

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
SMER: KLINIČKA MEDICINA



ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI I MEHANIČKIH KARAKTERISTIKA POLIMERA ZA BAZU ZUBNE PROTEZE

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Doc. dr Tatjana Puškar
Prof. dr Dragiša Vilotić

Kandidat: Potran Michal

Novi Sad, 2015. godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	dr Michal Potran
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Tatjana Puškar, docent dr Dragiša Vilotić, redovni profesor
Naslov rada: NR	Ispitivanje biokompatibilnosti i mehaničkih karakteristika polimera za bazu zubne proteze
Jezik publikacije: JP	srpski
Jezik izvoda: JI	srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2015.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Medicinski fakultet, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja: 7, strana: 64, slika: 21, tabela 23, referenci:134.
Naučna oblast: NO	Stomatološke nauke
Naučna disciplina: ND	Stomatološki materijali
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Biokompatibilni materijali; Dentalni materijali; Polimetilmetakrilat; Ispitivanje materijala; Parcijalne mobilne zubne proteze
UDK	616.314-089.28-77
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, Republika Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>U uvodnom delu doktorske disertacije opisuje se kompleksnost problematike korišćenja polimera za bazu zubne proteze, sa osvrtom na njihove opšte osobine, stepen biokompatibilnosti i njihove mehaničke karakteristike. Detaljno je opisana problematika ispitivanja stomatoloških materijala i napravljeno je poređenje i korelacija između in vitro i in vivo načina ispitivanja biokompatibilnosti. Drugi deo obuhvata ispitivanje čvrstoće polimera za bazu zubne proteze i analizu uticaja osobina materijala u odnosu na biološku sredinu u kojoj obavljaju svoju funkciju, i u odnosu na sile kojima su tokom funkcije materijali izloženi. Cilj doktorske disertacije je utvrđivanje stepena biokompatibilnosti i mehaničkih karakteristika toplopolimerizujućih, hladnopolimerizujućih i termoplastičnih akrilata za bazu zubne proteze.</p> <p>Istraživanje je obuhvatilo 3 komercijalna materijala iz grupe akrilata, koji se razlikuju po hemijskom sastavu i načinu polimerizacije. Ispitivanje biokompatibilnosti rađeno je u in vitro i in vivo uslovima. Ispitivanje na ćelijskim kulturama obuhvatalo je dve ćelijske linije (MRC 5 i L929) sa dva načina kontakta između ćelija i materijala (direktan, indirektan) i dva načina određivanja biološkog ishoda (MTT test, Agar difuzioni test). Istraživanje urađeno in vivo obuhvatalo je test subkutane implantacije, na animalnom modelu pacova, i test iritacije oralne sluzokože na animalnom modelu hrčka. Oba testa rađena su u skladu sa standardom ISO 10993. Cilj in vivo istraživanja bio je ispitivanje reakcije tkiva na implantirani materijal, računajući i završnu integraciju ili dezintegraciju implantiranog materijala.</p>

	<p>Prednost in vivo istraživanja nalazi se u analizi uticaja materijala na sterilno živo tkivo, uz praćenje imunološke reakcije, kao dopuna prethodnom istraživanju na ćelijskim kulturama. Dopunski deo in vivo ispitivanja biokompatibilnosti određen je prema kliničkoj upotrebi ispitivanih materijala, zbog čega je odabran test oralne iritacije sluzokože. Sluzokoža bukalne kesice sirijskog hrčka sastoji se od pločasto slojvitog epitela sa orožavanjem, što je predstavljao dobar model za ispitivanje polimera za bazu zubne proteze, pošto zubna proteza naleže na sluzokožu nepca i rezidualnog alveolarnog grebena koja takođe orožava. Drugi deo disertacije obuhvatao je ispitivanje mehaničkih karakteristika, pri čemu su urađeni test zatezne čvrstoće, test savojne čvrstoće, test čvrstoće loma i mikrotvrdoće, uz dopunsku analizu pratećih parametara.</p> <p>Rezultati ispitivanja biokompatibilnosti pokazali su da su testovi biokompatibilnosti osetljivi na upražnjeni metodološki postupak. Ispitivanjem na ćelijskim kulturama nisu utvrđene značajne razlike u citotoksičnosti između topopolimerizujućih, hladnopolimerizujućih i termoplastičnih akrilata. Takođe, rezultati su se razlikovali u odnosu na tip ćelijske kulture i način provere biološkog ishoda, što se slaže sa prethodnim navodima o kompleksnoj problematici njihovog međusobnog poređenja. Ispitivanjem biokompatibilnosti subkutanom implantacijom praćen je inflamatorni odgovor tkiva u vremenskom intervalu od 90 dana. Reakcija organizma na implantirani materijal posmatrana je kroz ćelijske i tkivne parametre, u skladu sa ISO 10993. Dodatno je urađena i analiza hrapavosti implantiranih materijala. Histološkom analizom utvrđena je razlika u inflamatornom odgovoru u odnosu na korišćeni materijal, kao i prema vremenskom intervalu implantacije. Test oralne iritacije sluzokože nije se pokazao kao dovoljno senzitivna za ispitivanje ovih vrsta materijala. Ispitivanjem mehaničkih karakteristika utvrđene su razlike između topopolimerizujućih, hladnopolimerizujućih i termoplastičnih akrilata. Najveći stepen čvrstoće utvrđen je kod topopolimerizujućih akrilata dok je najveća konzistentnost rezultata bila u grupi termoplastičnih akrilata.</p> <p>Prezentovano istraživanje predstavlja prvu detaljnu analizu biokompatibilnosti i mehaničkih karakteristika polimera za bazu zubne proteze.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	27.03.2015
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: dr Dubravka Marković, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Siniša Mirković, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Janko Hodolič, redovni profesor, Fakultet tehničkih nauka, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Đorđe Vukelić, docent, Fakultet tehničkih nauka, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Bojana Milekić, docent, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p>
---	--

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF MEDICINE

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph. D. Thesis
Author: AU	dr Michal Potran
Mentor: MN	Dr.Sc. Tatjana Puskar, assistant professor Dr.Sc. Dragisa Vilotic, full professor
Title: TI	The investigation of biocompatibility and mechanical properties of denture base resins
Language of text: LT	serbian
Language of abstract: LA	english / serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	Number of chapters: 7, pages: 64, figures: 21, tables 23, references:134.
Scientific field SF	Dentistry
Scientific discipline SD	Dental materials
Subject, Key words SKW	Biocompatible Materials; Dental Materials; Polymethyl Methacrylate; Materials Testing; Denture, Partial, Removable
UC	616.314-089.28-77
Holding data: HD	Library of Medical Faculty, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, Republic of Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<p>The introduction describes the complexity of use of denture base materials, with regard to their general characteristics, biocompatibility and mechanical properties. Issues related to the testing of dental materials is described in detail and comparison is made between in vitro and in vivo methods of biocompatibility testing. The second part further covers the determination of strength of previously used materials, in relation to biological environment in which their function is conducted and in relation to the influence of masticatory forces which can contribute to their mechanical failure. The aim of the presented research was to assess the degree of biocompatibility and mechanical properties of cold curing, hot curing and thermoformed denture base materials.</p> <p>The research included three denture base materials, which differed according to their chemical composition and polymerization protocols. The biocompatibility testing was carried out in in vitro and in vivo conditions. The in vitro experiments covered two different cell lines (MRC 5 human lung fibroblasts and L929 mouse fibroblasts) with two types of contact (direct, indirect) and two different types of quantification of biological outcome (MTT assay and Agar overlay test). The in vivo assessment of biocompatibility covered the subcutaneous implantation test, on the animal model of Wistar rat, and oral mucosa irritation test, on the animal model of sirian hamster. Both tests were conducted according to the ISO 10993. The aim of the in vivo investigation was to evaluate tissue reactions to the implanted materials, including the final integration or disintegration of the tested materials.</p>

The advantage of in vivo investigation included the possibility of monitoring the materials influence on living tissues, with the analysis of immunological response as an addition to the previously conducted research on cell cultures. The supplemental part of in vivo investigation was chosen according to the clinical use of the tested materials, which included the oral mucosa irritation test. The mucosa of hamster buccal pouch consists of stratified squamous epithelium, which is considered to be an adequate replacement for the human denture supporting tissues, which also consist of the same type of epithelium.

The second part of thesis includes the determination of mechanical properties of denture base materials. It consists of four types of tests: tensile strength test, bending strength test, fracture toughness test and microhardness tests, followed by the analysis of corresponding parameters.

The results of the biocompatibility tests showed that the biological outcome of the applied method is highly depended on the methodological procedure. The investigation conducted in vitro, on two different cell lines, did not show significant difference in cytotoxicity between hot curing, cold curing and thermoformed denture base materials. Also, the results were influenced by the type of cell culture and the evaluation method of biological outcome, which agrees with the previous allegations about the complexity of their mutual comparison. The subcutaneous implantation test covered the inflammatory response in the time period of 90 days. The organism reaction to the implanted material was determined through the cell and tissue parameters of organism response, evaluation of which was conducted according to the ISO 10993. Additionally, the surface roughness of the implanted specimens of materials was also measured. The inflammatory response of the organism was influenced by the type of the implanted material and the time interval of implantation. The oral mucosa irritation test has proven not to be sufficiently sensitive for testing of this type of materials.

Testing of the mechanical properties of denture base materials, revealed the difference between the cold curing, hot curing and thermoformed denture base materials. The highest strength was observed in hot curing materials, while the highest consistency of the results was observed in thermoformed resins.

The presented investigation presents the first detail analysis of the biocompatibility and mechanical properties of the denture base materials, and as such presents a novelty in the field of dental materials characterization.

Accepted on Scientific Board on: AS	27.03.2015
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: Dr.Sc. Dubravka Marković, full professor, Medical faculty, University of Novi Sad</p> <p>member: Dr.Sc. Sinisa Mirkovic, associate professor, Medical faculty, University of Novi Sad</p> <p>member: Dr.Sc. Janko Hodolic, full professor, Faculty of technical sciences, University of Novi Sad</p> <p>member: Dr.Sc. Djordje Vukelic, assistant professor, Faculty of technical sciences, University of Novi Sad</p> <p>member: Dr.Sc. Bojana Milekic, assistant professor, Medical faculty, University of Novi Sad</p>

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Polimeri za bazu zubne proteze- osobine i sastav.....	1
1.1.1 Osobine termoplastičnih akrilata za bazu zubne proteze	4
1.2 Ispitivanje biokompatibilnosti polimera za bazu zubne proteze.....	5
1.2.1 Čelijske kulture	5
1.2.2 Ispitivanje na eksperimentalnim životinjama.....	10
1.3 Ispitivanje mehaničkih karakteristika polimera za bazu zubne proteze	13
1.4 Ciljevi istraživanja	16
2. MATERIJAL I METOD	17
2.1 Ispitivanje citotoksičnosti na ćelijskim kulturama.....	17
2.1.1 Priprema eluata i materijala.....	17
2.1.2 Čelijske linije.....	17
2.1.3 MTT test.....	17
2.1.4 Agar difuzioni test.....	19
2.2 Ispitivanje na eksperimentalnim životinjama	19
2.2.1 Subkutana implantacija	19
2.2.2 Iritacija oralne sluzokože	21
2.3 Ispitivanje mehaničkih karakteristika	22
2.3.1 Priprema i obrada uzorka	22
2.3.2 Protokoli ispitivanja mehaničkih karakteristika.....	24
3. REZULTATI	27
3.1 Ispitivanje na ćelijskim kulturama	27
3.2 Ispitivanje na eksperimentalnim životinjama	28
3.2.1 Test subkutane implantacije	28
3.2.2 Test oralne iritacije sluzokože.....	35
3.3 Ispitivanje mehaničkih karakteristika	36
4. DISKUSIJA	43
4.1 Ispitivanje citotoksičnosti	43

4.2 Test subkutane implantacije.....	46
4.3 Test oralne iritacije sluzokože	50
4.4 Ispitivanje mehaničkih karakteristika	50
5. ZAKLJUČCI	53
6. ZAHVALNICA	54
7. LITERATURA	55

1. UVOD

1.1 Polimeri za bazu zubne proteze- osobine i sastav

Mobilnim zubnim nadoknadama - protezama nadoknađuju se izgubljeni zubi i delovi alveolarnog grebena radi postizanja funkcionalne i estetke rekonstrukcije stomatognatog sistema pacijenta. Pored osnovne funkcije - žvakanja hrane, zubne proteze pružaju potporu okolnim mekim tkivima, učestvuju u formiranju glasova pri govoru, utiču na izgled i samopouzdanje pacijenta, čime se preventivno deluje na opšte zdravstveno stanje i poboljšava kvalitet života (1). Osnovni gradivni materijal koji se koristi kod izrade mobilnih zubnih nadoknada je polimetilmetakrilat (PMMA), koji spada u grupu polimera. Polimeri su prirodne ili veštačke materije koje se sastoje od velikih molekula sačinjenih od povezanih serija ponovljenih jednostavnih monomera, koji se povezuju hemijskom reakcijom polimerizacije. Zavisno od načina polimerizacije, materijali koji se koriste za izradu baze zubne proteze svrstani su u pet grupa: tip 1. Toplopolimerizujući materijali, tip 2. Hladnopolimerizujući materijali, tip 3. Termoplastični materijali, tip 4. Svetlosnopolimerizujući materijali i tip 5. mikrotalasnopolimerizujući materijali (2). Najčešće korišćeni polimeri za bazu zubne proteze su toplo i hladnopolimerizujući akrilati. To su dvokomponentni sistemi, koji se sastoje od praha i tečnosti. Prah predstavlja prepolimerizovani PMMA sa inicijatorom, pigmentima, plastifikatorom i puniocem. Tečnost se sastoji od monomera, inhibitora polimerizacije i po mogućnosti aktivatora i umreživača. Polimetilmetakrilat predstavlja estar metakrilatne kiseline koji nastaje adicijom polimerizacijom iz prvobitnih komponenti. Reakcija počinje mešanjem dve komponente kada dolazi do kvašenja zrna prepolimerizovang PMMA sa tečnim monomerom. Tada dolazi do spajanja pojedinačnih molekula-*mera*, u dugačke lance polimera. Reakcija povezivanja podeljena je u četiri faze koju čine: aktivacija, inicijacija, propagacija, terminacija (3).

Kod toplopolimerizujućih akrilata proces aktivacije počinje sa aplikacijom toplote. Porast temperature na 70°C dovodi do raspadanja inicijatora (benzoi peroksid) na dva dela, svaki sa jednim nesprenim elektronskim parom. Slobodni radikali raspadnutog jedinjenja benzoi peroksida vežu se za lanac metil metakrilata i nastaje kaskadna reakcija, zato što se na drugom kraju lanca ponovo nalazi nespreni elektronski par. Reakcija polimerizacije se brzo odvija i pošto se ne može tačno predvideti njen tok nastaju lanci raličitih dužina. Do zaustavljanja reakcije dolazi kada se spoje krajevi dva lanca sa slobodnim radikalima, što se može desiti odmah ili tek po nastanku dugačkih lanaca (2). Inicijalni deo reakcije mogu da kočé nečistoće koje su u stanju da zaustave polimerizaciju reagujući sa slobodnim radikalima. Dužina lanaca utiče na mehaničke karakteristike akrilata kao i na biokompatibilnost, pa se režimom polimerizacije teži nastanku dužih lanaca polimera. Pošto se dužina lanaca ne može tačno odrediti, zato što se međusobno razlikuju, molekularna svojstva akrilata se izražavaju kao prosečna dužina i prosečna težina (Mg, Mw). Prosečna težina polimernih lanaca iznosi od 10^4 do 10^7 . Lanci sa molekularnom masom ispod 10^5 nepovoljno utiču na fizička svojstva materijala (4).

Struktura PMMA sastoji se od jedinica *mera* povezanih kovalentnom vezom, dok se između lanaca nalaze sekundarne-*Van der Valsove veze*. Sekundarne veze znatno utiču na osobine materijala. Njihova postojanost zavisi od spoljašnjih faktora i objašnjava se pokretljivošću valentnih elektrona koji se nalaze duž svakog lanca polimera. Na višoj temperaturi pokretljivost valentnih elektrona se povećava, pa dolazi do raskidanja starih sekundarnih veza a po hlađenju do nastanka novih, sa drugačijom konfiguracijom postojećih lanaca. Ovo utiče na mehaničke karakteristike materijala pri čemu se čvrstoća i modul elastičnosti sa porastom temperature smanjuju, dok se toplotna ekspanzija povećava. U poređenju sa ostalim materijalima akrilati imaju mali koeficijent toplotne provodljivosti a veliki koeficijent toplotnog širenja, oko $10^{-5}K^{-1}$ (2). Molekularna težina dodatno utiče na porast čvrstoće materijala. Sa porastom molekularne težine nastaju duži lanci koje je teže raskinuti, zbog veće mogućnosti zapetljanja sa ostalim lancima. Porast čvrstoće progresivno se povećava do granice kada zbog jake umreženosti više ne postoji mogućnost cepanja sekundarnih veza. Tada se jačina sekundarnih veza izjednačava sa primarnim kovalentnim vezama, pri čemu bi se cepanjem narušio integritet materijala. Akrilati koji se koriste u stomatologiji sačinjeni su od linearnih lanaca polimera. To ne znači da su lanci pravi, već da imaju mali broj bočnih lanaca. Bočni lanci svojim drugim krajem nisu vezani za polimerni lanac, pa udaljavaju polimerne lance i slabe mehaničke karakteristike, pokazujući svojstva plastifikatora. Dodatno ojačanje materijala postižese dodavanjem umreživača (Etilen glikol dimetakrilat-EGDMA) koji ima dve reaktivne grupe na krajevima i može da povezuje dva polimerna lanca. Umreženi lanci održavaju integritet materijala, što se manifestuje porastom temperature ostakljivanja (T_g), dok bočni lanci udaljavaju primarne lance. Time je njihova međusobna interakcija smanjena, sa sledstvenim smanjenjem T_g . Prema tome, što je lanac duži (polietil metakrilat, polipropil metakarilat) materijal postaje mekši. Reakcija propagacije traje dok se svi reaktivni krajevi ne spoje sa slobodnim radikalom, kada nastaju „mrtvi laci,, (5). U procesu konverzije monomera u polimer, rastom lanaca nastaje klupko polimernih lanaca koje pored toga što ojačava materijal, ima i negativne osobine. Umrežavanjem lanaca neizreagovali monomer ostaje fizički zarobljen unutar materijala i na taj način mu je onemogućeno da učestvuje u daljoj reakciji polimerizacije. Pored toga klupko polimernih lanaca može dovesti do smanjenog kvašenja već postojećih lanaca sa rezidualnim monomerom, uzrokovanog nedostatkom monomera zbog njegove retencije unutar postojećih polimernih lanaca. Rezidualni monomer (RM) odgovoran je za smanjenje biokompatibilnosti i mehaničkih karakteristika materijala, što je dodatno opisano u poglavlju 1.2 i 1.3.

Sledeći parametar bitan za karakterizaciju akrilata predstavlja *temperatura ostakljivanja* (T_g). To je gornja granična vrednost temperature kojoj se materijal može izlagati a da ne dođe do njegove deformacije ($T_g=100.6^{\circ}C$). Na toj temperaturi PMMA naglo prelazi iz čvrstog-staklastog u lako deformabilno-gumeno stanje. Polimerizacija akrilata odigrava se na višim temperaturama ali po njenom završetku, naknadno izlaganje istim temperaturama dovodi do kidanja primarnih lanaca i preraspodele strukture materijala, što dovodi do njegove distorzije. Akrilate ne treba izlagati temperaturama iznad $70^{\circ}C$, koja je znatno ispod T_g materijala, ali zbog mogućeg

oslobađanja unutrašnjih napona takođe može dovesti do deformacije materijala. Pored toplopolimerizujućih, ostale vrste akrilata se takođe aktiviraju toplotom, pri čemu se dodatkom odgovarajućih komponenti (nn-dimetil toluidin) smanjuje temperatura raspadanja inicijatora. Kod hladnopolimerizujućih akrilata prisustvo toluidina smanjuje temperaturu aktivacije na 30°C, pri čemu je aktivator toplota a ne toluidin, često pogrešno shvatanje u stručnoj praksi (4).

