective cohort study of 4,591 dental implants: Analysis of risk indicators for bone loss and prevalence of peri-implant mucositis and peri-implantitis. *J Periodontol.* 2019;90(7):691-700.
19. Renvert S, Lindahl C, Persson GR. Occurrence of cases with peri-implant mucositis or peri-implantitis in a 21–26 years follow-up study. *J Clin Periodontol.* 2018;45(2) 233-240.
20. Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, et al. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol.* 2018;45(20):286–291.

21. Kühl S, Zürcher S, Zitzmann NU, Filippi A, Payer M, Dagassan-Berndt D. Detection of peri-implant bone defects with different radiographic techniques - a human cadaver study. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(5):529-534.
22. Steiger-Ronay V, Krcmaric Z, Schmidlin PR, Sahrman P, Wiedemeier DB, Benic GI. Assessment of peri-implant defects at titanium and zirconium dioxide implants by means of periapical radiographs and cone beam computed tomography: An in-vitro examination. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29(12):1195-1201.
23. Ritter L, Elger MC, Rothamel D, Fienitz T, Zinser M, Schwarz F, et al. Accuracy of peri-implant bone evaluation using cone beam CT, digital intra-oral radiographs and histology. *Dentomaxillofacial Radiology.* 2014;43(6):2013-2018.
24. Tallarico M, Canullo L, Caneva M, Özcan M. Microbial colonization at the implant-abutment interface and its possible influence on periimplantitis: A systematic review and meta-analysis. Vol. 61, *Journal of Prosthodontic Research.* 2017;61(3):233-241.
25. Maney P, Schiavo JH, Mascarenhas F, Dragonas P. Risk factors for peri-implantitis. *Curr Oral Health Rep* 2020;7(3):1–5
26. Canullo L, Radovanović S, Delibasic B, Blaya JA, Penarrocha D, Rakic M. The predictive value of microbiological findings on teeth, internal and external implant portions in clinical decision making. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(5):512-519.
27. Al Jaboobi A, Caraiane A, Balaban DP, Grigorian M, Badea V. The study of association between beta-3 defensins and bacteria species in peri-implantitis. *Archives of the Balkan Medical Union.* 2017; 52(1):22-27.
28. Flanagan D. *Enterococcus faecalis* and dental implants. *Journal of Oral Implantology.* 2017;43(1):8-11.
29. Fürst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18(4):501-508.
30. Salvi GE, Fürst MM, Lang NP, Persson GR. One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(3):242-248.

31. Tillander J, Hagberg K, Hagberg L, Brånemark R. Osseointegrated titanium implants for limb prostheses attachments: Infectious complications. *Clin Orthop Relat Res.* 2010;468(10):2781-2788.
32. Cai Z, Li Y, Wang Y, Chen S, Jiang S, Ge H, et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy with antiseptics on *Staphylococcus aureus* biofilm on titanium surface. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;25(1):382-388.
33. Alrabiah M, Alshagroud RS, Alsahhaf A, Almojaly SA, Abduljabbar T, Javed F. Presence of *Candida* species in the subgingival oral biofilm of patients with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2019;21(4):781-785.
34. Urzua B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona S, et al. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Med Mycol.* 2008;46(8):783-793.
35. De-La-Torre J, Quindós G, Marcos-Arias C, Marichalar-Mendia X, Gainza ML, Eraso E, et al. Oral *Candida* colonization in patients with chronic periodontitis. Is there any relationship? *Rev Iberoam Micol.* 2018;35(3):134-139.
36. Rakic M, Galindo-Moreno P, Monje A, Radovanovic S, Wang HL, Cochran D, et al. How frequent does peri-implantitis occur? A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2018;22(4):1805-1816.
37. Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017;62(1):1–12.
38. Robitaille N, Reed DN, Walters JD, Kumar PS. Periodontal and peri-implant diseases: identical or fraternal infections? *Mol Oral Microbiol.* 2016;31(4):285-301.
39. Dreyer H, Grischke J, Tiede C, Eberhard J, Schweitzer A, Toikkanen SE, et al. Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: A systematic review. *J Periodontal Res.* 2018;53(5):657-681.
40. Veitz-Keenan A, Keenan JR. Implant outcomes poorer in patients with history of periodontal disease. *Evid Based Dent.* 2017;18(1):5.