Reakcija polimerizacije spada u egzotermne reakcije. U zavisnosti od načina polimerizacije toplota može da ima značajan uticaj na kvalitet materijala, zbog čega je razvijeno više postupaka i sistema radi usmeravanja reakcije polimerizacije. Povišena temperatura pogoduje bržoj reakciji i boljoj konverziji monomera u duže lance polimera. Otežavajući faktor predstavlja temperatura isparavanja monomera koja za PMMA iznosi 100.6°C. Prekoračenje ove temperature dovodi do naglog isparavanja molekula monomera i sledstvene gasne poroznosti materijala (6). Akrilat ima veliki koeficijent toplotne ekspanzije pa sam predstavlja izolator. Pored toga, za kalupljenje akrilata koriste se dentalni gipsevi koj takođe predstavljaju dodatnu izolaciju tokom iskućavanja. Naime, kada temperatura poraste na 70°C nagli raspad inicijatora ubrzaće reakciju polimerizacije, koja je po svojoj prirodi egzotermna i doći će do daljeg porasta temperature. Pošto je kalup proteze okružen gipsom, odvod toplote će biti smanjen i može doći do prokuvavanja proteze (4). Poroznost se obično javlja u debljim delovima proteze, pošto akrilat slabo provodi toplotu, kada u ovim delovima dolazi do povećanja temperature i mogućeg prokuvavanja i isparavanja monomera. Poroznost se javlja i kod neadekvatnog mešanja, poremećaja u odnosu praha i tečnosti (loše kvašenje i dodatna kontrakcija gde je više monomera), i slabog pritiska tokom postupka štopanja tj. postavljanja akrilatnog testa u šupljinu kivete. Reakciju polimerizacije treba usmeriti na taj način da se temperatura zadrži ispod granice isparavanja monomera, a ponovo podići dovoljno visoko da bi se vezao što veći procenat monomera. Kao najbolji način preporučuje se iskućavanje proteze tokom 7 sati na 70°C a nakon toga još jedan sat na 100°C (7).

Tokom reakcije polimerizacije dolazi do kontrakcije materijala usled dva razloga. Prvi je polimerizaciona kontrakcija, dok je drugi toplotna kontrakcija. Pošto polimerizovani lanci metilmetakrilata zauzimaju manje prostora od prvobitnih molekula monomera, reakcija polimerizacije dovodi do kontrakcije materijala. Kontrakcija može da se meri voluminozno, kada iznosi 21%, ili linearno kada iznosi 6% (5). Taj stepen kontrakcije ne odgovara zahtevima stomatološke struke, pa se reakcija polimerizacije mora usmeriti kako bi se stepen kontrakcije smanjio na najmanju moguću meru. To se postiže dodavanjem prepolimerizovanog PMMA u vidu praha, kompresijom akrilata tokom ulaganja u gipsani kalup, ili savremenijim sistemima brizganja materijala pod pritiskom. Na taj način dolazi do smanjenja kontrakcije koja u konvecionalnim sistemima iznosi prihvatljivih 0.5%, dok se kod brizgajućih sistema smanjuje na čak 0%. Hladnopolimerizujućii akrilati omogućavaju veću tačnost pri izradi zubnih nadoknada, jer se zagrevaju na nižu temperaturu, pri kojoj toplotna kontrakcija iznosi 0.26% u odnosu na 0.53% kod toplopolimerizujućih (4). PMMA vremenom apsorbuje vodu iz okoline, koja deluje kao plastifikator. Uticaj vode ogleda se u bržoj difuziji monomera u okolinu, povećanju plastičnosti

materijala kao i u neznatnoj ekspanziji (0.2% linearna ekspanzija) što doprinosi uravnoteženju dimenzija materijala nastalih zbog prethodne kontrakcije (8). Plastifikator može da bude unutrašnji (komonomer) i spoljašnji (voda). Plastifikator deluje na taj način što delimično neutrališe sekundarne veze između molekula, pa se pod dejstvom sile polimerni lanci mogu kretati jedan naspram drugog. Polimeri su viskoelastični materijali i plastičnim poremećajem dolazi do reorganizacije lanaca što smanjuje T_g i tvrdoću materijala.

Prema organizaciji lanaca polimeri poseduju dve faze: amorfnu (neorganizovanu) i kristalinizovanu (organizovanu). Kod većine polimera prisutne su obe faze. Linearni polimeri u koje se ubrajaju i akrilati, podložni su zapetljanju pa je kod njih kristalinizovana faza malo zastupljena. Kristalinizovana faza utiče na povećanje zatezne čvrstoće i smanjenje rastegljivosti t.j povećanje krtosti i temperature ostakljivanja. Kristalinizaciju smanjuju kopolimeri, dugački granasti lanci, nasumično raspoređene supstituentsne grupe i plastifikator. Elastični povratak nastaje u amorfnom delu materijala, što je značajno pošto proteza mora zadržati svoje prvobitne dimenzije kako bi odgovarala stanju u ustima (4).

Funkcija inhibitora polimerizacije je da spreče spontanu polimerizaciju koja se može desiti usled neadekvatnog skladištenja materijala i na taj način da mu produže vek trajanja. Plastifikatori se dodaju radi lakšeg rukovanja sa materijalom i poboljšanja karakteristika materijala u smislu smanjenja krtosti. Neorganski punioci u vidu stakla, aluminijum oksida ili cirkonijum silikata poboljšavaju mehaničke karakteristike, mada se hemijski ne vezuju za materijal pa tokom vremena može doći do njihovog otpuštanja u okolinu i nastanka mikroporoznosti (5).

1.1.1 Osobine termoplastičnih akrilata za bazu zubne proteze

Napredak tehnologije izrade mobilnih zubnih nadoknada razvijao se u smeru unapređenja karakteristika materijala i tehnoloških procesa, sa ciljem smanjenja količine rezidualnog monomera i ubrzanja procesa izrade. Konvencionalan način izrade mobilnih zubnih nadoknada obuhvata komplikovan i vremenski zahtevan laboratorijski postupak. Za bazu proteze najviše se koriste toplo i hladnopolimerizujući akrilati (9). Uvođenje tehnologije termoplastičnog presovanja imalo bi za cilj skraćanje postupka izrade, kao i poboljšanje karakteristika zubne nadoknade (10). Za razliku od ostalih metoda u kojima se materijal pri polimerizaciji baze proteze zagreva, tehnika termoplastičnog presovanja koristi folije prepolimerizovanog PMMA, koji se minimalno zagreva i pod pritiskom vakuma aplikuje na radni model. Akrilatna folija se plastičnom deformacijom prilagođava obliku radnog modela potpornih tkiva. Sa kliničkog aspekta postoji niz prednosti kod korišćenja termoplastične metode u odnosu na klasičan način izrade baze zubne proteze. Definitivna baza proteze može se ranije uvesti u klinički postupak. Već u fazi određivanja međuviličnih odnosa, termoplastičnim putem dobijena baza proteze, može se koristiti kao baza zagrižajne šablone. Tako izrađena šablona intimno naleže na meka tkiva,

čime se postiže bolja retencija, lakše, tačnije i brže određivanja međuviličnih odnosa kao i faza probe postave zuba. Sve prethodno navedeno doprinosi boljem uspehu celokupne protetičke terapije.

Kod primene metode termopresovanja postiže se i značajna ušteda u vremenu u odnosu na klasičan način izrade baze proteze. Zbog potrebe da se količina rezidualnog monomera u gotovoj bazi akrilatne proteze svede na najmanju moguću meru, preporuke za konvencionalni način polimerizacije su polimerizacija na temperaturi od 70 °C u trajanju od 7 sati, a nakon toga jedan sat na temperaturi od 100 °C (7). Za razliku od prethodno navedenog, termoplastičnim presovanjem baza proteze može biti gotova za desetak minuta. Tehnika termoplastičnog presovanja uvedena je u stomatologiju još pre 40 godina, ali interesovanje za nju kratko je trajalo. Jagger je u svom radu 1995 (10) ponovo predstavio mogućnosti ove tehnologije, čime je podigao svest o alternativnim postupcima za pravljenje zubnih proteza i tehnika termoplastičnog presovanja ponovo je postala aktuelna. Danas se ova tehnika koristi za izradu splintova, retencionih ortodontskih aparata, kašika za beljenje zuba, individualnih kašika, baza zagrižajnih šablona i vođica prilikom ugradnje implantata (11-15). Pregledom dostupne literature nisu pronađeni podaci o korišćenju metode termoplastičnog presovanja za izradu baze zubne proteze, osim preporuke proizvođača akrilatnih folija (16). Zbog niza prednosti koje bi metoda termoplastičnog presovanja mogla pružiti u izradi zubnih proteza, postoji potreba za daljem istraživanjem u ovoj oblasti.

1.2 Ispitivanje biokompatibilnosti polimera za bazu zubne proteze

1.2.1 Čelijske kulture

Biokompatibilnost akrilata ispitivana je još od njihovog pronalaska 1940. Akrilati se pored stomatologije koriste i u ortopediji i kozmetici (17). Dokazano je da akrilati mogu imati negativan uticaj na zdravlje pacijenta u vidu iritacije, inflamacije i alergijske reakcije (3). Najčešći simptomi lokalne alergijske reakcije su pečenje u ustima, primarno na nepcu, jeziku, sluzokoži i usnama, koji će se unutar usne duplje manifestovati crvenilom, otokom, vezikulama i ulceracijom (18).

Reakcija polimerizacije dovodi do konverzije pojedinačnih molekula monomera u dugačke lance polimera. Konverzija se ne odvija u potpunosti, čime se formiraju lanci različitih dužina sa zaostalim (rezidualnim) molekulima monomera (2). Pošto rezidualni monomer nije vezan za polimerne lance, vremenom se otpušta u okolinu. To se odigrava procesom difuzije koja je posredovana vodom iz pljuvačke (19). Količina rezidualnog monomera bitno utiče na biokompatibilnost i mehaničke karakteristike akrilata i predmet je istraživanja još od uvođenja akrilata u stomatološku praksu (20). Dozvoljena količina rezidualnog monomera je 2,5 % za akrilate tip 1,3,4,5 i 4.5 % za akrilate tip 2 (2). Povezanost između koncentracije rezidualnog monomera i iritacije oralne sluzokože dokazana je u kliničkim istraživanjima (21,22). Pored toga

zabeleženo je karcinogeno i mutageno dejstvo u in vitro uslovima, ali takav nalaz do sada nije klinički potvrđen (17). Rezidualni monomer je sačinjen od metil metakrilata (MMA) i ima malu akutnu toksičnost. Kod pacova LD₅₀ iznosi 8.4 g/kg, što predstavlja dozu koja dovodi do depresije disanja i zastoja rada srca. On se u serumu hidrolizuje i metaboliše u manje toksične supstance kao što je piruvat. Poluvreme raspada MMA u krvi je 20-40 min (17). Subkutanom implantacijom utvrđeno je da su hladnopolimerizujući akrilati toksičniji od toplopolimerizujućih ali u istraživanju gde su akrilati bili implantirani u alveolarnu kost, nije utvrđena značajna inflamatorna reakcija (23,24,25). Više autora dokazalo je delovanje MMA na kardiovaskularni sistem, inhibiciju peristaltike tankog creva i motiliteta želuca (22,26,27). Powel kaže da je MMA vazodilatator i da na taj način ostvaruje svoj efekat, dok je pojačan rad srca kompenzacija vazodilatacije (28). Za kolon nije dokazan toksični uticaj. Kod pacova koji su udisali paru MMA zabeležene su patogene promene na trahei (29). Posebno su opasni nisko molekularni (tečni) akrilati za kožu i oči, koji na vežnjači mogu izazvati trajno oštećenje (22). Savremena istraživanja dokazala su potencijalnu opasnost od ovih materijala, ali još uvek ne postoji dovoljno in vivo istraživanja posvećenih ovoj problematici. Pošto se akrilati smatraju materijalima niskog rizika, njihova distribucija ne zahteva proveru biokompatibilnosti pre uvođenja na tržište.

Prevalenca neželjenih dejstava kod stomatoloških materijala iznosi 0.1% (30). Od ukupnog broja, 12% vezano je za materijale na bazi smola (31). Najčešće se javljaju lokalne reakcije, ali reakcije mogu biti i sistemske. Materijali koji se uvode na tržište moraju da zadovoljavaju Direktivu 93/42, koja obuhvata stomatološke materijale i protokole ophođenja sa njima (30,32). Dopunu direktive predstavljaju EU standardi (ISO), koji za svaku grupu materijala određuju zahteve i načine provere njihovog kvaliteta. Ispitivanje biokompatibilnosti u stomatologiji obuhvaćeno je sa dva ISO standarda, ISO 7405 (pretklinička istraživanja) i ISO 10993, koji je namenjen za medicinska sredstva, ali obuhvata i stomatološke materijale (33,34). Prednosti standarda predstavljaju reproducibilnost rezultata i mogućnost poređenja sa ostalim istraživanjima, dok se nedostatak odnosi na vremenski zahtevan i u pojedinim slučajevima nedovoljno senzitivnan metodološki pristup. Odgovornost za neškodljivost materijala preuzima proizvođač, koji svojevolejno stavlja deklaraciju da li je proizvod u skladu sa odgovarajućim ISO standardom. Proizvođač je dužan da navede potencijalno opasne sastojke materijala, ali taj deo nije adekvatno regulisan. Pošto tačan sastav materijala predstavlja intelektualnu svojinu proizvođača, sastav se ne navodi u potpunosti, iako neki materijali ili njihovi raspadni produkti predstavljaju opasnost čak i u malim količinama. Posmatrano sa tog aspekta, potrebno je da se proizvođači u buduće obavežu da se uputstva za korisnike dopune svim sastojcima materijala koji mogu biti potencijalno toksični (35).

Pojedinim istraživanjima dokazano je da pljuvačka, bakterije u pljuvački i enzimi u tkivima imaju značajan uticaj na raspadanje zubnih smola i produkciju degradacionih produkata. Raspadni produkti u dodiru sa živim tkivom menjaju svoja svojstva, i postaju izvor potencijalno aktivnih biomolekula kao što su antigeni, faktori rasta ili agensi koji modifikuju genom (36). Biodegradacijom akrilata dolazi do otpuštanja sledećih sastojaka: rezidualnog monomera, benzoil

peroksida, nn-dimetil toluidina (akcelerator), di butil ftalata (plastifikator), etilen glikola dimetakrilata (EGDMA), hidrohinona i njihovih degradacionih produkata kao što su formaldehid, metakrilatna kiselina, benzoična kiselina, fenil benzoat (37). Monomer MMA pokazuje neposrednu toksičnost za ćelije putem oksidativnog stresa, dok su benzoil peroxid i ftalati (plastifikator) najodgovorniji za biodegradaciju. Postoji mali broj kliničkih istraživanja o raspadnim produktima PMMA. Istraživanjem Grahama dokazano je da se raspadni produkti više otpuštaju u in vivo uslovima (38). Rezidualni monomer je u pljuvački najviše prisutan tokom prvih 24 sata, ali se kontinuirano otpušta i njegovo prisustvo se može zabeležiti i posle pet godina (39). Baker je dokazao da se tokom prve nedelje pljuvački može detektovati 45 μg/ml RM i 180 μg/ml u pljuvačnom filmu ispod proteze (40). Koncentracija od 10 μg/ml smatra se kritičnom dozom. Većina ćelija inkubirana pri ovoj koncentraciji tokom samo 30 min, razvila je patološke promene (41).

Polimeri se u vodi razlažu na dva načina, hidrolizom i enzimskim reakcijama (enzimi pljuvačke). Proces razlaganja počinje difuzijom vode u polimer, koja razvlači polimerne lance i oslobađaju se monomeri. Dosadašnja istraživanja zabeležila su različite vrednosti raspadnih produkata, koje su značajno zavisile od eksperimentalnih uslova. Istraživanja urađena in vitro zabeležila su prisustvo manje raspadnih produkata od istraživanja in vivo. Razlog tome je što se u in vitro uslovima kao rastvarač koristila voda, koja rastvara akrilate dvadeset puta slabije od prirodne pljuvačke (42). Dodatno, istraživanje Grahama navodi da se raspadni produkti pojačano otpuštaju tokom mastikacije (38). U zavisnosti od koncentracije, uticaj raspadnih produkata na mikroorganizme usne duplje može biti stimulativan i inhibitoran. Raspadni produkti PMMA stimulišu rast gljivica, posebno MMA, ftalat i umreživač. Razmnožavanju gljivica pogoduje prostor između tvrde baze i mekog lajnera što je i klinički potvrđeno, dok visoke koncentracije MMA, plastifikatora i nn-dimetil toluidina deluju baktericidno (43,44). EGDMA pogoduje razmnožavanju bakterija *Streptococcus sobrinus* i *Lactobacillus acidophilus* (45).

Najzastupljenija metoda ispitivanja biokompatibilnosti su in vitro testovi. Osmišljeni su sa ciljem simulacije i predviđanja bioloških reakcija na ispitivani material. Ispitivanje citotoksičnosti akrilata vršeno je na više načina. Poređenje je prevashodno rađeno prema načinu polimerizacije, sa akcentom na ispitivanje uticaja rezidualnog monomera (46,47). Štetno dejstvo akrilata potiče od rezidualnog monomera, aditiva i ostalih raspadnih produkata, od kojih najveći uticaj ima formaldehid kao dokazano kancerogena materija (47,48). Formaldehid može nastati u procesu oksidacije metilmetakrilata i raspadanjem površnog sloja kiseonik-metilmetakrilat. Pošto nastaje na površini akrilata koja je bila izložena kiseoniku iz vazduha, za njegovo uklanjanje neophodna je dodatna površinska obrada i poliranje materijala (49).

Ispitivanja toksičnosti akrilata većinom su rađena in vitro, na ćelijskim kulturama epitela (hrčka, humanih epitelnih ćelija) i fibroblasta (L929, BALB, 2T2, humani fibroblasti) (46,48,50,51). Ćelijske kulture predstavljaju prvi korak u određivanju biokompatibilnosti materijala, jer pružaju pouzdane informacije u okviru strogo kontrolisanih uslova rada, relativno

su jednostavne za izvođenje, a očitavanje rezultata je lako porediti sa definisanim standardima. Termin citotoksičnost označava kaskadu molekularnih mehanizama koji utiču na makromolekularnu sintezu ćelijskih komponenti, prouzrokujući ćelijsko, funkcionalno i strukturalno oštećenje. Citotoksičnost je kao pojavu teško okarakterisati, zato što postoji bezbroj načina kojim dovode do ćelijske smrti. Razumevanje ovog kompleksnog procesa zavisi od sposobnosti ćelijskih proteina da pomognu ili povećaju ćelijski opstanak i genetske predispozicije ćelija da aktiviraju određene načine ćelijske smrti (52).

Metode ispitivanja citotoksičnosti mogu se prema načinu delovanja podeliti na tri dela: 1. Uticaj na biološki sistem 2. Način kontakta između ćelija i materijala 3. Biološki ishod upražnjenog metoda. Biološki sistem može se sastojati od jednoslojnog i trodimenzionalnog modela ćelija. Jednoslojni model sačinjavaju primarne i permanentne ćelijske kulture. Prednost primarnih ćelijskih kultura nalazi se u senzitivnosti i vernoj reprodukciji živog sistema. Pošto se ćelije uzimaju sa živog organizma, nedostatak predstavlja mnoštvo faktora koji utiču na krajnji ishod a čiji je uticaj teško predvideti (53). Permanentne ćelije se karakterišu velikom reproducibilnošću i lakšim poređenjem rezultata, zbog čega su svrstane u ISO standard (54). Trodimenzionalnu kulturu sačinjavaju od humanih fibroblasta i keratinocita prvi je napravio Schmalz (55). Smatra se da je to pravac budućeg razvoja testova biokompatibilnosti, jer smanjuje potrebu za ispitivanjima na životinjama i pruža bolji uvid u biološki ishod od jednoslojnih ćelija. Poseban značaj kod citoloških istraživanja u stomatologiji imaju fibroblasti. Fibroblasti se najviše koriste zbog njihove sposobnosti formiranja kolagenih vlakana i visoke adherence za okolne strukture (56). Traumatski kontakt baze proteze sa potpornim tkivima može dovesti do ulceracije sluzokože, kada fibroblasti dolaze u kontakt sa bazom proteze, što dodatno povećava njihov klinički značaj u in vitro istraživanjima.