41. Ferreira SD, Martins CC, Amaral SA, Vieira TR, Albuquerque BN, Cota LOM, et al. Periodontitis as a risk factor for peri-implantitis: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Dent.* 2018;79(1):1-10.
42. Kumar PS, Dabdoub SM, Hegde R, Ranganathan N, Mariotti A. Site-level risk predictors of peri-implantitis: A retrospective analysis. *J Clin Periodontol.* 2018;45(5):597-604.
43. Sung CE, Chiang CY, Chiu HC, Shieh YS, Lin FG, Fu E. Periodontal status of tooth adjacent to implant with peri-implantitis. *J Dent.* 2018;70:104-109.
44. Pimentel SP, Shiota R, Cirano FR, Casarin RCV, Pecorari VGA, Casati MZ, et al. Occurrence of peri-implant diseases and risk indicators at the patient and implant levels: A multilevel cross-sectional study. *J Periodontol.* 2018;89(9):1091-1100.
45. Wang X, Qin L, Lei C, Li Y, Li D. Effects of uncontrolled periodontitis on marginal bone alterations around implants: A case-control study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2017;19(4):654-662.
46. Cortellini S, Favril C, De Nutte M, Teughels W, Quirynen M. Patient compliance as a risk factor for the outcome of implant treatment. *Periodontol 2000.* 2019;81(1):209-225.
47. Ramanauskaite A, Tervonen T. The Efficacy of Supportive Peri-Implant Therapies in Preventing Peri-Implantitis and Implant Loss: a Systematic Review of the Literature. *J Oral Maxillofac Res.* 2016;7(3):12.
48. Giovannoli JL, Rocuzzo M, Albouy JP, Duffau F, Lin GH, Serino G. Local risk indicators - Consensus report of working group 2. *Int Dent J.* 2019;69(2):7-11.
49. Isler SC, Uraz A, Kaymaz O, Cetiner D. An evaluation of the relationship between peri-implant soft tissue biotype and the severity of peri-implantitis: A cross-sectional study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2019;34(1):187-196.
50. Fiorellini J, Luan K, Chang YC, Kim D, Sarmiento H. Peri-implant Mucosal Tissues and Inflammation: Clinical Implications. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2019;34(1):25-33.

51. Passoni BB, Dalago HR, Schuldt Filho G, Oliveira De Souza JG, Benfatti CAM, Magini R de S, et al. Does the number of implants have any relation with peri-implant disease?. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(5):403-408.
52. Canullo L, Tallarico M, Radovanovic S, Delibasic B, Covani U, Rakic M. Distinguishing predictive profiles for patient-based risk assessment and diagnostics of plaque induced, surgically and prosthetically triggered peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(10):1243-1250.
53. Hashim D, Cionca N, Courvoisier DS, Mombelli A. A systematic review of the clinical survival of zirconia implants. *Clin Oral Investig.* 2016;20(7):1403-1417.
54. Roehling S, Astasov-Frauenhoffer M, Hauser-Gerspach I, Braissant O, Woelfler H, Waltimo T, et al. In Vitro Biofilm Formation on Titanium and Zirconia Implant Surfaces. *J Periodontol.* 2017;88(3):298-307.
55. Liñares A, Grize L, Muñoz F, Pippenger BE, Dard M, Domken O, et al. Histological assessment of hard and soft tissues surrounding a novel ceramic implant: A pilot study in the minipig. *J Clin Periodontol.* 2016;43(6):538-546.
56. Degidi M, Artese L, Scarano A, Perrotti V, Gehrke P, Piattelli A. Inflammatory Infiltrate, Microvessel Density, Nitric Oxide Synthase Expression, Vascular Endothelial Growth Factor Expression, and Proliferative Activity in Peri-Implant Soft Tissues Around Titanium and Zirconium Oxide Healing Caps. *J Periodontol.* 2006;77(1):73-80.
57. Armitage GC, Xenoudi P. Post-treatment supportive care for the natural dentition and dental implants. *Vol. 71, Periodontology 2000.* 2016;71(1):164-184.
58. Saaby M, Karring E, Schou S, Isidor F. Factors influencing severity of periimplantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(1):7-12.
59. Quaranta A, Lim ZW, Tang J, Perrotti V, Leichter J. The Impact of Residual Subgingival Cement on Biological Complications Around Dental Implants: A Systematic Review. *Implant Dent.* 2017;26(3):465-474.

60. Staubli N, Walter C, Schmidt JC, Weiger R, Zitzmann NU. Excess cement and the risk of peri-implant disease – a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(10):1278-1290.
61. Katafuchi M, Weinstein BF, Leroux BG, Chen YW, Daubert DM. Restoration contour is a risk indicator for peri-implantitis: A cross-sectional radiographic analysis. *J Clin Periodontol.* 2018;45(2):225-232.
62. Hsu YT, Lin GH, Wang HL. Effects of Platform-Switching on Peri-implant Soft and Hard Tissue Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2017;32(1):9-24.
63. de Medeiros FCFL, Kudo GAH, Leme BG, Saraiva PP, Verri FR, Honório HM, et al. Dental implants in patients with osteoporosis: a systematic review with meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2018;47(4):480-491.
64. Papi P, Letizia C, Pilloni A, Petramala L, Saracino V, Rosella D, et al. Peri-implant diseases and metabolic syndrome components: A systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(4):866-875.
65. Akram Z, Abduljabbar T, Abu Hassan MI, Javed F, Vohra F. Cytokine profile in chronic periodontitis patients with and without obesity: A systematic review and meta-analysis. *Dis Markers.* 2016;1(1):1-12.
66. Alkudhairy F, Vohra F, Al-Kheraif AA, Akram Z. Comparison of clinical and radiographic peri-implant parameters among obese and non-obese patients: A 5-year study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2018;20(5):756-762.
67. Johnson GK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol 2000.* 2007;44(1):178-194.
68. Trombelli L, Farina R, Minenna L, Toselli L, Simonelli A. Regenerative Periodontal Treatment with the Single Flap Approach in Smokers and Nonsmokers. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2018;38(4):59–67.
69. Geisinger ML, Geurs NC, Ogdon D, Reddy MS. Commentary: Targeting Underlying Biologic Mechanisms in Selecting Adjunctive Therapies to Improve Periodontal Treatment in Smokers: A Commentary. *J Periodontol.* 2017;88(8):703–710.



70. Lalla E, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: A tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(12):738-748.
71. Monje A, Catena A, Borgnakke WS. Association between diabetes mellitus/hyperglycaemia and peri-implant diseases: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2017;44(6):636-648.
72. Turri A, Rossetti P, Canullo L, Grusovin M, Dahlin C. Prevalence of Peri-implantitis in Medically Compromised Patients and Smokers: A Systematic Review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2016;31(1):111-118.
73. Suárez-López del Amo F, Yu SH, Wang HL. Non-Surgical Therapy for Peri-Implant Diseases: a Systematic Review. *J Oral Maxillofac Res*. 2016;7(3):13.
74. Louropoulou A, Slot DE, Van der Weijden FA. Titanium surface alterations following the use of different mechanical instruments: A systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(6):643-658.
75. Gustumhaugen E, Lönn-Stensrud J, Scheie AA, Lyngstadaas SP, Ekfeldt A, Taxt-Lamolle S. Effect of chemical and mechanical debridement techniques on bacterial regrowth on rough titanium surfaces: An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 2014;25(6):707-713.
76. Al-Hashedi AA, Laurenti M, Benhamou V, Tamimi F. Decontamination of titanium implants using physical methods. *Clin Oral Implants Res*. 2017;28(8):1013-1021.
77. Unursaikhan O, Lee JS, Cha JK, Park JC, Jung UW, Kim CS, et al. Comparative evaluation of roughness of titanium surfaces treated by different hygiene instruments. *J Periodontal Implant Sci*. 2012;42(3):88-94.
78. Schou S, Berglundh T, Lang NP. Surgical treatment of peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004;19 (1):140–149.
79. Muthukuru M, Zainvi A, Esplugues EO, Flemmig TF. Non-surgical therapy for the management of peri-implantitis: A systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(6):77-83.
80. Gunsolley JC. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent*. 2010;38(1):6-10.

81. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(5):436-450.
82. Hayek RRA, Araújo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada AM, et al. Comparative Study Between the Effects of Photodynamic Therapy and Conventional Therapy on Microbial Reduction in Ligature-Induced Peri-Implantitis in Dogs. *J Periodontol.* 2005;76(8):1275-1281.
83. Lang NP, Berglundh T, Heitz-Mayfield LJ a, Pjetursson BE, Salvi GE, Sanz M. Group 2 Consensus Statement Consensus Statements and Recommended Clinical Procedures Regarding Esthetics in Implant Dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19(1):150-154
84. Serino G, Turri A. Outcome of surgical treatment of peri-implantitis: Results from a 2-year prospective clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(11):1214-1220
85. Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammächer C, Stein JM. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review. *Head Face Med.* 2014;10(1):34
86. Sahrman P, Attin T, Schmidlin PR. Regenerative Treatment of Peri-Implantitis Using Bone Substitutes and Membrane: A Systematic Review. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2011;13(1):46-57.
87. Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, et al. Antimicrobial photodynamic therapy--what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol.* 2018;44(5):571-589.
88. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(5):3217-3266.
89. Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(3):932-940.
90. Gunaydin G, Gedik ME, Ayan S. Photodynamic Therapy-Current Limitations and Novel Approaches. *Front Chem.* 2021;9(1):691-697

91. Goldman L, Gray JA, Goldman J, Goldman B, Meyer R. Effect of laser beam impacts on teeth. *J Am Dent Assoc.* 1965;70(1):601-606.
92. Verma S, Chaudhari P, Maheshwari S, Singh R. Laser in dentistry: An innovative tool in modern dental practice. *Natl J Maxillofac Surg.* 2012;3(2):124-32.
93. Coluzzi DJ. Fundamentals of dental lasers: Science and instruments. *Dent Clin North Am.* 2004;48(4):751-770.
94. Fenelon T, Bakr MM, Walsh LJ, George R. Effects of Lasers and Their Delivery Characteristics on Machined and Micro-Roughened Titanium Dental Implant Surfaces. *Bioengineering (Basel).* 2020;7(3):93.
95. Parker S, Cronshaw M, Anagnostaki E, Mylona V, Lynch E, Grootveld M. Current concepts of laser–oral tissue interaction. *Dent J (Basel).* 2020;8(3):61.
96. Dederich DN. Laser/tissue interaction. *Alpha Omegan.* 1991;84(4):33–36.
97. Sulieman M. An overview of the use of lasers in general dental practice: 2. Laser wavelengths, soft and hard tissue clinical applications. *Dent Update.* 2005;32(5):286–288.
98. Weiner GP. Laser dentistry practice management. *Dent Clin North Am.* 2004;48(4):1105-1126.
99. Sulewski JG. Historical survey of laser dentistry. *Dent Clin North Am.* 2000;44(4):717–752.
100. Stabholz A, Zeltser R, Sela M, Peretz B, Moshonov J, Ziskind D, et al. The use of lasers in dentistry: principles of operation and clinical applications. *Compend Contin Educ Dent.* 2003;24(12):935–948.
101. Fujiyama K, Deguchi T, Murakami T, Fujii A, Kushima K, Takano-Yamamoto T. Clinical effect of CO<sub>2</sub> laser in reducing pain in orthodontics. *Angle Orthod.* 2008;78(2):299–303.
102. Fornaini C, Rocca JP, Bertrand MF, Merigo E, Nammour S, Vescovi P. Nd:YAG and diode laser in the surgical management of soft tissues related to orthodontic treatment. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(5):381–92.