Kontakt između materijala i ćelija može se ostvariti direktno, indirektno i preko eluata. Način kontakta je bitan za tumačenje biološkog ishoda. Dokazano je da isti biološki sistem sa različitim načinom kontakta, dovodi do drugačijeg biološkog ishoda (57). Ostvarenje kontakta između materijala i ćelija zavisi od adherence ćelija kao i površinskog napona materijala (31). Direktni kontakt omogućava neposredno delovanje materijala na ćelijsku kulturu, preko tankog sloja pomoću koga se dodiruju. Kod indirektnog kontakta i eluata, interakcija se odvija sa svih strana ćelija, čime se smanjuje se broj faktora koji utiču na krajnji biološki ishod. To doprinosi boljoj kvantifikaciji rezultata i lakšoj korelaciji sa ostalim istraživanjima. Veći citopatogeni uticaj direktnog kontakta proističe iz mehaničkog uticaja kao i zbog neposrednog delovanja otpuštajućih supstanci. Kod eluata reagensi intereaguju sa medijumom, što dovodi do razblaženja i smanjene citotoksičnosti (58,59). Trodimenzionalni model epitela sa fibroblastima predstavlja sledeći korak u in vitro ispitivanjima, gde se toksični uticaj materijala može usmeriti samo na površni sloj epitela, dok su fibroblasti zaštićeni keratinocitima. Na taj način se in vitro uslovi ispitivanja približavaju in vivo uslovima, uz bolje kontrolisane uslove rada. Međutim, ovaj metod je još uvek u eksperimentalnoj fazi i nije u široj upotrebi.

Biološki ishod citotoksičnosti materijala procenjuje se na više načina. Vijabilnost ćelija određuje se morfološkom procenom (dezintegracija jedra, membrane), brojanjem ćelija i dodatnim biohemijskim testovima (MTT, XTT, H-timidin) (35,48). Ćelijska smrt nastaje na dva načina, apoptozom ili nekrozom. Apoptoza predstavlja fiziološki oblik dezintegracije ćelija. In vivo se ove ćelije fagocituju uz izostanak inflamacije, dok in vitro otiču, bubre i dolazi do njihove razgradnje. Apoptoza održava homeostazu tkiva, dok nekroza predstavlja patološki oblik ćelijske smrti i dovodi do inflamatorne reakcije i zarastanja ožiljkom. Osnovni razlog poremećaja njihovog međusobnog odnosa je nedostatak ATP-a, uz predominaciju nekroze (59). Pored morfološke procene, dodatni metod određivanja biološkog ishoda predstavlja brojanje ćelija. Oštećene ćelije imaju smanjen metabolizam i proliferaciju, što će uticati na konačan broj ćelija u ćelijskoj kulturi, što će se otkriti brojčanom razlikom.

Biohemijski testovi koji se koriste za ispitivanje citotoksičnosti obuhvataju MTT, H-timidin, XTT i "Agar overlej" test. Najzastupljeniji su MTT i H-timidin test. MTT je baziran na kvantifikaciji enzimske aktivnosti mitohondrijalne sukcinit dehidrogenaze (SDH). Ovim testom meri se konverzija tetrazolijumske soli koja je rastvoriva u vodi, u nerastvorivi plavi formazan što se detektuje spektrofotometrom. H-timidin test meri broj ćelija koje su u stanju da sintetišu DNK (46). Njime se preko DNK detektuje sinteza proteina u populacijama ćelija koje se dele. MTT detektuje vijabilnost svih ćelija, a ne samo onih što se dele, tako da se dva testa dopunjuju. H-timidin test smatra se osetljivijim, zbog povećane osetljivosti samih ćelija u stanju deobe (57). Dodatni značaj H-timidin testa predstavlja ispitivanje sposobnosti ćelija da se oporavljaju od oštećenja DNK, tako da H-timidin test pokazuje dugoročne posledice oštećenja ćelija. Iako definisan ISO standardom, Agar overlej test se manje koristi za citotoksičnost akrilata (54). Pregledom literature pronađena su samo tri rada koja su koristila ovaj metodološki pristup (60,61,62). Mogući razlog je dokazano otpuštanje formaldehida tokom polimerizacije hladnopolimerizujućih akrilata, dok za ostale grupe akrilata ne postoji konsenzus o njegovom nastanku. Pošto se ova metoda bazira na određivanju oslobađanja rastvora neutralne crvene iz ćelija, formaldehid može dovesti do mumifikacije mrtvih ćelija, bez razgradnje njihove membrane i do očitavanja lažnih rezultata o citotoksičnosti materijala (17).

Većina istraživača se slaže da najveću citotoksičnost poseduje hladnopolimerizujući, dok je najmanja citotoksičnost zabeležena kod toplopolimerizujućih akrilata (18,63,64,65). Prema ISO 20795 za bazu zubne proteze, dozvoljena količina rezidualnog monomera iznosi 4,5 % za hladnopolimerizujuće i 2,5% za ostale grupe akrilate (66). Savremeni materijali imaju daleko niže koncentracije rezidualnog monomera, ali treba imati u vidu ostale aditive koji takođe mogu doprineti toksičnosti materijala. Štetan uticaj svih komponenti materijala ne može se izračunati prostim sabiranjem pojedinačnih štetnih uticaja. Štetan uticaj materijala može biti manji ili veći od prostog zbira pojedinačnih uticaja supstanci koje ulaze u njegov sastav zbog kompleksnih reakcija unutar samog materijala i između materijala i biološkog sistema. Sve prethodno navedeno opravdava potrebu za istraživanjem biokompatibilnosti različitih vrsta akrilata, ali isto tako i komercijalnih materijala koji se danas koriste za izradu zubnih proteza. Prema navodima

proizvođača Biocril C termoplastična folija ima 0% rezidualnog monomera, što predstavlja pogodnost posebno kod pacijenata preosetljivih na akrilatni monomer. Istraživanjem koje je sproveo Hide et al. zabeleženo je 0,4% rezidualnog monomera u Biocril C termoplastičnoj foliji, što je u okvirima dozvoljenog (67). Interesantno je da je monomer ipak u tragovima bio prisutan, što se ne slaže sa navodima proizvođača.

Biokompatibilnost akrilata je aktuelna tema još od njihovog uvođenja u stomatološku praksu. Broj naučnih radova objavljenih na temu citotoksičnosti akrilata je veliki, ali zbog različitih metodoloških pristupa poređenje rezultata istraživanja je otežano, i ne postoji konsenzus naučne zajednice o njihovoj štetnosti. Različite metode korišćene za citotoksična istraživanja dovele su do različitih rezultata i tumačenja njihove biokompatibilnosti, što predstavlja ograničenje in vitro istraživanja i naglašava potrebu da se njihova biokompatibilnost analizira i na kompleksnijim živim sistemima (68,69,70,71). Mali broj objavljenih in vivo istraživanja nije u skladu sa njihovom širokom upotrebom, što zahteva dodatnu pažnju (17).

1.2.2 Ispitivanje na eksperimentalnim životinjama

1.2.2.1 Test subkutane implantacije

Za razliku od ćelijskih kultura, istraživanja koja uključuju eksperimentalne životinje pružaju bolji uvid o biokompatibilnosti materijala, zbog mogućnosti praćenja kompleksnog imunološkog odgovora organizma. Subkutano vezivno tkivo životinja se u literaturi navodi kao jedan od najpouzdanijih metoda za evaluaciju biokompatibilnosti stomatoloških materijala (72). Gradacija biokompatibilnosti može da se vrši na više načina, ali bez obzira na pripadajuću grupu ni jedan materijal se ne može smatrati bioinertnim. Svaki materijal koji se implantira u biološki sistem prouzrokuje odgovor organizma, koji zavisi od sastava materijala, stanja organizma i namenjene funkcije materijala. Biokompatibilnost je dinamički a ne statički procesi i predstavlja svojstvo ne samo materijala, već i interakcije materijala sa okolinom (73).

Test subkutane implantacije definisan je standardom ISO 10993-6 (74). Cilj ovog metoda je da se ispita reakcija tkiva na implantirani materijal, računajući i završnu integraciju ili dezintegraciju implantiranog materijala. Istraživanje Tomas Kalusa iz 1984. testom subkutane implantacije, koje je rađeno na zamorcima, obuhvatalo je ispitivanje dva hladnopolimerizujuća i jednog toplopolimerizujućeg akrilata (23). Rezultati istraživanja su pokazali da hladnopolimerizujući akrilati prouzrokuju jaču inflamatornu reakciju u odnosu na toplopolimerizujuće akrilate, ali je takođe primećena razlika u inflamatornoj reakciji između dva hladnopolimerizujuća akrilata. Kao razlog za to navodi se prisustvo umreživača (EGDMA) koji je doveo do povećanja toksičnosti materijala. Nedostatak studija iz tog vremena ogleda se u tome što nisu postojali standardi za numeričko prikazivanje rezultata. Iz tog razloga postoji potreba za dodatnim istraživanjem u ovoj oblasti i za kvantifikacijom rezultata prema savremenim

standardima. Pretraživanjem naučne literature mogu se pronaći radovi koji su slični radu Tomasa Kalusa, ali ni oni nisu rađeni u skladu sa standardom ISO 10993-6 (75,76,77,78).

Nauka o biomaterijalima još uvek nije otkrila kariku između hemijskog sastava polimera i biološkog ishoda nastalog posle implantacije (79). Na početku implantacije u subkutano vezivno tkivo zapaža se izražena inflamatorna reakcija koja se vremenom smanjuje (23,75-78). Prisustvo inflamacije prouzrokovano je hirurškom traumom i ostalim produktima nastalim interakcijom organizam-materijal. Pretpostavlja se da najveći značaj u odgovoru tkiva na implantirani materijal ima rezidualni monomer. Deo monomera koji je rastvoriv u vodi difunduje u okolinu i doprinosi početnoj inflamaciji u tkivu. Preostali nerastvorivi monomer se biodegradacijom vremenom otpušta, što dovodi do smanjene ali perzistentne inflamacije u tkivima (23).

Kratkoročni odgovor tkiva procenjuje se od 1 do 4 nedelje posle implantacije, dok dugoročna procena zahteva najmanje 12 nedelja implantacije. U skladu sa standardom ISO 10993-6, vrši se semikvantitativna evaluacija rezultata. Histološki preparati nastaju obradom ekscidovanog tkiva oko implantata, dehidratacijom uzoraka, kalupljenjem i bojenjem. Kvantifikacija inflamacije vrši se numerički, prema broju i izraženosti inflamatornih ćelija, nekroze, debljine fibrozne kapsule, proliferacije krvnih sudova i adipoznog tkiva. Sabiranjem pojedinačnih rezultata dobija se konačan broj koji predstavlja ukupnu inflamaciju tkiva, kojoj se prema predodređenoj klasifikaciji daje kvalitativno obeležje (76). Direktni pokazatelj perzistirajuće inflamacije je prisustvo polimorfonukleara na mestu implantacije, zbog životnog veka neutrofila koji van krvi iznosi 7 dana. Od indirektnih pokazatelja beleži se vaskularizacija tkiva, koja se u zahvaćenom području može dodatno manifestovati prisutnom kongestijom. Prelazak akutne u hroničnu infekciju i njen intezitet, određuje se nastankom fibrozne kapsule gde organizam teži da inkapsulacijom smanji toksično delovanje implantiranog uzorka, pa će debljina zida zavisi od toksičnosti materijala. Inflamacija koja je kod pacova izraženija u odnosu na ostale glodare, čini ga pogodnim modelom za određivanje nespecifične toksičnosti (80).

Pored sastava materijala, inflamatorni odgovor tkiva zavisi i od površinske strukture materijala. Akrilati su hidrofobni materijali pa će njihova integracija u vlažnu subkutanu sredinu zavisi od njihovog površinskog napona t.j ugla kvašenja. Dokazano je da smanjenje ugla kvašenja (t.j povećanje kontaktne vlažne površine) doprinosi boljoj adheziji ćelija za materijal i smanjenom inflamatornom odgovoru (78). Pošto se ugao kvašenja teško određuje, koristi se samo kao orijentaciona metoda, dok je površinski napon bolji pokazatelj. Od ostalih karakteristika materijala, Tg ima značajnu ulogu kao pokazatelj površinske molekularne aktivnosti. Molekularna aktivnost se odnosi na fenomen površinske lepljivosti. Pokretljivost površinskih grupa polimera utiče na sposobnost njihove remodelacije prema okolini, što će se manifestovati smanjenjem površinskog napona tokom promene okoline vazduh/voda. Molekularna fleksibilnost može da utiče na odgovor domaćina u vidu mobilizacije ćelija, oslobađanja citokina i formiranja fibrozne kapsule. Polimeri koji imaju više bočnih lanaca generalno imaju nižu Tg od lineranih ili

umreženih polimera. Promenom dužine i strukture bočnih lanaca može se uticati na molekularnu mobilnost bez većih promena unutar samog materijala ili kontaktnog ugla. Takođe, ovaj sistem ne zavisi od aditiva ili umreživača koji može da promeni karakteristike površine i pored toga da negativno utiče na biološki sistem (79). Korelacija Tg-a sa ranim krvnim reakcijama, aktivacijom komplementa i koagulacijom izazvanom krutom površinskom strukturom dokazana je in vitro (81,82). Polimeri sa krutom površinskom strukturom pojačano aktiviraju komplement, što utiče na izraženost inflamatorne reakcije. Pretpostavlja se da rana aktivacija unutrašnjeg faktora koagulacije dovodi do formiranja tanje fibrozne kapsule, koja će biti izraženija kod mekih materijala u odnosu na tvrde. Zbog veće molekularne aktivnosti „mekih polimera,, fibrinski ugrušak se brže formira. To potvrđuje da fibrozna kapsula oko implantata zavisi od adsorbovanih proteina na površini koju prati asocijacija inflamatornih ćelija, čime molekularna mobilnost površine indirektno utiče na osobine okolnog fibroznog tkiva (79).

Test subkutane implantacije se zbog mogućnosti praćenja kompleksnog imunološkog odgovora organizma smatra standardom za ispitivanje biokompatibilnosti stomatoloških materijala. Međutim, prema načinu upotrebe i zbog specifičnosti oralne sredine, ne odgovara u potpunosti zahtevima za primenu stomatoloških materijala. Dopunski testovi definisani su ISO 10993-10 standardom, od kojih se za stomatološke materijale izdvaja test oralne iritacije sluzokože.

1.2.2.2 Test oralne iritacije sluzokože

Test oralne iritacije sluzokože spada u testove upotrebljivosti. Izvodi se na Sirijskim zlatnim hrčcima, implantacijom uzoraka u bukalnu kesicu, dok kontra lateralna kesica služi kao negativna kontrola. Sluzokoža bukalne kesice sastoji se od pločasto slojevitog epitela sa orožavanjem, što predstavlja dobar model za ispitivanje polimera za bazu zubne proteze, pošto zubna proteza naleže na sluzokožu nepca i rezidualnog alveolarnog grebena koja takođe orožava (83, 84). Od kako je ovaj metod prvi put predložen kao način ispitivanja biokompatibilnosti, postojalo je nekoliko varijacija implantacije uzoraka koje se nisu pokazale potpuno uspešnim (85,86). ANSI/ADA je 1971 preporučila Eikovu tehniku (87). Kod ove tehnike perforirani diskovi materijala ušiveni su direktno za sluzokožu bukalne kesice. Kesica se uklanja posle 14 dana posle čega sledi histološka obrada. Problem je bio vezan za način fiksacije i retenciju uzoraka. Trauma izazvana hirurškom intervencijom, otežavala je razlikovanje reakcije na materijal u odnosu na hiruršku traumu tkiva, pored toga retencija uzoraka je bila mala. Dodatne tehnike sastojale su se u implantaciji uzoraka u bukalnu kesicu i zatvaranje kesice šavom (85,86). Prednost ovih tehnika bio je veći stepen retencije i lokalizacija hirurške traume, koja je udaljena od mesta gde se nalazi uzorak. Zatvaranjem bukalne kesice šavom postignuti su bolji rezultati u odnosu na prethodna istraživanja, ali postupak je bio komplikovan i zbog dehiscenije šavova eksperiment je bio ograničen na trajanje od 35 dana. Ovi postupkom retencija je povećana na 97%, što je porast u odnosu na prethodna istraživanja gde je retencija bila 6.4% (dvostruki šav) odnosno 48% (dvostruki šav sa ogrlicom) posle 14 dana (85,86). Manje invazivna tehnika oslanja

se na stavljanje većih pločica materijala u obraz i retenciju sa plastičnom ogrlicom (88). To je poslužilo i kao osnova za standard ISO 10993-10.

Definisanje testa oralne iritacije sluzokože ISO standardom, pružilo je jasne smernice za izvođenje ogleda, mogućnost definisanja dobijenih rezultata i njihovo poređenje sa rezultatima drugih ispitivanja (89). Prema ISO standardu, dužina espozicije sluzokože sa datim materijalom treba da je približna njegovoj kliničkoj upotrebi. Retencija uzoraka vrši se plastičnom ogrlicom, koja se u dato vreme skida, posle čega se bukalna kesica ispira sa fiziološki rastvorom. Jedan dan posle zadnje implantacije životinje se žrtvuju, posle čega sledi histološka obrada. Sluzokoža se maksroskopski i mikroskopski pregleda, beleže se promene epitela, otok, vaskularna kongestija i infiltracija leukocita. Najveća prednost izvođenja eksperimenta koji je definisan ISO standardom nalazi se u načinu kvantifikacije rezultata, što omogućava lakšu analizu i poređenje rezultata sa drugim istraživanjima. Ipak, zbog veoma kompleksne metodologije i teškog rada na hrčcima kao eksperimentalnim životinjama, ovaj test se retko koristi u naučnim istraživanjima.

1.3 Ispitivanje mehaničkih karakteristika polimera za bazu zubne proteze

Materijal od koga se prave mobilne zubne nadoknade mora da ima odgovarajuće mehaničke karakteristike. Materijal treba da ima odgovarajuću čvrstoću, tvrdoću, otpornost na istezanje, savijanje, otpornost na ponavljana opterećenja kao i postojanost. Nakon završene izrade zubna proteza se aplikuje u usnu duplju u vlažnu sredinu sa promenljivim pH (od pH \approx 2 do pH \approx 8) i temperaturnim varijacijama od oko 70°C (90). Pored toga zubne nadoknade izložene su dejstvu mastikatornih sila, koje mogu dovesti do zamora materijala i propadanja zubne nadoknade. Još od 1940 osnovni gradivni materijal za izradu zubnih proteza bio je polimetilmetakrilat (3,37,91). U međuvremenu puno truda uloženo je u unapređenje karakteristika materijala za izradu baze zubnih proteza, utičući na sastav samog materijala kao i na dodatak eksternih suplemenata kako bi se povećala njihova otpornost. Najčešće korišćeni načini ojačanja su impregnacija PMMA sa gumom (butadiene styrene) kao i ojačanje sa različitim vlaknima (92). Dodatna poboljšanja mehaničkih karakteristika mogu se vršiti mikrotalasnim zračenjem kao i dodatkom nanočestica (93,94,95). Stalno unpređenje procesa proizvodnje materijala zahteva proveru konvencionalnih sistema zato što proizvođač nije dužan da navodi punu specifikaciju proizvoda osim osnovnih informacija vezanih za neškodljivost materijala. Detaljno poznavanje karakteristika materijala neophodno je kako bi se odabrao najpogodniji materijal za datu kliničku situaciju.

Prema podacima Hergravesa et al, kod 63% proteza dolazi do frakture u prve tri godine korišćenja (96). Fraktura proteze može nastati usled slabih mehaničkih karakteristika materijala, ali i zbog drugih činioca kao što su povećana resorpcija rezidualnog alveolarnog grebena, nagle promene u debljini materijala (loš dizajn proteze), prisustvo unutrašnjih napona i poroznost materijala (97). Poroznost materijala može nastati oslobađanjem rezidualnog monomera, koji pored toksičnosti koju ima na živi organizam, predstavlja problem i sa mehaničkog aspekta otpornosti materijala od kojih je proteza izrađena.

Čvrstoća je osobina materijala koja pokazuje kolika opterećenja može materijal izdržati. U zavisnosti od toga na koji način se materijal opterećuje postoje: zatezna čvrstoća, pritisna čvrstoća, savojna čvrstoća i uvojna čvrstoća. Analiza osobina materijala vrši se prema njegovoj nameni i uslovima u kojima će materijal da obavlja svoju funkciju. Pošto se PMMA koji se koristi za izradu zubnih proteza karakteriše visokom pritisnom čvrstoćom, većom nego što se može razviti tokom žvakanja, a uvojne sile se kod mobilnih zubnih nadoknada retko javljaju, najbitniji parametri za ispitivanje mehaničkih osobina zubnih proteza predstavljaju zatezna i savojna čvrstoća, uz dopunske testove.

Funkcija mastikatorne i orofacijalne muskulature dovodi do opterećenja proteze sa različitim pravcem dejstva opterećenja na bazu proteze. Fraktura proteze najčešće nastaje na sredini nepca, zato što tokom žvakanja na ovom mestu dolazi do naizmenične smene sila fleksije i ekstenzije. Kao posledica toga proteza se ciklično savija. Ovo je potvrđeno kliničkom studijom Khasawneh et al. koji je utvrdio da 61% fraktura nastaje na sredini nepca, što je kasnije dokazano i in vitro istraživanjima (98,99). Utvrđeno je da u slučaju mandibularne totalne proteze područje pritiska je planarno i sastoji se od kompresivnih sila niskog intenziteta i malog napona smicanja. U isto vreme odgovarajuće polje pritiska kod maksilarne totalne proteze se karakteriše visokim zateznim silama i visokim naponom smicanja. Ovo je od posebnog značaja kada se proizvode proteze od krtih materijala, kao što je PMMA, koji poseduje znatno veću kompresivnu čvrstoću od zatezne, tako da će lom materijala nastati usled istezanja, što čini test zatezne čvrstoće jedan od prvih pri analiziranju čvrstoće materijala (99). Ovo saznanje se često ne koristi u kliničkom radu i izbor materijala se uglavnom vrši prema savojnoj čvrstoći. Test savojne čvrstoće je značajan zato što reprodukuje savijanje proteze. On dobro imitira situaciju koja se dešava u ustima tokom mastikacije. Tokom savijanja proteze, u zavisnosti od pravca delovanja sile, dolazi do kombinacije kompresije materijala na jednoj strani, i istezanja materijala na suprotnoj strani. Zbog manje zatezne čvrstoće, fraktura materijala će nastati na strani koja se isteže, što ovaj test čini dopunom prethodnog, zbog različitog slaganja sila koje više odgovara stanju u ustima. Ispitivanje savojne čvrstoće vrši se testom savijanja, gde se trakasti uzorak materijala slobodno naslanja na dva kugličasta oslonca, dok se pritisak vrši od gore, po sredini uzorka. Raspon oslonaca treba podesiti prema očekivanom rastojanju koje zauzimaju sedla proteze u ustima t.j prema očekivanom mestu oslanjanja koje čine rezidualni alveolarni grebenovi (do 50 mm) (100). Pošto PMMA spada prvenstveno u krte viskoelastične materijale, pored raspona oslonaca bitna je i brzina opterećenja. Ako se sila postepeno povećava krti materijali pokazuju veći stepen plastične deformacije, pa može doći do pogrešnog očitavanja stvarne čvrstoće materijala, zato što lom nastaje posle plastične deformacije. PMMA će pokazati različite vrednosti sile loma u zavisnosti od brzine opterećenja, pokazujući veću čvrstoću tokom naglog porasta sile pritiska. Sporim opterećenjem dolazi do plastične deformacije koja može maskirati stvarnu čvrstoću materijala. Plastična deformacija je nepoželjna kod materijala koji se koriste za izradu zubnih proteza. Plastično deformisana zubna nadoknada ne bi više odgovarala stanju u ustima pacijenta.

Zbog prirode opterećenja kao i svojstva materijala, zatezna i savojna čvrstoća predstavljaju najbitnije parametre koji utiču na otpornost proteze. Zatezna i savojna čvrstoća definisane su standardom ISO 20795, gde je naglašeno da minimalna zatezna čvrstoća akrilata treba da iznosi 60 MPa, kod hladnopolimerizujućih, i 65 MPa kod ostalih grupa akrilata (66). Modul savijanja treba da je najmanje 1500 MPa za hladnopolimerizujuće t.j 2000 MPa za ostale akrilate.

Frakturna linija kod zubnih proteza nastaje na mestu unutrašnjih ili spoljašnjih pukotina, pa tendencija nastanka i širenja pukotina (test čvrstoće loma), pruža dodatna saznanja o mehaničkim karakteristikama materijala korisnim za izbor materijala. Mikropukotine u materijalu mogu da nastanu usled oslobađanja unutrašnjih napona, koji su nastali tokom obrade materijala, neadekvatnog rukovanja sa materijalom, odabirom pogrešnog načina polimerizacije kao i toplotnom kontrakcijom (4). Prisustvo mikropukotina je kod akrilata neizbežno, ali pravilnim rukovanjem sa materijalom treba da se smanji na najmanju moguću meru. Test čvrstoće loma je pogodan za ispitivanje čvrstoće akrilata, jer meri propagaciju veštački napravljene pukotine tokom savijanja. Postupak merenja je sličan određivanju savojne čvrstoće, s tim što se na ovaj način bliže određuje očekivano ponašanje materijala u realnim uslovima, pa predstavlja dopunu testu savijanja (66).

Mikrotvrdoća predstavlja suprotstavljanje materijala nastanku površinskih defekata. Određuje se aplikacijom pritiska preko oštrog vrha prodirućeg instrumenta, koji može da bude različitog oblika, i merenjem dubine i oblika nastalog defekta na površini materijala. Postoji veći broj metoda ispitivanja tvrdoće, ali dominantne su četiri metode: po Brinelu, po Vickersu, po Rokvelu i po Martensu (66, 100). Najviše korišćene metode su po Vickersu i po Rokvelu. Razlikuju se po obliku prodirućeg instrumenta i obliku nastalog defekta na materijalu. Metode po Vickersu i Rokvelu pružaju mogućnostpostepenog povećanja pritiska, što predstavlja prednost u odnosu na metodu po Brinelu. Nedostatak ovih metoda odnosi se na povećan otpor materijala koji se javlja tokom dubljeg prodiranja penetrirajućeg instrumenta. Očitavanje defekta vrši se nakon aplikacije sile, koji može biti poremećen viskoelastičnim povraćajem materijala. Savremeniji način određivanja mikrotvrdoće predstavlja Martensov metod, pošto se očitavanje tvrdoće vrši digitalno, direktnim merenjem prodiranja instrumenta, čime se eliminiše greška elastičnog povraćaja materijala (101).

Određivanje zamora materijala predstavlja najzahtevniji deo ispitivanja mehaničkih karakteristika materijala, ali pruža najverniji prikaz njegovih osobina. Test je zasnovan na činjenici da fraktura materijala nastaje pri manjim intenzitetima opterećenja nego što su definisani prethodno opisanim testovima. Usled cikličnog opterećenja može doći do zamora i frakture materijala. Pacijenti koji nose mobilne zubne nadoknade obave 300.000 žvačnih ciklusa tokom jedne godine sa prosečnim silama od 100 do 250 N (1). Predviđeno vreme korišćenja mobilne zubne nadoknade trebalo bi da bude 5 godina, pa bi simulacija kompletnog cikličnog opterećenja tokom vremenskog perioda od 5 godina zahtevala veliki broj ponavljanja koja se u laboratorijskim uslovima teško izvode. Zbog ubrzanja postupka, u današnje vreme koristi se

predefinisani broj ciklusa ponavljanja (10.000-100.000), posle čega sledi klasičan test savijanja (102,103).

1.4 Ciljevi istraživanja

Cilj istraživanja doktorske disertacije bio je ispitivanje i poređenje biokompatibilnosti i mehaničkih karakteristika toplopolimerizujućeg polimetilmetakrilata, hladnopolimerizujućeg polimetilmetakrilata i polimetilmetakrilata koji se oblikuje termopresovanjem.

Bliži ciljevi istraživanja bili su:

1. Ispitivanje citotoksičnosti različitih grupa akrilata na dve različite ćelijske kulture (L929, MRC5).
2. Ispitivanje stepena iritacije oralne sluzokože različitih grupa akrilata na animalnom modelu sirijskog hrčka.
3. Ispitivanje biokompatibilnosti različitih grupa akrilata na animalnom modelu pacova.
4. Ispitivanje mehaničkih karakteristika različitih grupa akrilata.

Prema navedenim ciljevima istraživanja postavljene su sledeće hipoteze:

1. Postoji statistički značajna razlika u citotoksičnosti između različitih grupa akrilata.
2. Postoji statistički značajna razlika u stepenu iritacije oralne sluzokože između različitih grupa akrilata.
3. Postoji statistički značajna razlika u biokompatibilnosti različitih grupa akrilata na animalnom modelu pacova.
4. Ne postoji statistički značajna razlika u mehaničkim karakteristikama između različitih grupa akrilata.

2. MATERIJAL I METOD

2.1 Ispitivanje citotoksičnosti na ćelijskim kulturama

2.1.1 Priprema eluata i materijala

Ispitivanje citotoksičnosti akrilata vršeno je direktnim kontaktom i pomoću eluata. Ispitivani materijali obuhvatali su hladnopolimerizujući (*Triplex Cold*), toplopolimerizujući (*Triplex Hot*) i termoplastični akrilat (*Biocril C*). *Triplex Cold* je polimerizovan na temperaturi od 40°C, pri pritisku od 3 bara tokom 15 minuta. *Triplex Hot* je polimerizovan na 100°C tokom 45 minuta, dok je folija prepolimerizovanog *Biocril C*, zagrejana i pod pritiskom od 3 bara presovana na gipsani kalup (*Ministar S, Scheu dental, Germany*). Svi materijali pripremljeni su prema uputstvu proizvođača. Uzorci dimenzija 10/2mm, napravljeni su 24 sata pre izvođenja eksperimenta (tabela 1). Ekstrakcija uzoraka vršena je četiri puta u 4ml Dilbekovog modifikovanog rastvora (*[DMEM] Sigma*) bez seruma. Ekstrakcioni periodi iznosili su 3, 5, 7 i 21 dan. Posle svakog perioda, ekstrakti su odstranjeni i epruvete su nanovo napunjene sa svežim rastvorom. Svi ekstrakti su isfiltrirani pre sterilizacije.

2.1.2 Ćelijske linije

Ispitivanje je vršeno na MRC 5 plućnim fibroblastima i L929 mišjim fibroblastima (*American Type Culture Collection CCL10*). Ćelijesu rastle zalepljene za podlogu suda u Dilbekovom modifikovanom rastvoru (*DMEM, Gibco BRL, UK*) sa 4,5g/l glukoze i 10% FCS (*fetal calf serum, NIVNS*). Medijum je sadržao antibiotike: penicilin 100 IJ/ml i streptomycin 100µg/ml. Ćelijske linije su održavane pod standardnim uslovima, na temperaturi od 37°C u atmosferi zasićenoj vlagom sa 5% CO₂. Ćelije su subkultivisane dvaput nedeljno a pojedinačna suspenzija ćelija dobijena je pomoću 0.1% tripsina u EDTA (*Serva, Heidelberg, Germany*). Analize su vršene na ćelijama sa eksponencijalnim rastom. Broj i procenat vijabilnih ćelija je određen pomoću testa isključenja sa tripan plavim (DET) (104). Vijabilnost ćelija korišćenih u studiji iznosila je preko 90%.

2.1.3 MTT test

Inhibicija rasta ćelija ispitivana je pomoću tetrazolijumskog kolorimetrijskog MTT testa (105). Princip metode se zasniva na redukciji tetrazolijumove soli [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid, (MTT)] u plavo obojeni proizvod (formazan), u prisustvu mitohondrijalnog enzima sukcinat dehidrogenaze. Količina nagrađenog formazana direktno je proporcionalna broju vijabilnih ćelija, a apsorbancu se određuje na spektrofotometru (mikročitaču), na dve talasne dužine: test talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm. Vijabilne ćelije posejane su u mikrotitar ploče sa 96 otvora (*Costar, Corning, NY*,

USA), sa optimalnom gustinom od $5 \cdot 10^3$ ćelija po jednom otvoru, kako bi se obezbedio logaritamski rast za svaki period ispitivanja.

Tabela 1. Materijali korišćeni u studiji

Grupa	Oznaka	Proizvođač	Sastav	Polimerizacioni metod
Triplex Cold	COLD	Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenštajn	Prašak: PMMA, dibenzoil peroksid, pigmenti Tečnost: MMA, etilen dimetakrilat, stabilizator	13g : 10 ml Hemijska polimerizacija na 40°C, pritisak 4 bara - 15 min
Triplex Hot	HOT	Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenštajn	Prašak: PMMA, dibenzoil peroksid, pigmenti Tečnost: MMA, etilen dimetakrilat	23g: 10 ml Toplotna polimerizacija na 100°C - 45 min
Biocryl C	BIO	Scheu Dental, Iserlohn Nemačka	polimetilmetakrilat	Prepolimerizovan od strane proizvođača, zagrevanje 90 sek, pritisak 3 bara

Nakon inkubacije ćelija, medijum u kom su se ćelije nalazile je odstranjen i zamenjen sa jednakom količinom eluata (100 μ L). Inkubacija sa eluatom trajala je 48 sati na 37°C/5%CO₂.

Merenje direktne citotoksičnosti vršeno je sejanjem ćelija na podlogu petrijeve šolje. Uzorci materijala postavljeni su na ćelije, posle čega je sledila inkubacija od 24 sata. Dobijanje jednoćelijske suspenzije, nakon završene inkubacije, je vršeno dodavanjem 0,1% rastvora tripsina, nakon čega su ćelije inkubirane 5 minuta na 37 °C. Enzimska reakcija je zaustavljena dodavanjem medijuma, pri čemu komponente seruma vrše inaktivaciju tripsina. Ćelijska suspenzija je zatim centrifugirana 10 minuta na 1500 o/min, a ćelijski talog resuspendovan u svežem medijumu. Nakon toga su određivani broj ćelija i njihova vijabilnost. Vijabilne ćelije su posejane u kvadrilikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora, tako da je u 100 μ l medijuma bilo $5 \cdot 10^3$ ćelija. Ploče sa zasejanim ćelijama ostavljene su u termostatu na 37 °C, sa 5% CO₂ narednih 48 časova.

Rastvor MTT, pripremljen neposredno pre dodavanja, dodat je u sve otvore na ploči u zapremini od 10 μ l /otvoru i inkubacija je nastavljena naredna 3 h (u termostatu na 37 °C, sa 5% CO₂). Po isteku 3h u svaki otvor je dodato po 100 μ l 0,04mol/l HCl u izopropanolu. Apsoorbancija je očitavana odmah po isteku inkubacije na čitaču za mikrotitar ploče (*Multiscan*

MCC340, Labsystems, Finland) na test talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm. Otvori na ploči koji su sadržavali samo medijumi MTT, ali ne i ćelije, služili su kao slepa proba ("blank").

Citotoksičnost je izražena procentom prema formuli:

$$CI = (1 - A_s/A_k) \cdot 100$$

gde je:

A_k-apsorbanca kontrolnih uzoraka

A_s-apsorbanca uzoraka sa ispitivanom supstancom.

2.1.4 Agar difuzioni test

Agar difuzioni test urađen je po standardima ISO 10993-5 i ISO 7405 (34,54). L929 ćelije zasejane su u Petrijeve šolje (10 ml; koncentracija $2.5 \cdot 10^5$ ćelija/ml) dimenzija 10mm i inkubirane tokom 24 sata na temperaturi od 37°C, u vazdušnoj atmosferi sa 5% CO₂. Sterilan agar (*Difco, Detroit, Michigan, USA*) zagrejan je u vodenom kupatilu na 100°C i postepeno ohlađen do 48°C.

Agar je pomešan sa dvostruko koncentrovanim medijumom u odnosu 1:1 i zagrejan na 48°C. Tečni hranljivi medijum je aspiracijom odstranjen iz svake petrijeve šolje i zamenjen sa 10ml sveže mešavine agar/hranljivi medijum. Posle očvršćavanja agar/hranljivog medijuma na sobnoj temperaturi (30 min), ćelije su obojene sa 10ml rastvora neutralne crvene i ostavljene u mraku tokom 15 minuta. Višak rastvora neutralne crvene je aspiriran. Uzorci materijala dimenzija 10/2mm postavljeni su na agarozu u svakoj petrijevoj šolji. Petrijeve šolje inkubirane su 24 sata na 37°C, u vazdušnoj atmosferi sa 5% CO₂. Ćelije su pregledane na invertnom mikroskopu. Princip merenja zasnivao se na sposobnosti vijabilnih ćelija da retiniraju neutralno crvenu boju, dok kod oštećenih ćelija dolazi do rupture membrane i otpuštanja prethodno akumulirane boje, formirajući zonu dekolorizacije. Zona dekolorizacije je izmerena lenjirom. Svaki uzorak je ispitan u kvadrilikatu a eksperiment je ponovljen dva puta. Rezultati su analizirani prema zoni dekolorizacije i lizirajućem indeksu.

2.2 Ispitivanje na eksperimentalnim životinjama

2.2.1 Subkutana implantacija

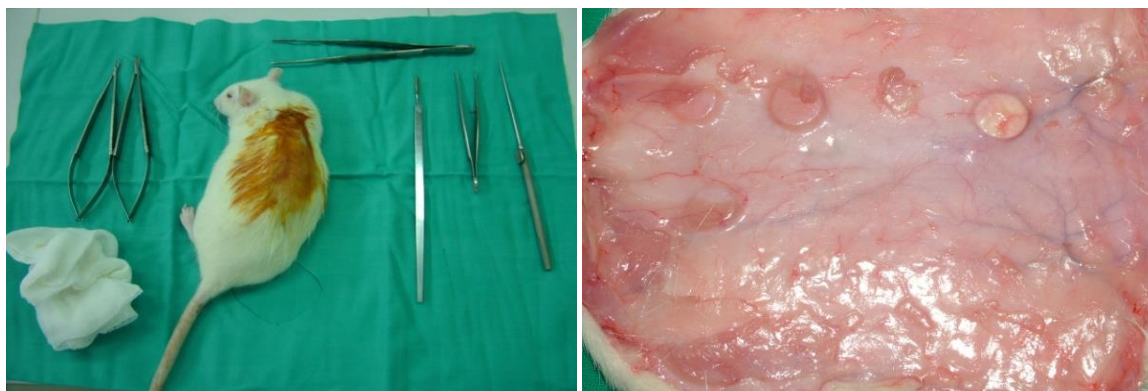
Ispitivanje biokompatibilnosti subkutanom implantacijom vršeno je na laboratorijskim pacovima (*Wistar*) iste vrste, pola i jednake starosti. Životinje su težile 300-350 g, smeštene su bile u kavezima po petoro, sa adekvatnim dnevno noćnim ritmom i peletnom ishranom. Uzorci materijala napravljeni su prema ISO 10993, dimenzija 10/1mm, 48 sati pre izvođenja eksperimenta. Ispitivani materijali obuhvatali su hladnopolimerizujući (*Triplex Cold*)

toplopolimerizujući (*Triplex Hot*) i termoplastični akrilat (*Biocril C*). Kao negativna kontrola koristio se *Teflon*. Uzorci materijala sterilisani su na plazma sterilizatoru pri temperaturi od 50°C (*Sterrad NX, Irvine, CA 92618, SAD*). U svaku životinju implantirano je po 4 sterilna diskoidna uzorka. Eksperiment je obuhvatao 24 eksperimentalne životinje sa ukupnim brojem od 96 uzoraka, računajući i kontrolni materijal. Pre izvođenja eksperimenta, leđa pacova su obrijana i dezinfikovana sa povidon jodom (slika 1). Životinje su anestetizirane sa ketaminom, koji je aplikovan intraperitonealno pri koncentraciji od 10mg/100g. Tupom disekcijom napravljeni su subkutani džepovi sa međusobnim rastojanjem od najmanje 1cm. U svaki džep implantiran je po jedan uzorak materijala. Džepovi su ušiveni sa najlonskim koncem prečnika 0.2mm. Obeležavanje životinja vršeno je sa pikrinskom kiselinom.

Eksperimentalni period je podeljen na tri vremenska intervala (15, 30 i 90 dana), tokom kojih je žrtvovano po 7 životinja za svaki od prva dva implantaciona perioda i 8 životinja za treći period. Dve životinje su isključene iz studije zbog dehiscencije šavova. Životinje su žrtvovane opštom uretanskom anestezijom. Histološki preparati napravljeni su ekscizijom okolnog tkiva posle svakog implantacionog perioda (slika 2). Tkivo je dehidrirano tokom 5 danu 95% izopropanolu, posle čega je sledilo kalupljenje u parafinu. Isečci debljine 5 µm napravljeni su na mikrotomu (*Leica RM2235, Nussloch, Nemačka*) i obojeni sa eozinom i hematoksilinom. Histopatološka analiza i kvantifikacija rezultata vršena je prema ISO 10993-6.