103. Harashima T, Kinoshita JI, Kimura Y, Brugnera A, Zanin F, Pecora JD, et al. Morphological comparative study on ablation of dental hard tissues at cavity preparation by Er:YAG and Er,Cr:YSGG lasers. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(1):52-55.
104. Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA. Clinical application of erbium:YAG laser in periodontology. *J Int Acad Periodontol.* 2008;10(1):22–30.
105. Theodoro LH, Marcantonio RAC, Wainwright M, Garcia VG. LASER in periodontal treatment: is it an effective treatment or science fiction? *Braz Oral Res.* 2021;24(1);35.
106. Azma E, Safavi N. Diode laser application in soft tissue oral surgery. *J Lasers Med Sci.* 2013;4(4):206-211.
107. Parker S. Laser regulation and safety in general dental practice. *Br Dent J.* 2007;202(9):523-532.
108. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. *J Photochem Photobiol B.* 2005;79(2):159-170.
109. Coluzzi DJ. An overview of laser wavelengths used in dentistry. *Dent Clin North Am.* 2000;44(4):753-65.
110. Enwemeka CS. Antimicrobial blue light: An emerging alternative to antibiotics. 2013;31(11):509-511.
111. Kim S, Kim J, Lim W, Jeon S, Kim O, Koh JT, et al. In vitro bactericidal effects of 625, 525, and 425 nm wavelength (red, green, and blue) light-emitting diode irradiation. *Photomed Laser Surg.* 2013;31(11):554–562.
112. Bumah V V., Masson-Meyers DS, Cashin SE, Enwemeka CS. Wavelength and bacterial density influence the bactericidal effect of blue light on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Photomed Laser Surg.* 201;31(11):547-553.
113. Bärenfaller V, Clausen C, Sculean A, Eick S. Effect of photoactivated disinfection using light in the blue spectrum. *J Photochem Photobiol B.* 2016;158(1):252–257.
114. Durantini EN. New insights into the antimicrobial blue light inactivation of *Candida albicans*. *Virulence.* 2016;7(5):493-494.

115. Zhang Y, Zhu Y, Chen J, Wang Y, Sherwood ME, Murray CK, et al. Antimicrobial blue light inactivation of *Candida albicans*: In vitro and in vivo studies. *Virulence*. 2016;7(5):536-545.
116. Hmud R, Kahler WA, Walsh LJ. Temperature changes accompanying near infrared diode laser endodontic treatment of wet canals. *J Endod*. 2010;36(5):908–911.
117. Pirnat S, Lukac M, Ihan A. Study of the direct bactericidal effect of Nd:YAG and diode laser parameters used in endodontics on pigmented and nonpigmented bacteria. *Lasers Med Sci*. 2011;26(6):755-761.
118. Katalinić I, Budimir A, Bošnjak Z, Jakovljević S, Anić I. The photo-activated and photo-thermal effect of the 445/970 nm diode laser on the mixed biofilm inside root canals of human teeth in vitro: A pilot study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;26(1):277-283.
119. Lee MT, Bird PS, Walsh LJ. Photo-activated disinfection of the root canal: A new role for lasers in endodontics. *Aust Endod J*. 2004;30(3):93-98.
120. Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med*. 2007;39(10):782-787.
121. Yang B, Chen Y, Shi J. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chem Rev*. 2019;119(8):4881–4985.
122. Kou J, Dou D, Yang L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget*. 2017;8(46):81591-81603.
123. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*. 2018;106(1):1098-1107.
124. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu XH, Childs CJH, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004;1(1):27-42
125. Kessel D. More adventures in photodynamic therapy. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):15188-15193.
126. Rkein AM, Ozog DM. Photodynamic therapy. *Dermatol Clin*. 2014;32(3):415–425.

127. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.* 2016;473(4):347-364.
128. Gursoy H, Ozcakil-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: A literature review. *Clin Oral Investig.* 2013;17(4):1113-1125.
129. Abdelaziz Ali IA, Neelakantan P. Light activated disinfection in root canal treatment-a focused review. *Dent J (Basel).* 2018;6(3):31.
130. Foster TH, Murant RS, Bryant RG, Knox RS, Gibson SL, Hilf R. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiat Res.* 1991;126(3):296-303.
131. Chilakamarthi U, Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem Rec.* 2017;17(8):775-802.
132. Daicoviciu D, Filip AG, Ion RM, Clichici S, Decea N, Muresan A. Oxidative photodamage induced by photodynamic therapy with methoxyphenyl porphyrin derivatives in tumour-bearing rats. *Folia Biol (Praha).* 2011;57(1):12-19.
133. Romiszewska A, Nowak-Stępniewska A. [Photodynamic reaction and oxidative stress - influence of the photodynamic effect on the activity antioxidant enzymes]. *Postepy Biochem.* 2014;60(3):355-364.
134. Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol.* 1991;54(5):659.
135. Baptista MS, Cadet J, Di Mascio P, Ghogare AA, Greer A, Hamblin MR, et al. Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochem Photobiol.* 2017;93(4):912–919.
136. Nielsen HK, Garcia J, Væth M, Schlafer S. Comparison of Riboflavin and Toluidine Blue O as Photosensitizers for Photoactivated Disinfection on Endodontic and Periodontal Pathogens In Vitro. *PLoS One.* 2015;10(10):1-11.
137. Reichelt J, Winter J, Meister J, Frentzen M, Kraus D. A novel blue light laser system for surgical applications in dentistry: evaluation of specific laser-tissue interactions in monolayer cultures. *Clin Oral Investig.* 2017;21(4):985-994.

138. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(2):68-81.
139. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, Wang CY, et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontol 2000.* 2009;51(1):109-140.
140. Deppe H, Ahrens M, Behr A V., Marr C, Sculean A, Mela P, et al. Thermal effect of a 445 nm diode laser on five dental implant systems: an in vitro study. *Sci Rep.* 2021;11(1):1-11.
141. Malmqvist S, Liljeborg A, Qadri T, Johannsen G, Johannsen A. Using 445 nm and 970 nm Lasers on Dental Implants-An In Vitro Study on Change in Temperature and Surface Alterations. *Materials (Basel).* 2019;12(23):3934.
142. Krishnamoorthy G, Narayana A, Balkrishnan D. Chlorhexidine for the Treatment of Peri-Implantitis: Is it a Benison? *J Long Term Eff Med Implants.* 2022;32(1):19-23.
143. Widodo A, Spratt D, Sousa V, Petrie A, Donos N. An in vitro study on disinfection of titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(10):1227-1232.
144. Ryu HS, Kim YI, Lim BS, Lim YJ, Ahn SJ. Chlorhexidine Uptake and Release From Modified Titanium Surfaces and Its Antimicrobial Activity. *J Periodontol.* 2015;86(11):1268-1275.
145. Smalley JW, Silver J, Marsh PJ, Birss AJ. The periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* binds iron protoporphyrin IX in the mu-oxo dimeric form: an oxidative buffer and possible pathogenic mechanism. *Biochem J.* 1998;331(1):681–685.
146. Wiench R, Nowicka J, Pajaczkowska M, Kuropka P, Skaba D, Kruczek-Kazibudzka A, et al. Influence of incubation time on ortho-toluidine blue mediated antimicrobial photodynamic therapy directed against selected *Candida* strains—An in vitro study. *Int J Mol Sci.* 2021;22(20):10971.
147. Bouillaguet S, Owen B, Wataha JC, Campo MA, Lange N, Schrenzel J. Intracellular reactive oxygen species in monocytes generated by photosensitive chromophores activated with blue light. *Dent Mater.* 2008;24(8):1070–1076.

148. Bouillaguet S, Wataha JC, Zapata O, Campo M, Lange N, Schrenzel J. Production of reactive oxygen species from photosensitizers activated with visible light sources available in dental offices. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(4):519-525.
149. Leelanarathiwat K, Katsuta Y, Katsuragi H, Watanabe F. Antibacterial activity of blue high-power light-emitting diode-activated flavin mononucleotide against *Staphylococcus aureus* biofilm on a sandblasted and etched surface. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;31(1):101855.
150. Gambarini G, Plotino G, Grande NM, Nocca G, Lupi A, Giardina B, et al. In vitro evaluation of the cytotoxicity of FotoSan™ light-activated disinfection on human fibroblasts. *Med Sci Monit.* 2011;17(3):21-25.
151. Carvalho GG, Felipe MP, Costa MS. The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Candida albicans* is dependent on medium conditions. *J Microbiol.* 2009;47(5):619-623.
152. Azizi A, Amirzadeh Z, Rezai M, Lawaf S, Rahimi A. Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on *Candida albicans*. *J Photochem Photobiol B.* 2016;158(1):267-273.
153. Pereira CA, Romeiro RL, Costa ACBP, MacHado AKS, Junqueira JC, Jorge AOC. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: An in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2011;26(3):341-348.
154. Rosa LP, Da Silva FC, Nader SA, Meira GA, Viana MS. Antimicrobial photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* biofilms in bone specimens using methylene blue, toluidine blue ortho and malachite green: An in vitro study. *Arch Oral Biol.* 2015;60(5):675-680.
155. Giannelli M, Landini G, Materassi F, Chellini F, Antonelli A, Tani A, et al. Effects of photodynamic laser and violet-blue led irradiation on *Staphylococcus aureus* biofilm and *Escherichia coli* lipopolysaccharide attached to moderately rough titanium surface: in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2017;32(4):857-864.