Slika 1. Hirurška priprema pre implantacije

Slika 2. Subkutano implantirani uzorci



Parametri biokompatibilnosti analizirani su pomoću jednostrane analize varijanse (ANOVA) sa Tukijevim post hoc testom. Analizirano je međusobno poređenje materijala za svaki od implantacionih perioda, i poređenje istog materijala između tri implantaciona perioda (15, 30, 90 dana). Step en slobode određen je na $\alpha=0.05$.

2.2.1.1 Određivanje površinske hrapavosti implantiranih materijala

Merenje površinske hrapavosti vršeno je metodom kontaktne profilometrije. Korišćen je uređaj *MarSurf PS1, Mahr GmbH, Nemačka* (opseg merenja $R_a=0.01$ do $38\mu\text{m}$, rezolucija 0.001mm , proširena merna nesigurnost $U=4.12\%$.) Merenje se vršilo mernim pipkom smeštenim

u merni senzor koji je klizio po ispitivanom profilu konstantnom brzinom, prečnika $2\mu\text{m}$ pod dejstvom sile $F=0.7\text{mN}$. Hod pipka definisan je dužinom snimanja $L_t=5.6$. Dužina procenjivanja $L_m=4\text{mm}$ i vrednost referentne dužine (veličina cut-off filtera) $\lambda_c=0.8\text{mm}$, određena je izborom L_t prema ISO standardu. Promena položaja pipka prema elementima merne glave pretvarana je u električni signal preko transformatora. Zabeležen električni signal se pojačavao i filtrirao, sa ciljem otklanjanja vrednosti talasnih dužina koje ne odgovaraju hrapavosti i dobijanja odgovarajućih parametara površinske hrapavosti. Vrednost srednjeg aritmetičkog odstupanja profila (R_a) uzimao se kao najviše korišćen parametar koji opisuje stanje površine.

2.2.2 Iritacija oralne sluzokože

Ispitivanje iritacije oralne sluzokože vršilo se na Sirijskim zlatnim hrčcima. Životinje su tretirane sa adekvatnim dnevno-noćnim ritmom sa neograničenim pristupom hrani.

Slika 3. Retenciona ogrlica



Slika 4. Izgled bukalne kesice sirijskog zlatnohrčka



Slika 5. Ekscidovana bukalna kesica



Slika 6. Priprema bukalne kesice za histološku analizu



Ispitivanje je obuhvatalo 6 životinja po eksperimentalnoj grupi i 3 životinje u kontrolnoj. Životinje su smeštene zasebno, po jedna životinja u kavezu. Masa životinja merila se svakodnevno i nijedna životinja nije izgubila više od 10 % od prvobitne mase.

Uzorci materijala korišćenih u studiji bili su diskoidnog oblika, dimenzija 5 mm u prečniku i debljine 2 mm. Istraživanje je obuhvatalo hladnopolimerizujući (*Triplex Cold*) termoplastični akrilat (*Biocril C*) i kombinaciju prethodna dva (*Biocril C+Triplex Cold*). Zbog lakšeg rukovanja uzorci susa najlonom vezani za deo sterilne gaze, koja se menjala na svaka tri dana. Po jedan uzorak stavlja se u bukalnu kesicu dok je kontralateralna kesica služila kao prva negativna kontrola. Dodatna negativna kontrola vršila se sa uzorkom *teflona* (druga negativna kontrola). Dužina ekspozicije bila je približna kliničkoj upotrebi materijala, tako da su uzorci stajali u ustima hrčka tokom 12 sati, svakog dana. Retencija i imobilizacija uzorka vršila se plastičnom ogrlicom, koja se stavljala svaki dan posle aplikacije uzorka (slika 3,4). Nakon 12 sati ogrlica se skidala, posle čega je sledilo vađenje uzorka, ispiranje obraza sa fiziološkim rastvorom i makroskopski pregled. Ogled je trajao 21 dan, nakon čega su životinje humano žrtvovane uretanskom anestezijom, 12 sati posle zadnje ekspozicije. Histološki preparati pravljeni su uvrtnjem cele bukalne kesice oko štapića, kako bi se dobio njen celokupan presek (slika 5,6). Dehidracija je vršena u 95% izopropil alkoholu, posle čega je sledilo kalupljenje u parafinu. Isečci debljine 5 µm sečeni su na mikrotomu (*Leica RM2235, Nussloch, Nemačka*), posle čega su obojeni sa eozinom i hematoksilinom. Histološka analiza rađena je u skladu sa ISO 10993-10.

2.3 Ispitivanje mehaničkih karakteristika

2.3.1 Priprema i obrada uzorka

Ispitivanje mehaničkih karakteristika polimera za bazu zubne proteze obuhvatalo je ispitivanje *zatezne, savojne čvrstoće, čvrstoće loma i mikrotvrdoće*. Materijali koji su korišćeni u studiji navedeni su u tabeli 2. U sprovedenom istraživanju korišćeno je po 8 uzoraka od svake grupe materijala, za svaki ogled posebno. Istraživanje je obuhvatalo 32 uzorka za svaki ogled, sa ukupnim brojem od 128 uzoraka, koji su napravljeni prema uputstvima proizvođača. Uzorci su biliskladišteni u destilovanoj vodi tokom 7 dana pre početka izvođenja ogleada, radi približavanja uslovima koji vladaju u usnoj duplji. Kao referentni uzorci korišćeni su metalni etaloni dimezija 80-20-3 mm za ispitivanje zatezne čvrstoće, 50-6-3mm za ispitivanje savojne čvrstoće i 50-3-3 mm za čvrstoću loma i mikrotvrdoću.

Postupak pravljenja uzoraka obuhvatao je proizvodnju gipsanog kalupa pomoću metalnih etalona. Uzorci hladnopolimerizujućeg akrilata polimerizovani su na temperaturi od 45°C pri pritisku od 4 bara, tokom 15 minuta u aparatu Ivomat (*Ivoclar Vivadent, Lichtenstain*). Uzorci topopolimerizujućeg akrilata presovani su na 7000 kpa (*Reco Hydromatic press, Germany*) posle čega su kuvani tokom 45 min na temperaturi od 100°C. Uzorci termoplastične folije pravljeni su isecanjem uzoraka od prefabrikovane folije, pre i posle presovanja. Folije su bile presovane na

prethodno napravljenom gipsanom postolju (prečnik 80 mm/visina 10 mm) pri pritisku od 3 bara u aparatu Ministar S (*Scheu Dental, Germany*). Obrada svih uzoraka bila je vršena pomoću standardnog laboratorijskog mikromotora, sa niskom stopom obrtaja. Uzorci su na kraju dva puta polirani (*Reco PM Super, Germany*), prvo sa standardnom četkom (*Abraso-soft acrylic, Bredent, Germany*) a posle sa finom četkom (*High lustre buff acrylic, Bredent Germany*) na 3000 obrtaja/min (slika 7).

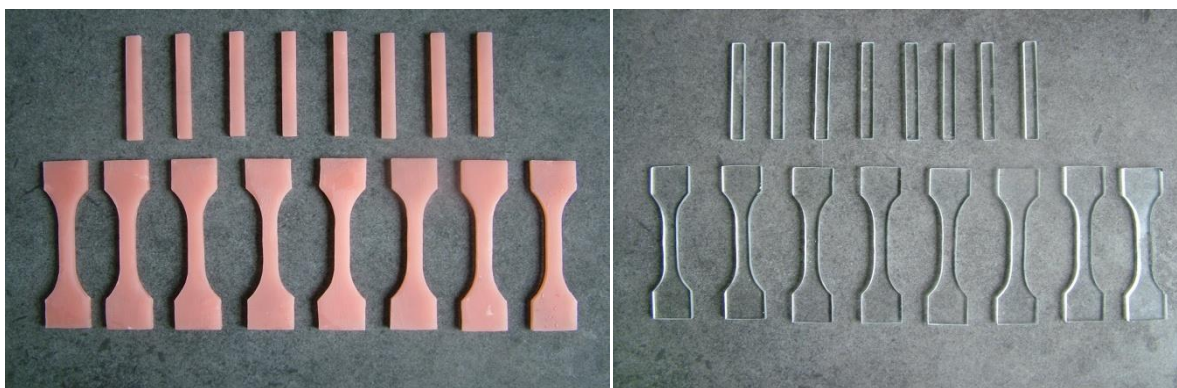
Tabela 2. Materijali korišćeni u studiji

Grupa	Oznaka	Proizvođač	Sastav*	Polimerizacioni metod
Triplex Cold	C	Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenštajn	Prašak: PMMA, dibenzoil peroksid, pigmenti Tečnost: MMA, etilen dimetakrilat, stabilizator	13g : 10 ml Hemijska polimerizacija na 40°C, pritisak 4 bara - 15 min
Triplex Hot	H	Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenštajn	Prašak: PMMA, dibenzoil peroksid, pigmenti Tečnost: MMA, etilen dimetakrilat	23g: 10 ml Toplotna polimerizacija na 100°C - 45 min
Biocryl C (pre**)	AR	Scheu Dental, Iserlohn Nemačka	polimetilmetakrilat	Prepolimerizovan od strane proizvođača
Biocryl C (posle**)	TF	Scheu Dental, Iserlohn Nemačka	polimetilmetakrilat	Prepolimerizovan od strane proizvođača, zagrevanje 90 sek, pritisak 3 bara

* sastav prema navodima proizvođača

** pre i posle termoplastičnog presovanja

Slika 7. Uzorci materijala (*Triplex Hot, Biocril C*) za ispitivanje zatezne i savojne čvrstoće



2.3.2 Protokoli ispitivanja mehaničkih karakteristika

Postupak ispitivanja zatezne i savojne čvrstoće rađen je u skladu sa ASTM D638 i ISO 20795-1:2013 standardom (slika 8), (66). Zatezna čvrstoća ispitivanih materijala određena je na Univerzalnoj kidalici (*Model 1122, Instron, Canton, MA, USA*) sa transverzalnom brzinom od 10 mm/min, pomoću sledeće jednačine(1):

$$R_m = F_m / S_o \quad (1)$$

gde je:

R_m - zatezna čvrstoća (MPa)

F_m - maksimalna sila (N)

S_o - poprečni presek (mm²).

Uzorci za ispitivanje zatezne čvrstoće pravljani su po ASTM D638-03 standardu (uzorci tip IV). Tokom opterećenja uzoraka dijagram odnosa sile i istezanje automatski je zabeležen na ploteru mašine (Fig. 2). Istezanje je izračunato pomoću jednačine (2):

$$A = (L - L_o) \cdot 100 / L_o \quad (2)$$

gde je:

L - dužina frakture

L_o - dužina raspona (25 mm).

Savojna čvrstoća određena je testom savijanja. Kao što je navedeno, ispitivano je 8 uzoraka materijala po grupi, dimenzija $(50 \pm 0.2) \times (6 \pm 0.1) \times (3 \pm 0.1)$ mm. Ispitivanje je vršeno na Univerzalnoj mašini za testiranje (*AT-L-118B, Toyoseiki, Tokyo, Japan*) sa transverzalnom brzinom od 1 mm/min i rasponom od 40mm između oslonaca. Savojna čvrstoća izračunata je pomoću jednačine (3):

$$\sigma = 3F_{\max}L/(2BH^2) \quad (3)$$

gde je:

σ - savojna čvrstoća (MPa)

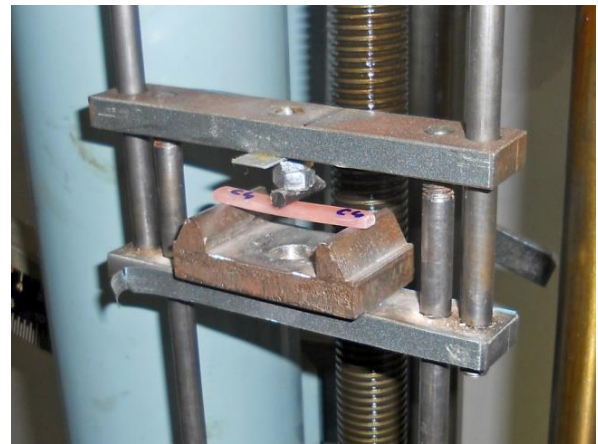
F_{\max} - maksimalno opterećenje (N)

L- razdaljina između oslonaca (mm)

B- debljina uzoraka (mm)

H- visina uzoraka (mm).

Slika 8. Ispitivanje zatezne i savojne čvrstoće



Čvrstoća loma određena je na konvencionalnoj mašini za određivanje savojne čvrstoće (*AT-L-118B; Toyoseiki, Tokyo, Japan*), opremljenoj sa savojnim uređajem sa pritiskom na četiri tačke sa razdaljinom između oslonaca od 20/40 mm. Transverzalna brzina bila je konstantna i iznosila je 1 mm/min. Korišćen je SEVNB metod (Single Edge V-Notch Beam) prema navodima ASTM D5045, gde su dimenzije uzoraka iznosile $(45\pm 0.2)\times(4\pm 0.1)\times(3\pm 0.1)$ mm sa centralno pozicioniranim urezom u odnosu na uzdužnu osovinu. Preliminirani U-urez napravljen je ručno sa preciznom bušilicom/brusilicom (*FBS12; Proxxon, Foehren, Germany*), koja je imala hod od 3000-15000 min^{-1} , opremljena sa silicijum karbidnim diskom dimenzija $\text{Ø}20\times 0.8$ mm. Definitivan V-urez napravljen je ručnim sečenjem po sredini prethodno napravljenog U-ureza, delujući kao inicijalna pukotina. Za ovu svrhu korišćen je komercijalni žilet (*Platinum; Gillette, Boston, Mass*). Primenjeni metod koristi se za keramičke i krte materijale i opisan je u dostupnoj literaturi (106,107,108). Dubina V-ureza izmerena je na svetlosnom mikroskopu (*Orthoplan; Leitz/Leica, Wetzlar, Germany*). Čvrstoća loma izračunata je prema jednačini (4):

$$K_{IC} = \frac{F}{B\sqrt{W}} \frac{S_1 - S_2}{W} \frac{3\sqrt{\alpha}}{2(1-\alpha)^{1.5}} Y^* \quad (4)$$

$$Y^* = 1.9887 - 1.326\alpha - (3.49 - 0.68\alpha + 1.35\alpha^2)\alpha(1 - \alpha)(1 + \alpha) - 2$$

gde je:

F - maksimalna sila (N)

S_x -razdaljina između oslonaca (mm)

α - geomterijski faktor koji ima vrednost a/W

a - ukupna dubina ureza (mm)

B - debljina uzorka (mm)

W - je visina uzorka (mm)

Y^* - geometrijski faktor koji je bezdimenzionalan.

Mikrotvrdoća je određena metodom po Vickersu (*aparatus HVS-1000; Huayin, Laizhou, China*) sa sledećim parametrima: 300 g opterećenja sa trajanjem od 15 s, metoda prema Balosu (109). Na svakom uzorku napravljeno je po 10 udubljenja, uzorci su bili dimenzija: širina 20 mm, debljina 3 mm. Mikrotvrdoća je izračunata po sledećoj jednačini (5):

$$VHN = 1.8544F/d^2 \quad (5)$$

gde je:

VHN - Vickersov broj mikrotvrdoće

F - opterećenje (kg)

d -prosek između dijagonala udubljenja (mm).

Mehaničke karakteristike analizirane su pomoću jednostrane analize varijanse (ANOVA) sa Tukijevim post hoc testom. Step en slobode određen je na $\alpha=0.05$.

3. REZULTATI

3.1 Ispitivanje na ćelijskim kulturama

Rezultati ispitivanja na ćelijskim kulturama prikazani su u tabeli 3-6. Rezultati ispitivanja na MRC5 ćelijskoj kulturi (tabela 3) pokazuju smanjenu vijabilnost ćelija kod eluata nastalih ekstrakcijom tokom prvih 3 dana, sa najmanjim vrednostima kod hladnopolimerizujućih akrilata - grupa Cold (87%), a najvećim u grupi termoplastičnih akrilata - grupa Bio (100%). Ekstrakcioni period od 5 dana pokazao je slične rezultate za hladnopolimerizujući i topopolimerizujući akrilat – grupa Hot, dok su kod grupe Bio bili malo iznad kontrolne grupe. Kod eluata nastalih posle 7 dana, vijabilnost je porasla na 116% kod grupe Biocril i 110% kod grupe Hot, dok je kod grupe Cold ostala na nivou kontrole. U poslednjem ekstrakcionom periodu utvrđena je najveća vijabilnost za sve grupe. Vijabilnost je iznosila 108% za grupu Cold, 113% za grupu Hot, dok je najveća vijabilnost od 123% utvrđena za grupu Biocril. U grupi Cold zabeležene su najmanje standardne devijacije.

Tabela 3. Rezultati ispitivanja uticaja eluata na ćelijskoj kulturi MRC 5

Eluati-MRC 5			
Dana	Grupa		
	Bio	Hot	Cold
3	100,76 ±3,25	90,35 ±4,05	87,42 ±0,57
5	102,23 ±2,96	98,94 ±2,41	98,10 ±1,86
7	115,84 ±6,04	110,34 ±6,35	100,76 ±0,44
21	123,47 ±3,46	112,87 ±3,38	108,28 ±2,16

Rezultati ispitivanja na L929 ćelijskim kulturama (tabela 4) pokazuju da je kod eluata dobijenih ekstrakcijom tokom prvih 3 dana, vijabilnost bila smanjena kod sve tri eksperimentalne grupe, najmanja je bila kod grupe Hot (81%) a najveća kod grupe Cold (91%). Trend blagog rasta nastavlja se posle 5 dana za sve materijale, dok su posle 7 dana rezultati grupe Cold malo iznad kontrole (103%) a kod grupe Bio (92%) i Hot malo ispod (97%). Inkubacija sa eluatima nastalim posle 21 dana pokazala je porast vijabilnosti kod sve tri eksperimentalne grupe, najmanja je bila kod grupe Hot 103% a najveća ponovo u grupi Cold 113%.

Tabela 4. Rezultati ispitivanja uticaja eluata na ćelijskoj kulturi L929

Eluati-L929			
Dana	Grupa		
	Bio	Hot	Cold
3	84,30 ±2,39	81,65 ±1,09	91,20 ±2,33
5	89,03 ±2,41	88,92 ±3,35	97,40 ±3,46
7	92,68 ±1,33	97,41 ±0,19	103,81 ±1,53
21	104,76 ±1,46	103,91 ±1,98	113,30 ±1,65

Poređenjem dve različite ćelijske kulture može se zaključiti da je kod grupa Bio i Hot vijabilnost veća kod MRC 5 ćelijske linije u odnosu na L929, za sva četiri eksperimentalna perioda. Kod grupe Cold na ćelijskoj liniji L929 vijabilnost je manja samo posle 5 dana, dok je posle 3,7 i 21 dana veća u odnosu na MRC 5. Grupa Cold je imala približno iste rezultate kod obe ćelijske linije.

Tabela 5. Rezultati ispitivanja direktnog kontakta na ćelijskoj kulturi L929

Direktan kontakt			
Ćelijska linija	Grupa		
	Bio	Hot	Cold
MRC 5	102,84 ±7,03	99,39 ±1,48	98,63 ±5,11
L929	98,95 ±6,51	100,71 ±3,45	104,44 ±4,16

Rezultati ispitivanja kod direktnog kontakta materijala sa ćelijskom kulturom (tabela 5) u skladu su sa rezultatima ispitivanja citotoksičnosti sa kontaktom ćelija preko eluata. Kontakt sa materijalom bio je ostvaren tokom 24 sata, posle čega je sledila inkubacija od 48 sati. Najveća vijabilnost MRC 5 ćelija zabeležena je kod grupe Bio a najmanja kod grupe Cold, iako su razlike male. Rezultat je sličan eluatima sa ekstrakcionim periodom od 7 dana. Kod L929 ćelijske linije najveća vijabilnost je kod grupe Cold a kod ostale dve je slična, oko 100%. Treba naglasiti da je najhomogenija distribucija rezultata kod grupe Hot, a najmanje homogena u grupi Biocril.

Ni kod jednog ispitivanog materijala nije utvrđena reakcija citotoksičnosti u slučaju korišćenja Agar difuzionog testa (tabela 6).

Tabela 6. Rezultati Agar difuzionog testa

Agar difuzioni test-L929			
parametri citotoksičnosti	Grupa		
	Bio	Hot	Cold
<i>Indeks dekolorizacije</i>	0	0	0
<i>Lizirajući indeks</i>	0	0	0
<i>Ćelijski odgovor</i>	0	0	0

3.2 Ispitivanje na eksperimentalnim životinjama

3.2.1 Test subkutane implantacije

Rezultati histološke analize subkutano implantiranih uzoraka prikazani su u tabeli 7. Broj eozinofila u tkivu Wistar pacova oko ugrađenih ispitivanih materijala nije se bitno razlikovao nakon prvog ispitivanog vremenskog intervala od 15 dana. Najmanji broj eozinofila zabeležen je kod kontrolne grupe sa ugrađenim teflonom (grupa Tef). Dobijeni su veoma slični rezultati i pri analiziranju broja limfocita i makrofaga, s tim da se u kontrolnoj grupi sa teflonom u dva slučaja javila umerena infiltracija (drugi stepen), za razliku od testiranih materijala. Džinovske

ćelije bile su prisutne oko svih ispitivanih materijala, ali ih je bilo primetno manje kod grupe termopresovanog akrilata (grupa Bio), dok se kod kontrolne grupe sa teflonom u dva slučaja ponovo javila umerena infiltracija drugog stepena (slika 9,10). U tkivu oko implantiranih test materijala broj mastocita nije se značajno razlikovao. Nešto bolje rezultate u odnosu na ostale grupe imala je grupa topopolimerizujućih akrilata (grupa Hot), ali ta razlika nije bila statistički značajna. Za sve ispitivane materijale nakon vremenskog intervala od 15 dana neovaskularizacija je bila minimalna. Kod grupe hladnopolimerizujućih akrilata (grupa Cold) u dva slučaja zabeležen je drugi stepen urastanja, dok je kod kontrolne grupe sa teflonom drugi stepen urastanja zabeležen u tri slučaja. Debljina kapsule bila je minimalna ili 50-100 μ m (1 stepen) i nije se menjala u zavisnosti od vrste materijala. Inflamacija i odgovor tkiva nisu se statistički razlikovali kod između ispitivanih materijala (tabela 8).

U drugom vremenskom intervalu od 30 dana, broj eozinofila u tkivu oko uzoraka bio je niži kod topopolimerizujućeg akrilata i kontrolne grupe u odnosu na ostala dva materijala. Limfocita je bilo manje kod grupe termopresujućeg akrilata, dok je kod ostalih materijala zastupljenost limfocita u tkivu bila ujednačena. Najviše makrofaga bilo je prisutno u grupi sa teflonom, a džinovskih ćelija u grupi sa hladnopolimerizujućim akrilatom. Broj mastocita bio je ujednačen oko svih ispitivanih materijala osim oko kontrolne grupe sa teflonom, kod koje su zabeležene najmanje vrednosti. Neovaskularizacija i debljina kapsule su u većini slučajeva bile minimalne. Kod grupe hladnopolimerizujućeg akrilata je u dva slučaja debljina kapsule bila umerena (2 stepen), dok je kod grupe topopolimerizujućeg akrilata u jednom slučaju zabeležena srednja debljina kapsule (3 stepen). To je jedini slučaj u kom se javio zid sa aktivnom inflamacijom, pa se pored obilnog infiltrata unutar kapsule, mogu videti i znaci nekroze, prisustvo hemosiderofaga i masne degeneracije (slika 11). Ni u drugom intervalu nije bilo statističke značajnosti u inflamaciji i odgovoru tkiva između ispitivanih materijala.

Tabela 8. Razlika između materijala po vremenskim intervalima (ANOVA, vrednost-p)

GRUPA	eozinofili	limfociti	makrofagi	džinovske	mastociti	neovaskular.	kapsula
15	0,588	0,553	0,376	0,077	0,588	0,506	0,287
30	0,426	0,331	0,24	0,588	0,285	0,544	0,521
90	0,375	0,939	0,012	0,053	0,391	0,66	0,283

Tabela 9. Razlika između vremenskih intervala za svaku grupu materijala (ANOVA, vrednost-p)

GRUPA	eozinofili	limfociti	makrofagi	džinovske	mastociti	neovaskular.	kapsula
Bio	0,957	0,338	0,325	0,64	0,945	0,292	0,483
Hot	0,619	0,655	0,156	0,043	0,09	0,335	0,599
Cold	0,382	0,268	0,576	0,872	0,61	0,483	0,094
Tef	0,72	0,674	0,875	0,496	0,64	0,044	0,255

Tabela 7. Rezultati histološke analize subkutano implanitiranih uzoraka

Vreme	15 dana (7 Uzoraka)				30 dana (7 Uzoraka)				90 dana (8 Uzoraka)			
Grupa	Bio	Hot	Cold	Tef	Bio	Hot	Cold	Tef	Bio	Hot	Cold	Tef
INFLAMACIJA												
Eozinofili												
0	2	4	3	5	3	5	3	5	4	7	6	7
1	5	2	4	2	3	2	4	2	3		2	1
2		1			1				1	1		
3												
4												
Limfociti												
0	1	2	3	2	3	1	1	1	1	2	3	2
1	6	5	4	3	4	5	4	5	7	5	4	6
2				2		1	2	1		1	1	
3												
4												
Makrofagi												
0	2	2	2	1	4	5	4	1	2	7	3	1
1	5	5	5	4	3	1	3	5	5	1	5	6
2				2		1		1	1			1
3												
4												
Džinovske ćelije												
0	6	3	4	2	5	4	5	2	6	8	5	3
1	1	4	3	3	1	3	2	5	2		3	5
2				2	1							
3												
4												
Mastociti												
0	2	5	4	5	3	2	4	6	3	6	5	6
1	5	2	3	1	3	4	1	1	5	2	3	2
2				1	1	1	2					
3												
4												
ODGOVOR TKIVA												
Neovaskularizacija												
0	1	1	1		3	1	1	2	3	3	1	3
1	5	5	4	4	4	5	6	4	5	5	7	5
2	1	1	2	3		1		1				
3												
4												
Kapsula*												
0		1			2	1		1	1		1	
1	6	6	7	7	4	5	5	6	7	7	7	7
2	1				1		2			1		1
3						1						
4												
UKUPNO	37	33	34	43	30	35	37	34	38	26	33	36

Stepen: 0-nema prisustva, 1-minimalno, 2-umereno, 3-srednje, 4-izraženo

*Kapsula: 0=do 50 µm, 1=50 do 100 µm, 2=100 do 150 µm, 3=150 do 200 µm, 4=preko 200µm

U trećem vremenskom intervalu od 90 dana, nije bilo većih razlika u broju eozinofila. Povećano prisustvo eozinofila primećeno je kod grupe termopresujućeg akrilata, sa trendom opadanja u odnosu na prethodna dva intervala. Vrednosti limfocita ostale su nepromenjene u odnosu na ranije vremenske intervale, samo je u kontrolnoj grupi sa teflonom došlo do opadanja broja limfocita. Najmanje makrofaga bilo je prisutnou grupi topopolimerizujućeg akrilata, sa приметnim trendom opadanja u odnosu na prethodne vremenske intervale. Broj makrofaga je jedini parametarkod koga je utvrđena statistički značajna razlika između materijala, kod grupe topopolimerizujućegakrilata u odnosu na grupe termopresujućegakrilata i kontrolne grupe (tabela 8,10,11). U grupi topopolimerizujućih akrilata nije bilo prisustva džinovskih ćelija, što se razlikuje u odnosu na ostale grupe kao i u odnosu naranije vremenske intervale. Vremenski zavisno smanjenje broja džinovskih ćelija je statistički potvrđeno (tabela 9,12,13).Broj mastocita se kod svih grupa smanjivao, najniži je bio u grupi topopolimerizujućeg akrilata i kontrolne grupe. Neovaskularizacija je pokazalavremenski zavistan trend opadanja kod svih materijala, statistička značajnost utvrđena je kod kontrolne grupe u poređenju prvog i trećeg vremenskog intervala (tabela 9,14,15). Debljina kapsule nije se znatno menjala, osim što je došlodo histoloških promena u vidu fibroznog zadebljanja i neujednačenosti u debljini zida, što se razlikuje u odnosu na prethodne vremenske intervale. Fibrozno zadebljanje primećeno je kod 18 od ukupno 32 uzorka, što je znatan porast u odnosu na ranije intervale, kada je fibroza bila prisutna samo sporadično (slika 12). Fibroza i broj krvnih sudova u kapsuli su obrnuto srazmerni, što potvrđuje hroničan tok inflamacije i proces reaparacije tkiva.

Od ostalih parametara koji nisu prikazani u tabeli, zabeleženo je prisustvo granuloma, najviše u prvom vremenskom intervalu a manje u drugom i trećem. Neutrofili su primećeni u pojedinačnim slučajevima kod prvog i drugog vremenskog intervala. Zabeležen je samo jedan slučaj sa aktivnom inflamacijom zida, gde je pored neutrofila bila prisutna nekroza i masna degeneracija. Rezultati merenja hrapavosti implantiranih uzoraka prikazani su u tabeli 16.

Tabela 10. ANOVA za broj makrofaga između različitih grupa materijala u trećem implantacionom periodu

	suma kvadrata	df	srednja vrednost kvadrata	F	značajnost
Između grupa	3,594	3	1,198	4,399	,012
Unutar grupa	7,625	28	,272		
Ukupno	11,219	31			
a. Parametar = Makrofagi, Vreme = 90					

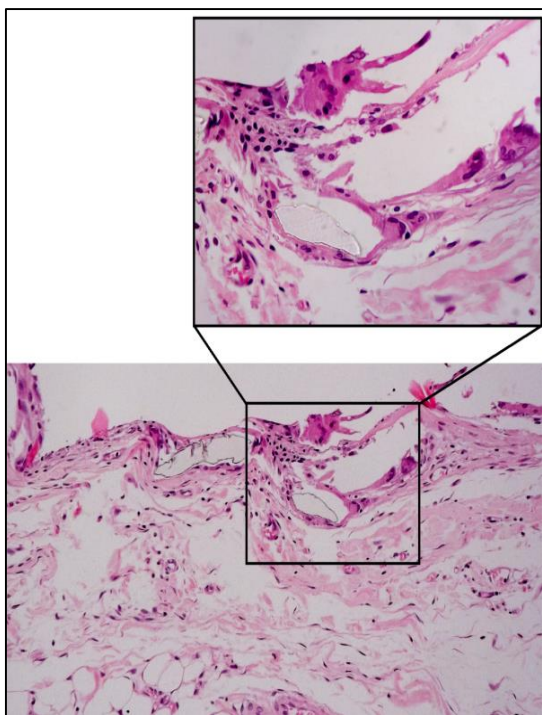
Tabela 11. Post hoc test za broj makrofaga između različitih grupa materijala u trećem implantacionom periodu

(I) Grupa	(J) Grupa	srednja razlika (I-J)	standardna greška	značajnost	95% interval poverenja	
					donja granica	gornja granica
Bio	Hot	,750*	,261	,008	,22	1,28
	Cold	,250	,261	,346	-,28	,78
	Tef	-,125	,261	,636	-,66	,41
Hot	Bio	-,750*	,261	,008	-1,28	-,22
	Cold	-,500	,261	,066	-1,03	,03
	Tef	-,875*	,261	,002	-1,41	-,34
Cold	Bio	-,250	,261	,346	-,78	,28
	Hot	,500	,261	,066	-,03	1,03
	Tef	-,375	,261	,162	-,91	,16
Tef	Bio	,125	,261	,636	-,41	,66
	Hot	,875*	,261	,002	,34	1,41
	Cold	,375	,261	,162	-,16	,91

a. Parametar = Makrofagi, Vreme = 90

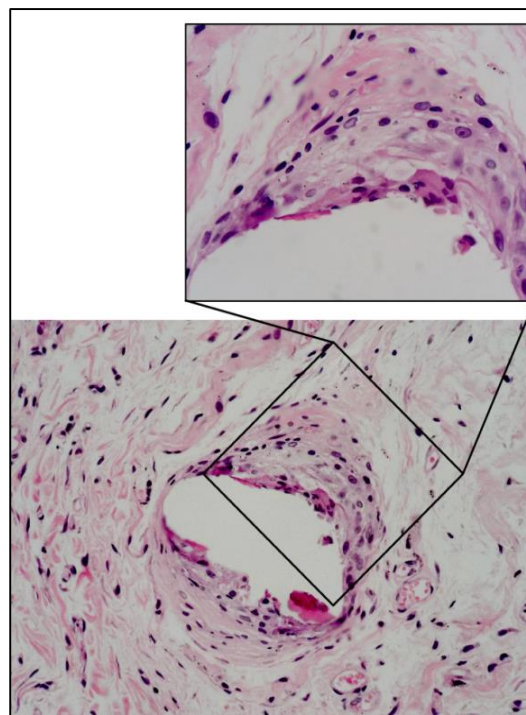
Slika 9. Granulom tipa oko stranog tela sa stranim materijalom i džinovskim ćelijama

(uvećanje 400X-1000X)

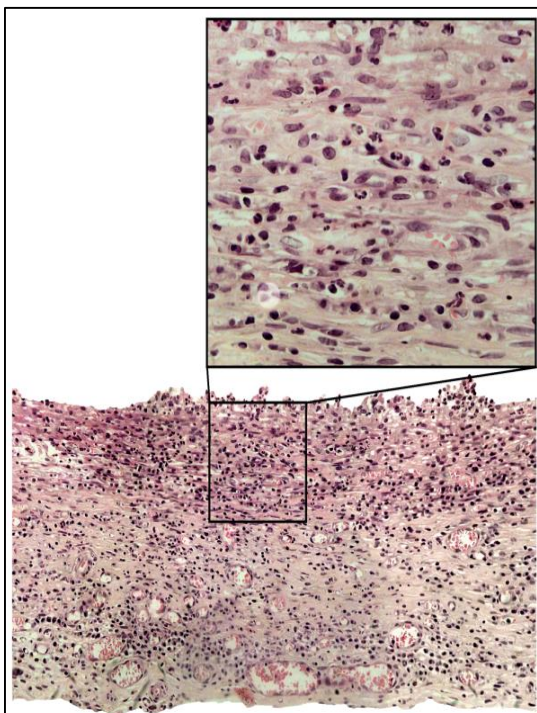


Slika 10. Granulom sa stranim telom i džinovskim ćelijama

(uvećanje 400X-1000X)



Slika 11. Zid sa aktivnom inflamacijom
(uvećanje 400X-1000X)



Slika 12. Dobro formirana fibrozna kapsula
neujednačene debljine uz prisutnu
inflamatornu reakciju hroničnog tipa
(uvećanje 400X-1000X)

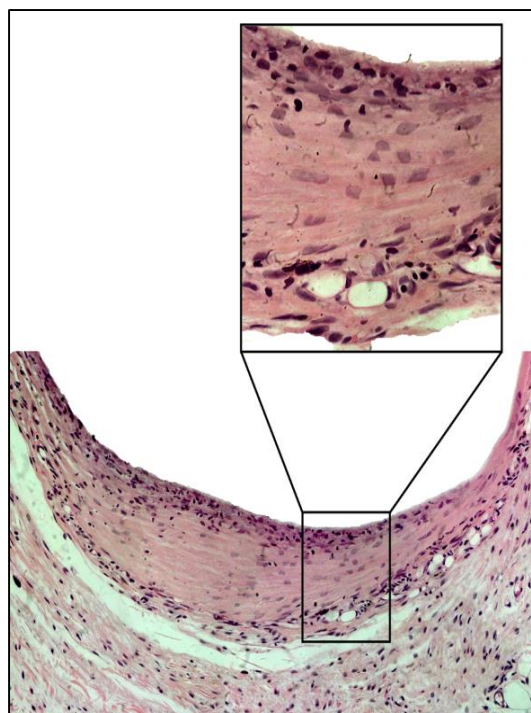


Tabela 12. ANOVA za broj džinovskih ćelija (grupa HOT, poređenje između implantacionih perioda)

	suma kvadrata	df	srednja vrednost kvadrata	F	značajnost
Između grupa	1,344	2	,672	3,724	,043
Unutar grupa	3,429	19	,180		
Ukupno	4,773	21			

a. Parametar = Džinovske ćelije, Grupa = Hot

Tabela 13. Post hoc test broja džinovskih ćelija grupe Hot, poređenje implantacionih perioda

(I) Vreme	(J) Vreme	srednja razlika(I-J)	standardna greška	značajnost	95% interval poverenja	
					donja granica	gronja granica
15	30	,143	,227	,537	-,33	,62
	90	,571*	,220	,018	,11	1,03
30	15	-,143	,227	,537	-,62	,33
	90	,429	,220	,066	-,03	,89
90	15	-,571*	,220	,018	-1,03	-,11
	30	-,429	,220	,066	-,89	,03

a. Parametar = Džinovske ćelije, Grupa = Hot

Tabela 14. Srednje vrednosti stepena neovaskularizacije grupe Teflon, poređenje implantacionih perioda

	suma kvadrata	df	srednja vrednost kvadrata	F	značajnost
Između grupa	2,508	2	1,254	3,696	,044
Unutar grupa	6,446	19	,339		
Ukupno	8,955	21			

a. Parametar = Neovaskularizacija, Grupa = Tef

Tabela 15. Post hoc test stepena neovaskularizacije teflona u trećem implantacionom periodu

(I) Vreme	(J) Vreme	srednja razlika (I-J)	standardna greška	značajnost	95% interval poverenja	
					donja granica	donja granica
15	30	,571	,311	,082	-,08	1,22
	90	,804*	,301	,015	,17	1,43
30	15	-,571	,311	,082	-1,22	,08
	90	,232	,301	,451	-,40	,86
90	15	-,804*	,301	,015	-1,43	-,17
	30	-,232	,301	,451	-,86	,40

a. Parametar = Neovaskularizacija, Grupa = Tef

Tabela 16. Rezultati površinske hrapavosti implantiranih uzorka

Vreme	15 dana				30 dana				90 dana			
	HOT	COLD	BIO	TEF	HOT	COLD	BIO	TEF	HOT	COLD	BIO	TEF
1	0,439	0,732	0,248	1,993	1,113	0,527	0,665	1,598	0,752	0,367	0,475	1,420
2	0,351	0,483	0,372	1,653	0,562	0,464	0,576	2,480	0,820	0,167	0,888	1,192
3	0,159	0,994	0,243	2,523	0,595	0,431	0,165	4,190	0,536	0,384	0,241	2,126
4	0,357	0,853	0,766	0,814	0,266	0,484	0,366	2,201	0,405	0,953	0,451	1,860
5	0,817	1,291	0,239	1,911	0,347	0,341	0,285	1,763	0,121	0,384	0,153	1,938
6	0,833	1,098	0,475	3,286	0,671	0,512	0,421	2,006	0,356	0,769	0,189	2,814
7	0,355	0,354	0,217	3,044	0,714	0,763	0,129	2,285	0,850	0,473	0,134	2,989
8									0,412	0,554	0,198	4,149
Sred.vred.	0,415	0,829	0,365	2,174	0,609	0,503	0,372	2,36	0,531	0,506	0,341	2,311

3.2.2 Test oralne iritacije sluzokože

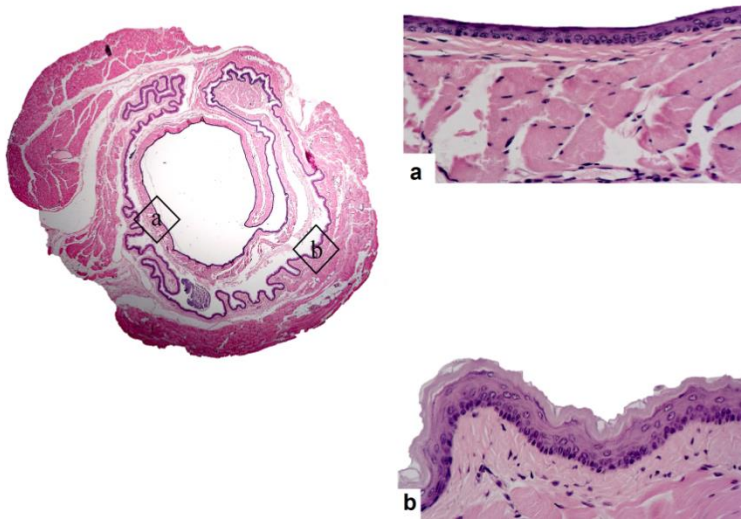
Rezultati ispitivanja iritacije oralne sluzokože prikazani su u tabeli broj 17. Nakon žrtvovanja obavljen je makroskopski i mikroskopski pregled. Makroskopskim pregledom nisu utvrđeni znakovi inflamacije ili destrukcije epitela. Mikroskopski pregled vršen je nakon kalupljenja preparata i bojenja eozinom i hematoksilinom.