156. Alasqah MN. Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy on dental implant surfaces: A systematic review of in vitro studies. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;25(1):349–353.
157. Vohra F, Al-Rifaiy MQ, Lillywhite G, Abu Hassan MI, Javed F. Efficacy of mechanical debridement with adjunct antimicrobial photodynamic therapy for the management of peri-implant diseases: A systematic review. *Photochem Photobiol Sci.* 2014;13(8):1160-1168.

## **8. ŽIVOTOPIS**

Luka Morelato rođen je 11. studenoga 1988. u Koprju. Osnovnu školu je završio u Poreču te opću gimnaziju pri Gimnaziji i strukovnoj školi Jurja Dobrile u Pazinu. Diplomirao je na Studiju dentalne medicine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci 2012. godine. Tijekom studija nagrađivan je za najboljeg studenta (07./08., 08./09., 10./11.) te za najboljeg diplomiranog doktora dentalne medicine generacije 11./12.. Nakon rada u privatnoj praksi Dentalne poliklinike Morelato (2012. - 2016.) zapošljava se na radnom mjestu asistenta na Katedri za oralnu kirurgiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, od 2021. godine Fakulteta za dentalnu medicinu Sveučilišta u Rijeci. Doktorski studij upisuje 2016. godine na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Specijalizaciju iz oralne kirurgije započinje 2018. godine i završava 2021. godine. Temu doktorske disertacije obranio je 2022. godine kada je i nagrađen je za najboljeg mladog znanstvenika Fakulteta dentalne medicine Sveučilišta u Rijeci. Tijekom rada kontinuirano se educira na raznim međunarodnim i domaćim znanstvenim i stručnim skupovima iz područja interesa. Autor je i koautor više stručnih članaka i znanstvenih radova objavljenih u stranim i domaćim stručnim časopisima. Redovito sudjeluje na tečajevima stručnog usavršavanja u zemlji i inozemstvu, povremeno i kao predavač.

**Popis objavljenih radova:**

1. Kovac Z, Cabov T, Blaskovic M, Morelato L. Regeneration of Horizontal Bone Defect in Edentulous Maxilla Using the Allogenic Bone-Plate Shell Technique and a Composite Bone Graft-A Case Report. *Medicina (Kaunas)*. 2023;59(3):494. (Q2)
2. Gašparović B, Morelato L, Lenac K, Mauša G, Zhurov A, Katić V. Comparing Direct Measurements and Three-Dimensional (3D) Scans for Evaluating Facial Soft Tissue. *Sensors (Basel)*. 2023;23(5):2412. (Q2)
3. Katalinić I, Smojver I, Morelato L, Vuletić M, Budimir A, Gabrić D. Evaluation of the Photoactivation Effect of 3% Hydrogen Peroxide in the Disinfection of Dental Implants: In Vitro Study. *Biomedicines*. 2023;11(4):1002. (Q2)
4. Zulijani A, Žigante M, Morelato L, Perić B, Milardović A. Oligomicrodontia in a Pediatric Cancer Survivor after Chemotherapy: A Case Report. *Healthcare (Basel)*. 2022;10(8):1521. (Q2)
5. Morelato L, Budimir A, Smojver I, Katalinić I, Vuletić M, Ajanović M, Gabrić D. A Novel Technique for Disinfection Treatment of Contaminated Dental Implant Surface Using 0.1% Riboflavin and 445 nm Diode Laser—An In Vitro Study. *Bioengineering*. 2022; 9(7):308. (Q2), (\*rad proizašao iz doktorskog rada).
6. Zigante M, Pavlic A, Morelato L, Vandevska-Radunovic V, Spalj S. Presence and Maturation Dynamics of Mandibular Third Molars and Their Influence on Late Mandibular Incisor Crowding: A Longitudinal Study. *Int J Environ Res Public Health*. 202;18(19):10070. (Q1)
7. Morelato L, Smojver I, Seiwerth S, Gabrić D. Extremely Rare Intraoral Presentation of Localized Amyloidosis. *Case Rep Dent*. 2021;2021(1):5541320. (Q3)