Tabela 17. Rezultati ispitivanja iritacije oralne sluzokože

Materijal	Bio	Kon	Cold	Kon	B+C	Kon	Tef	Kon
Epitel								
Intaktan (0)	6	6	6	6	6	6	3	3
Degeneracija ćelija (1)								
Metaplazija (2)								
Fokalna erozija (3)								
Generalizovana erozija (4)								
Leukocitna infiltracija								
Odsutna (0)	6	6	5	4	4	6	3	3
Minimalna-manje od 25 (1)			1	2	1			
Umerena- od 25 do 50 (2)					1			
Srednja-od 51 do 100 (3)								
Primetna- više od 100 (4)								
Vaskularna kongestija								
Odsutna (0)	6	6	6	6	6	6	3	3
Minimalna (1)								
Umerena (2)								
Srednja (3)								
Primetna, prekid krv.sud (4)								
Edem								
Odsutna (0)	4	5	1	5	2	5	3	3
Minimalna (1)	2	1	5	1	3	1		
Umerena (2)					1			
Srednja (3)								
Primetna (4)								
UKUPNO	2	1	6	3	9	1	0	0

Isecci debljine 5 µm analizirani su u skladu sa standardom ISO 10993-6. Epitel je u svim slučajevima bio intaktan, uz odsustvo vaskularne kongestije (slika 13). Leukocitna infiltracija primećena je sporadično, i kod eksperimentalnih grupa i kod prve negativne kontrole (slika 14). Kod svih grupa zabeležen je minimalni edem, izuzetak je druga negativna grupa u kojoj je bilo manje jedinki u poređenju sa ostalima. Samo u jednom slučaju zabeležen je umeren nivo edema u grupi kombinovanog termopresujućeg akrilata sa hladnopolimerizujućim. Retencija i imobilizacija uzoraka vršena je plastičnom ogrlicom. Rezultati retencije tokom perioda od 21 dana prikazani su u tabeli broj 18.

Slika 13. Zavijutak i epitel ekscidovane bukalne kesice
(uvećanje 40X-400X)



Slika 14. Granuloцитna infiltracija u epitelu
(uvećanje 400X-1000X)

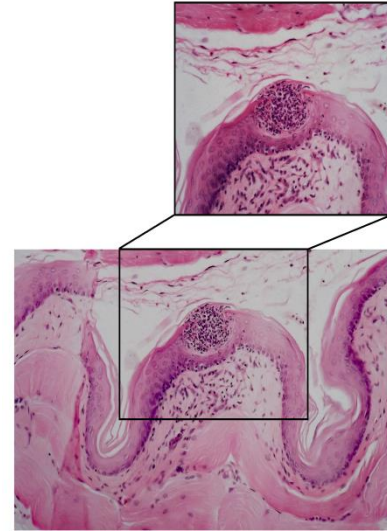


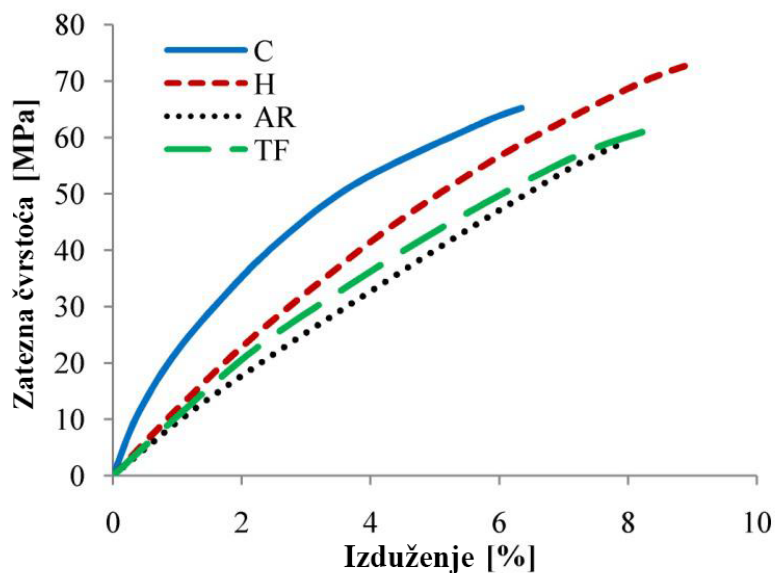
Tabela 18. Retencija uzoraka u bukalnoj kesici

Grupa	Biocril	Triplex	Biocril/Triplex	Teflon
Retencija (%)	91,7	89,7	93,7	92

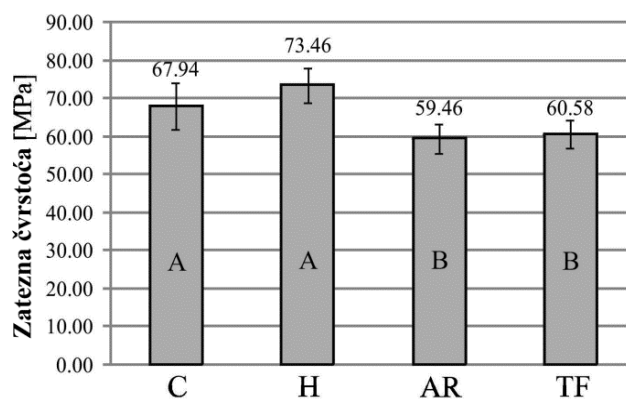
3.3 Ispitivanje mehaničkih karakteristika

Rezultati ispitivanja mehaničkih karakteristika prikazani su na slici 15-21 i tabelama 19-23. Rezultati ispitivanja zatezne čvrstoće prikazani su na slikama 15-18 i tabeli 19 i 20. Slika 15. prikazuje krivu napona i deformacije. Najveća zatezna čvrstoća dobijena je u grupi topopolimerizujućih akrilata (grupa H), posle nje sledi grupa hladnopolimerizujućih akrilata (grupa C), termopresovanih akrilata nakon presovanja (grupa TF) i termopresovanih akrilata pre presovanja (grupa AR) (Slika 16, tabela 19). Statistički značajna razlika zabeležena je između grupa C i H sa jedne strane, i AR i TF sa druge. Standardne devijacije su manje kod grupa AR i TF.

Slika 15. Kriva napona i deformacije dobijena ispitivanjem zatezne čvrstoće



Slika 16. Zatezna čvrstoća ispitivanih materijala sa standardnom devijacijom i rezultatima statističke analize (srednje vrednosti koje nisu označene istim slovom se statistički razlikuju)



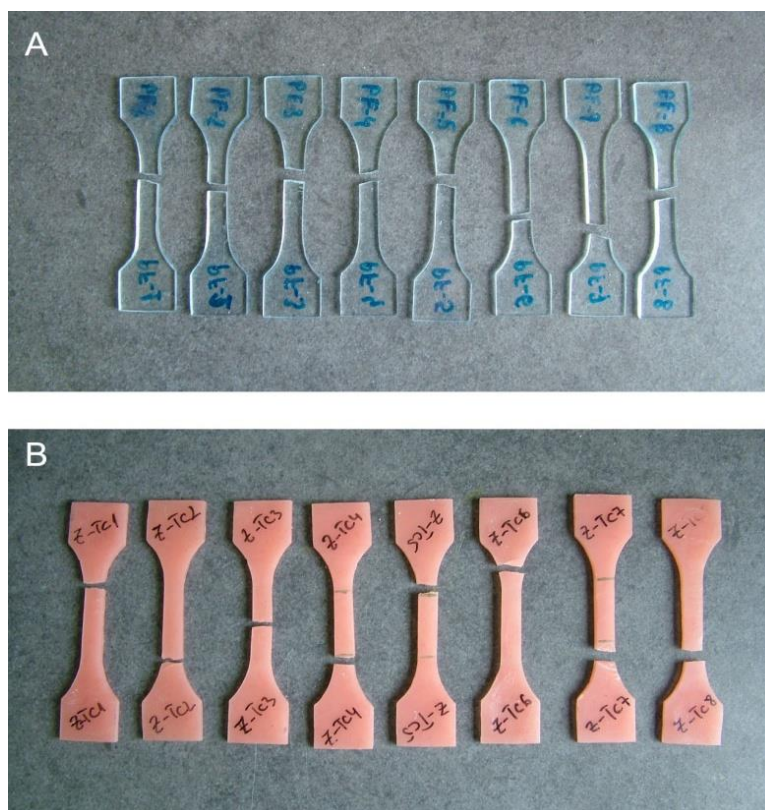
Slika 17. prikazuje polomljene uzorke iz grupe TF i C. Na slici se može videti da je frakturna pukotina u grupi TF nasumično raspoređena, dok se u grupi C nalazi blizu ramena uzorka. Rezultati maksimalnog istezanja prikazani su na slici 18 i tabeli 20. Uzorci iz grupe H i TF pokazali su slično ponašanje (srednja vrednost ovog parametra je skoro identična), dok je znatno niža vrednost dobijena u grupi C.

Tabela 19. Srednja zatezna čvrstoća, standardna devijacija i odgovarajući statistički parametri

Grupa	Sred.vred.	Std	Grupacija*		
	R _m [MPa]				
C	67,94	6,06	A		
H	73,46	4,53	A		
AR	59,46	3,90	B		
TF	60,58	3,69	B		
Izvor	DF	SS	MS	F	P
Faktor	3	1299,8	433,3	20,12	0,000
Greška	36	775,2	21,5		
Ukupno	39	2075,1			

*različita slova pokazuju statistički značanu razliku među rezultatima

Slika 17. Lokalizacija pukotine na uzorcima zatezne čvrstoće: a) Biocryl C (posle termopresovanja), b) Triplex hot



Slika 18. Maksimalno istezanje ispitivanih materijala sa standardnom devijacijom i rezultatima statističke analize (srednje vrednosti koje nisu označene istim slovom se statistički razlikuju)

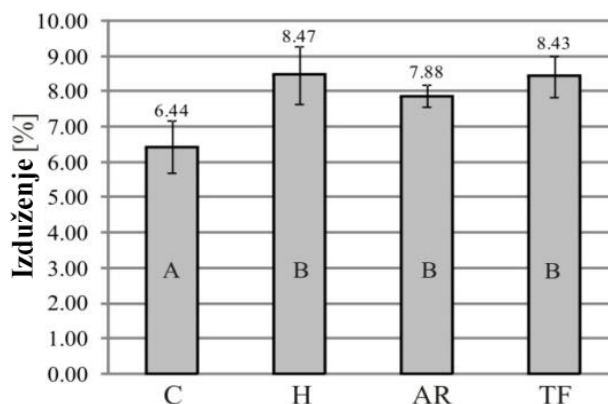


Tabela 20. Srednja vrednost istezanja, standardna devijacija i odgovarajući statistički parametri

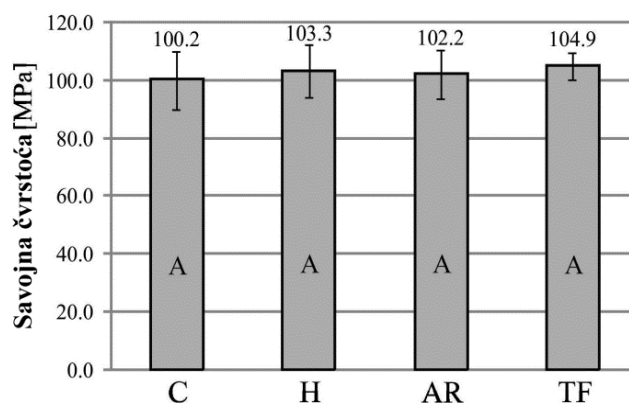
Grupa	Sred.vred.	Std	Grupacija*		
A [%]					
C	6,44	0,74	A		
H	8,47	0,80	B		
AR	7,88	0,30	B		
TF	8,43	0,57	B		
Izvor	DF	SS	MS	F	P
Faktor	3	21,668	7,223	17,86	0,000
Greška	36	11,326	0,404		
Ukupno	39	32,994			

*različita slova pokazuju statistički značajnu razliku među rezultatima

Na slici 19 i tabeli 21 prikazani su rezultati savojne čvrstoće. Najveća zatezna čvrstoća zabeležena je u grupi TF, dok je najniža u grupi C. Standardna devijacija je najmanja u grupi TF, ali statističkom analizom nije utvrđena razlika između poređenih grupa.

Rezultati čvrstoće loma prikazani su na slici 20 i tabeli 22. Zabeležena je značajna razlika između grupa sa najvećom i najmanjom čvrstoćom loma (C i H), unatoč najmanjoj standardnoj devijaciji u tim grupama. Takođe primetna je manja vrednost čvrstoće loma termopresovanog materijala u odnosu na nepresovan (TF u odnosu na AR).

Slika 19. Savojna čvrstoća ispitivanih materijala sa standardnom devijacijom i statističkom analizom (srednje vrednosti koje nisu označene istim slovom se statistički razlikuju)



Kod određivanja mikrotvrdoće, najveće vrednosti dobijene su u grupi A, što je prikazano na slici 21 i tabeli 23. Rezultati prikazuju da grupe H, AR i TF imaju značajno višu mikrotvrdoću u odnosu na grupu C. Takođe, standardna devijacija je najveća u grupi C.

Tabela 21. Srednja savojna čvrstoća, standardna devijacija i odgovarajući statistički parametri

Grupa	Sred.vred.	Std	Grupacija*		
	σ [MPa]				
C	100,23	10,05	A		
H	103,27	9,00	A		
AR	102,23	8,33	A		
TF	104,88	4,69	A		
Izvor	DF	SS	MS	F	P
Faktor	3	113,8	37,9	0,56	0,648
Greška	36	2460,0	68,3		
Ukupno	39	2573,9			

* različita slova pokazuju statistički značajnu razliku među rezultatima

Slika 20. Čvrstoća loma ispitivanih materijala sa standardnom devijacijom i statističkom analizom (srednje vrednosti koje nisu označene istim slovom se statistički razlikuju)

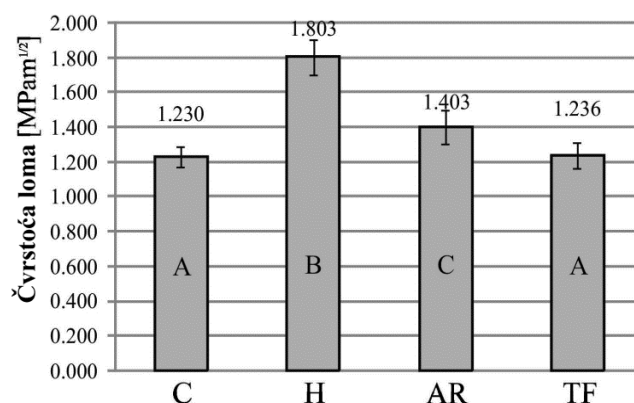


Tabela 22. Srednja čvrstoća loma, standardna devijacija i odgovarajući statistički parametri

Grupa	Sred.vred.	Std	Grupacija*		
	K _{IC} [MPam ^{1/2}]				
C	1,230	0,06	A		
H	1,803	0,10	B		
AR	1,403	0,09	C		
TF	1,236	0,08	A		
Izvor	DF	SS	MS	F	P
Faktor	3	2,17068	0,72356	102,12	0,000
Greška	36	0,25506	0,00709		
Ukupno	39	2,43574			

* različita slova pokazuju statistički značajnu razliku među rezultatima

Slika 21. Mikrotvrdoća ispitivanih materijala sa standardnom devijacijom i statističkom analizom (srednje vrednosti koje nisu označene istim slovom se statistički razlikuju)

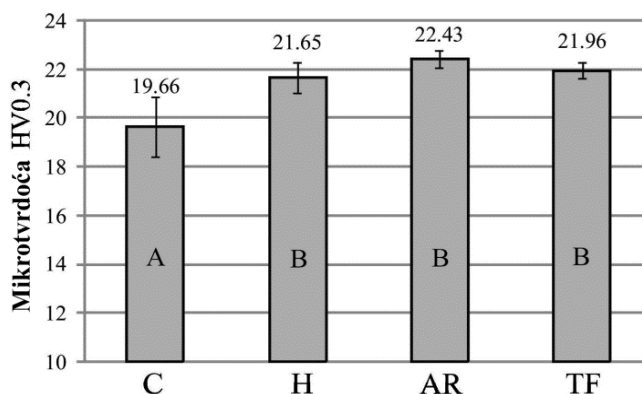


Tabela 23. Srednja mikrotvrdoća, standardna devijacija i odgovarajući statistički parametri

Grupa	Sred.vred. HV0.3	Std	Grupacija*		
C	19,66	1,22	A		
H	21,65	0,63	B		
AR	22,43	0,35	B		
TF	21,96	0,31	B		
Izvor	DF	SS	MS	F	P
Faktor	3	44,62	14,87	28,22	0,000
Greška	36	18,97	0,527		
Ukupno	39	63,59			

* različita slova pokazuju statistički značajnu razliku među rezultatima

4. DISKUSIJA

4.1 Ispitivanje citotoksičnosti

Ispitivanjem citotoksičnosti polimera za bazu zubne proteze nije dokazana značajna toksičnost u odnosu na pripadajuću grupu akrilata. Ogled vršen na MRC 5 ćelijskoj kulturi pokazao je da sva tri materijala (hladno, toplopolimerizujući i termoplastični akrilat) imaju zadovoljavajući stepen biokompatibilnosti, koji ni u jednom ekstrakcionom periodu nije iznosio manje od 75%, ili više od 125% vijabilnosti ćelija. Najveće odstupanje primećuje se kod eluata nastalih ekstrakcijom tokom 3 dana. U ovom periodu je kod svih materijala zabeležena najmanja vijabilnost, posebno kod grupe Cold u kojoj je iznosila 87%. Razlog povećane citotoksičnosti može biti povećana količina RM, sastavnih komponenti (benzoi peroksid, nn-dimetil toluidin) i raspadnih produkata (metakrilatna kiselina, benzoična kiselina, dibutil ftalat) dokumentovanih u literaturi (46,37,110). Procentulana zastupljenost RM definisana je ISO standardom. Dozvoljena količina RM za hladnopolimerizujuće akrilate iznosi 4,5%, a za ostale grupe 2,5%, pa je i prema standardu najmanja vijabilnost očekivana u grupi hladnopolimerizujućih akrilata (66). U literaturi postoje puno oprečenih mišljenja o toksičnosti akrilata u odnosu na vrstu akrilata. Pojedini autori smatraju da su hladnopolimerizujući akrilati najtoksičniji, dok je mišljenje drugih da toksičnost zavisi od sastava samog materijala, a ne od načina polimerizacije (18,111). Istraživanje Kedjaruna et al. pokazalo je da količina RM varira u zavisnosti od početnih komponenti materijala. Utvrđeno je da se kod hladnopolimerizujućih akrilata veća količina RM nalazi unutar samog materijala, u odnosu na toplopolimerizujuće, dok je količina RM u pljuvački kod hladnopolimerizujućih bila manja (112).

Toksičnost koja zavisi od koncentracije rezidualnog monomer dokazana je u nekoliko studija (59,65). U prvoj od navedenih, vijabilnost gingivalnih fibroblasta merena je pomoću MTT testa, u kojoj su najniže vrednosti zabeležene kod eluta sa povećanom koncentracijom, posebno kod toplopolimerizujućeg akrilata (Triplex Hot). U navedenoj studiji, koncentracija eluata od 50% je kod svih materijala dovela do patoloških promena ćelija u vidu filopodičnih produžetaka i smanjene adherence, najviše kod toplopolimerizujućih akrilata (Triplex Hot) a znatno manje kod hladnopolimerizujućih (65). U prezentovanom istraživanju eluati sa dužim ekstrakcionim periodom su bili manje toksični. Vijabilnost ćelija kod sva tri ispitivana materijala proporcionalno se povećavala tokom ekstrakcionog perioda od 21 dana. Opadanje toksičnosti sa produžavanjem ekstrakcionog perioda može se objasniti interakcijom supstanci oslobođenih iz akrilata sa sastojcima ekstrakcionog medijuma. Ovakav nalaz u saglasnosti je sa nalazima prethodnih istraživanja (18,113,114,115).

Treba naglasiti da su sve ćelije inkubirane sa određenim eluatom tokom 48 sati, pri čemu se povećavao ekstrakcioni period, a ne dužina inkubacije ćelija, što potvrđuje da je došlo do

smanjenja koncentracije štetnih materija u eluatu, a odrazilo se porastom vijabilnosti ćelija (57). Posle 7 dana, vijabilnost kod sva tri materijala prelazi 100%, koju čini kontrola, i raste od 108% (Cold) do 123% (Biocirl C)posle 21 dana. Povišene vrednosti nalaze se unutar granica prihvatljivosti. Porast proliferacije ćelija preko 100% može se smatrati prvim indikatorom potencijalnog mutagenog delovanja, međutim to se ne može utvrditi kod kratkih vremenskih perioda, kao što je 48 sati inkubacije i zahteva dodatna ispitivanja. Rezultati ranijih istraživanjima su ukazivali na to da akrilati imaju mutageno i teratogeno delovanje, dok savremena istraživanja nisu utvrdila povezanost akrilata sa mutagenim i teratogenim efektom (22,116,117). U naučnoj javnosti još uvek ne postoji usaglašen stav o teratogenom i mutagenom dejstvu akrilata. Pojedine komponente akrilata mogu stimulatивно da deluju na određene vrste bakterija, pa je moguća slična stimulacija i na proliferaciju ćelija, s tim da treba imati na umu da je MRC 5 kultura sačinjena od malignih ćelija kod kojih je reproduktivni potencijal povećan (45).

Koncentraciono zavisna toksičnost dokazana je i kod L929 mišjih fibroblasta, kontinuirane ćelijske linije, s tim da je u ovoj ćelijskoj kulturi najveća vijabilnost zabeležena u grupi Cold, što je suprotno sa konvencionalnim shvatanjem o citotoksičnosti akrilata. U naučnoj javnosti konsensus o citotoksičnosti akrilata ne postoji, pa se kao krajnji zaključak navodi da to najviše zavisi od sastava i polimerizacionog ciklusa materijala, a manje zavisi od vrste akrilata (20,113,118). Isti metodološki pristup u smislu vrste korišćene kulture (L929) i u smislu procene biološkog ishoda (MTT test) imao je Ata et al (119). U njihovoj studiji nije bilo razlike između hladno i topopolimerizujućeg akrilata u citotoksičnosti, a vijabilnost se sa produženjem ekstrakcionog perioda povećavala tokom 7 dana.

Obe ćelijske kulture korišćene u ispitivanju spadaju u grupu permanentnih fibroblasta, što je značajno sa eksperimentalnog i kliničkog stanovišta. Permanentne ćelijske kulture pogodne su za ispitivanje citotoksičnosti zbog visoke reproducibilnosti i pouzdanog metodološkog pristupa, zbog čega su i svrstane u ISO standard (120). Njihov klinički značaj predstavljen je u sposobnosti fibroblasta da sintetišu kolagen, osnovnu građivnu supstancu vezivnog tkiva, koji pored potporne uloge za epitel, ima značaj kod erozija ili dekubitalnog ulkusa kada fibroblasti dolaze u direktan kontakt sa bazom proteze. Nedostatak ispitivanja na ćelijskim kulturama odnosi se na reakciju samih ćelija na prisutan nadržaj, koji može dovesti do podleganje ćelije povredi ili do oporavka ćelije od toksične povrede, koja nastaje unutar prvih 12-24 sata od nastale ekspozicije. Mnoge reakcije u organizmu traju duže od 24 sata, pa ispitivanja in vivo bolje pokazuju vremenski uticaj toksičnosti izražen u vidu inflamacije i imunološke reakcije živog organizma, u odnosu na ćelijske kulture (36).

Izloženost organizma akrilatima može biti direktna (sluzokoža, koža, eritrociti) i indirektna (preko pljuvačke). U prezentovanom istraživanju reprodukovana su oba načina izlaganja koja se javljaju u in vivo uslovima. Direktna citotoksičnost određena je zasejavanjem ćelijske kulture na podlogu petrijeve šolje i poklapanjem sa uzorkom materijala, dok je indirektna određena pomoću eluata. Dodatno, urađen je i Agar overlej test. U prezentovanom istraživanju rezultati testiranja direktnog kontakta materijala sa ćelijama, kontakta preko eluata i pomoću

Agar difuzionog testa, ne pokazuju postojanje citotoksičnog, niti proliferativnog efekta testiranih materijala. Agar overlej testom, kao najmanje senzitivnim od svih korišćenih testova u ovom istraživanju, dobijeni su potpuno negativni rezultati za sve ispitivane materijale. Takav nalaz je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (60,62). Time je opravdano korišćenje dodatnih, senzitivnijih testova. U literaturi se navodi da je način kontakta sa ćelijskom kulturom značajan faktor koji utiče na krajnje vrednosti biološkog ishoda (57,59). U istraživanju Thang et al. procenjeno je da uticaj direktnog kontakta materijala može smanjiti vijabilnost ćelija i do 40%, zbog neposrednog delovanja otpuštajućih supstanci kao i kvaliteta površinske obrade (57). U prezentovanom istraživanju kod direktnog kontakta, kontakt ćelija sa materijalom bio je ostvaren tokom 24 sata, posle čega je sledilo odvajanje ćelija i dodatna inkubacija od 48 sati. Dodatno vreme inkubacije verovatno je doprinelo oporavku ćelija i dobijanju rezultata koji se nisu razlikovali od rezultata dobijenih kontaktom ćelija sa ispitivanim materijalom preko eluata, što serazlikuje u odnosu na istraživanje Thang-a et al (57).

U tabeli br.16 prikazana je površinska hrapavost korišćenih materijala sa приметnim razlikama između postojećih grupa. Najmanju hrapavost imao je Biocril, dok su ostala dva materijala bila slična. Izmerene razlike hrapavosti od $\approx 0,2 \mu\text{m}$ kod Biokrila, nisu pokazale приметan uticaj na vijabilnosti ćelija u poređenju sa ostalim materijalima, što se može objasniti sličnom površinskom strukturom kao i skraćenom vremenu kontakta. Produženo vreme kontakta kao i različiti načini površinske obrade pružili bi više informacija o uticaju površine na adherencu ćelijskih kultura, što će biti predmet daljih istraživanja.

Ispitivanje biološkog ishoda ćelijskih kultura najčešće se radi MTT i H-timidin testom. MTT beleži aktivnost mitohondrijalnih enzima svih ćelija, dok H-timidin beleži replikaciju DNK kod ćelija koje se dele. Testovi se međusobno dopunjuju pa ih je najbolje koristiti uporedo, zbog dokazano različitih rezultata koje zavise od samog testa (46). U svom radu Chaves et al. prikazali su značaj oseljivosti testova biološkog ishoda, što može dati lažnu sliku o citotoksičnosti materijala (46). Vijabilnost se razlikovala i do 50% zavisno od korišćenog testa, u ovom slučaju MTT i H-timidin test. Navodi se da je H-timidin test senzitivniji ali komplikovaniji za izvođenje, dok je MTT manje senzitivnan ali jednostavniji. MTT obuhvata metaboličke procese unutar ćelija, što doprinosi većoj reproducibilnosti i širem spektru informacija o toksičnosti materijala pa se više koristi za skrining, dok H-timidin test zbog svoje osetljivosti treba koristiti ciljano za ispitivanje određenog, posebnog uticaja (121). Poređenje rezultata našeg istraživanja sa ostalima koji su koristili MTT test, utvrđeno je daje kod MRC 5 ćelija hladnopolimerizujući akrilat pokazao veću toksičnost u odnosu na toplopolimerizujući i termoplastični, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima, dok je kod L929 mišjih fibroblasta rezultat bio obrnut (63,64,65). MRC 5 fibroblasti su prema našim istraživanjima senzitivniji na akrilatne smole od L929 ćelijske linije, ali pregledom literature nisu nađeni radovi u kojima je korišćena ćelijska linija MRC 5 za testiranje citotoksičnosti akrilata. Iz tog razloga nije moguće napraviti direktno poređenje prezentovanih rezultata sa rezultatima drugih autora, čime se dodatno doprinelo originalnosti istraživanja.

U prezentovanom istraživanju urađen je i Agar difuzioni test, sa ciljem reprodukcije direktne citotoksičnosti koji baza proteze može da vrši na sluzokožu potpornih tkiva. Pregledom literature pronađena su samo tri rada koja su koristila ovaj metodološki pristup, iako je definisan ISO standardom (60,61,62,66). Metodološki pristup zasniva se na penetraciji otpuštajućih supstanci materijala kroz sloj Agara, koji se u ovom slučaju nije pokazao kao dovoljno senzitiv. Agar predstavlja slabo propusnu membranu za potencijalno toksične supstance, pa se ne može tačno odrediti njihov uticaj (62). Dodatni razlog može biti prisustvo formaldehida, koji nastaje kao nusprodukt polimerizacije posebno kod hladnopolimerizujućih akrilata. Formaldehid vrši mumifikaciju ćelija, pa standardnim metodama određivanja vijabilnosti, kao što je brojanje ili Agar difuzioni test, može doći do maskiranja rezultata.

Sastav akrilata za bazu zubne proteze razlikuje se prema nameni i načinu polimerizacije. Materijali za podlaganje zubne proteze dokazano imaju povećanu citotoksičnost od akrilata za bazu zubne proteze (46). Pored dobro dokumentovanog uticaja RM na vijabilnost ćelija, takođe je dokazana izražena citotoksičnost raspadnih produkata lajnera, IBMA i 1,6 HDMA (Isobutil metakrilat i heksaendiol metakrilat). Pri konc od 10 μ mola, oba testa (MTT i H-timidin) su u navedenom istraživanju pokazala izraženo toksično delovanje pomenutih jedinjenja (46). Od sastavnih komponenti akrilata za bazu proteze, značajan je uticaj benzoične kiseline (raspadni produkt benzoil peroksida) metakrilatne kiseline (raspadni produkt metil metakrilata) i dibutil ftalata (koristi se kao plastifikator). Kod sve tri komponentne primećena je niska vijabilnost kod oba testa, iako su zabeležene međusobne razlike. To govori u prilog tome da negativan uticaj ne zavisi samo od RM, nego treba sagledati i ostale raspadne produkte, koji u malim koncentracijama mogu značajno da utiču na zdravlje potpornih tkiva (122). O uticaju formaldehida bilo je više istraživanja, mada je njegovo prisustvo dokazano samo kod hladnopolimerizujućih akrilata (18,49). Formaldehid u malim koncentracijama dovodi do značajne promene vijabilnosti, ili do maskiranja rezultata, kao što je prethodno navedeno. Otpuštanje toksičnih supstanci iz akrilata je najizraženije tokom prvih 24 sata posle završene polimerizacije, pa se u navedenom periodu preporučuje potapanje proteze u vodu radi smanjenja mogućeg toksičnog uticaja (114,122). Dodatna postpolimerizacija može se vršiti i mikrotalasnim zračenjem (47). Ispitivanje tako dobijenog akrilata biće tema narednih istraživanja.

Originalan doprinos nauci daje i činjenica da se u dostupnoj literaturi ne mogu pronaći rezultati ispitivanja uticaja akrilata za bazu proteze na ćelijsku liniju preko eluta za period ekstrakcije duži od 7 dana, dok je u prezentovanom istraživanju period ekstrakcije varirao od 3 do 21 dan.

4.2 Test subkutane implantacije

Rezultati in vitro istraživanja nisu pokazali značajne razlike u citotoksičnosti materijala, bez obzira na način kontakta sa ćelijskom kulturom. Dodatna evaluacija rađena je u in vivo uslovima na eksperimentalnim životinjama, zbog mogućnosti praćenja kompleksnog

imunološkog odgovora organizma. Subkutana implantacija odabrana je kao pouzdan model ispitivanja biokompatibilnosti stomatoloških materijala (72). Cilj in vivo istraživanja, bio je dodatna provera i poređenje sa in vitro rezultatima, imajući na umu slučaj različite biokompatibilnosti ZOE paste za opturaciju kanala zuba, u in vitro i in vivo uslovima (68,123). Metodološki postupak i evaluacija rezultata rađeni su u skladu sa standardom ISO 10993 (33). Korekcije u odnosu na standard napravljene su u tabelarnom prikazu rezultata, pri čemu su parametri kao prisustvo plazmocita, neutrofila i masne degeneracije zbog njihovog odsustva odstranjeni iz tabele, i zamenjeni sa prisutnim parametrima inflamacije u vidu eozinofila, mastocita i debljine kapsule.

Analiza stepena biokompatibilnosti implantiranih materijala vršena je iz dva ugla, i to iz ugla hemijskog sastava materijala i iz ugla mehaničke iritacije. Posmatrano iz oba ugla, in vitro rezultati nisu pokazali značajne razlike među ispitivanim materijalima, shodno tome slični rezultati očekivani su in vivo. Kod većine posmatranih parametara, to je i potvrđeno.

Implantirani materijali razlikovali su se prema sastavu i načinu polimerizacije. U skladu sa ISO 20795 i brojnim in vitro istraživanjima, očekivano je da hladnopolimerizujući akrilati imaju najniži stepen biokompatibilnosti in vivo, iako o tome nije postignut konsenzus naučne javnosti (18,66,63,64,65). Manji stepen biokompatibilnosti hladnopolimerizujućih akrilata najviše se pripisuje nižoj temperaturi polimerizacije, sa smanjenom konverzijom monomera i povećanom količinom RM i raspadnih produkata (46). Ovakvi rezultati zabeleženi su i u prethodnim in vivo istraživanjima (23). Nedostaci tih istraživanja odnose se na metodološki pristup koji ni u jednom slučaju nije bio u skladu sa ISO 10993 (33). Pored toga, treba naglasiti da je ukupan broj objavljenih in vivo istraživanja mali, što predstavlja ozbiljan nedostatak u nauci, imajući na umu široku rasprostranjenost akrilata i njihovu dugotrajnu primenu. Iz tog razloga postoji potreba za istraživanjem u ovoj oblasti, a samim tim potvrđuje značaj prezentovanog istraživanja i njegovu naučnu opravdanost. Pored hladnopolimerizujućeg akrilata, u istraživanju je takođe korišćen toplopolimerizujući i termoplastični akrilat. Očekivano je da oba materijala imaju veći stepen biokompatibilnosti, posebno termoplastični koji prema navodima proizvođača ne poseduje RM i u skladu sa tim od njega su očekivani najbolji rezultati.

Implantacioni periodi podeljeni su na tri vremenska intervala, koji su iznosili 15, 30 i 90 dana. U toku prvog i drugog implantacionog perioda bila je prisutna primarna hronična inflamacija, koja se nije bitno razlikovala između ispitivanih materijala. Prisustvo džinovskih ćelija u prvom i broj limfocita u drugom vremeskom intervalu, su jedini parametri koji su se kod grupe biocril pokazali boljim u odnosu na ostale materijale. Ostali parametri nisu pokazali veće razlike između ispitivanih materijala, inflamacija je bila minimalna, u nekim slučajevima umerena. Najmanji broj eozinofila zabeležen je kod kontrolne grupe teflon, dok je po broju limfocita, makrofaga i neovaskularizaciji, kontrolna grupa teflon bila dominantnija u odnosu na ostale materijale. Teflon je odabran kao hemijski inertan materijal, pa povećan stepen inflamacije u prva dva perioda može se pripisati kvalitetu površine materijala, koja se bitno razlikovala u

odnosu na ostale materijale, kao što se može videti u tabeli o površinskoj hrapavosti (tabela 16). Očekivano najlošiji materijal (grupa cold) nije pokazao značajna odstupanja u odnosu na ostale grupe materijala, pa se može zaključiti da uticaj potencijalno štetnih agenasa nastalih ubrzanim postupkom polimerizacije, nije od veće značajnosti kod kompleksnih živih organizama. U sklopu istraživanja nije rađenomerenje RM, međutim isti materijali korišćeni su u studiji Kostic et al., pa su njihovi rezultati uzeti u obzir tokom tumačenja prezentovanih rezultata (124). U navedenoj studiji toplopolimerizujući akrilat (Triplex Hot) imao je 1.2 % RM, dok je kod hladnopolimerizujućeg (Triplex Cold) zabeleženo 9% RM. Metodološka razlika u prezentovanom istraživanju nalazi se u polimerizacionom ciklusu hladnopolimerizujućeg akrilata, u kom je polimerizacija obavljena pod pritiskom od 3 bara, što se razlikuje u odnosu na pomenuto istraživanje gde je polimerizacija vršena pod atmosferskim pritiskom. Pritisak pospešuje konverziju monomera, što doprinosi smanjenju RM i sledstveno tome većoj biokompatibilnosti. U prethodnim in vivo istraživanjima nije vršena polimerizacija pod pritiskom, čime se u odnosu na njih može objasniti primetno blaža inflamatorna reakcija hladnopolimerizujućeg akrilata u prezentovanom istraživanju (23). Polimerizacija hladno polimerizujućeg akrilata pod pritiskom od 3 bara, predstavlja jednostavan metod koji može poboljšati biokompatibilnost akrilata i može se preporučiti za svakodnevni laboratorijski rad.

Aktivna inflamacija zabeležena je samo u jednom slučaju, za čega razlog najverovatnije leži u oportunističkoj infekciji, zato što su eksperimentalne životinje bile smeštene u kavezima po pet, gde je postojala mogućnost međusobnog povređivanja, kao što je to bilo u dva odbačena slučaja zbog dehiscencije šavova.

Razlike između ispitivanih materijala primetnije su u trećem implantacionom periodu, iako su zbog malog broja ispitivanih jedinki u većini slučajeva ispod statističke značajnosti. Samo u jednom slučaju statistički je dokazana razlika između materijala, predstavljena u vidu smanjenog broj makrofaga kod grupe hot u odnosu na grupe biocril i teflon (tabela 10,11). Poređenje rezultata u trećem implantacionom periodu sa prva dva perioda, ukazuje na smirivanje inflamacije koja je statistički dokazana kod grupe hot, u vidu smanjenog broja džinovskih ćelija, i kontrolne grupe teflon u vidu smanjene neovaskularizacije (tabela 12-15). Iako je većina rezultata ispod statističke značajnosti, analizom tabele uočava se trend opadanja ćelijskih medijatora inflamacije i nastanak zalečenja u vidu reparacije i inkapsulacije implantiranog materijala, što se može videti na histološkim preparatima. To se najviše primeti u trećem implantacionom periodu, koji se manifestuje povećanom fibrozom kapsule i smanjenom neovaskularizacijom. Pored toga u trećem implantacionom periodu primetna je veća konzistentnost rezultata sa manjim odstupanjima, što doprinosi utisku o smirivanju inflamacije i uspešnoj odbrani okolnog tkiva. Kod svih materijala došlo je do opadanja ukupnog skora inflamacije i odgovora tkiva u periodu od 90 dana, izuzetak je samo grupa biocril pri čemu treba imati na umu da se u poslednjem ispitivanom vremenskom periodu svakoj grupi nalazi jedna eksperimentalna životinja više. Najniži ukupni skor zabeležen je kod toplopolimerizujućeg akrilata (grupa hot). To je suprotno očekivanju da će termoplastični akrilat (grupa biocril) zbog nedostatka RM imati najveći stepen biokompatibilnosti. Grupa hot je posle 90 dana pokazala

povoljnije rezultate čak i od teflona, a razlog se verovatno nalazi u površinskoj hrapavosti teflona, kao što je ranije navedeno. Smanjenje inflamacije tokom vremena potvrđeno je istraživanjem Kallusa, pri čemu se navodi da je ono uzrokovano otpuštanjem i preraspodelom rastvorivog RM, prouzrokovanog limfnom drenažom i eliminacijom iz organizma (23). Nerastvoriv RM koji se oslobađa biodegradacijom materijala, verovatno nije bio prisutan, zbog nedostatka mastikatornih sila i povoljnijih uslova sterilne sredine u odnosu na usnu duplju. Sve navedeno govori u prilog da je zapaljenje od početke imalo dominantno proliferativni karakter, što je karakteristično za primarno hronična zapaljenja oko stranog tela.

Drugi značajan faktor u odgovoru tkiva na implantirani materijal je kvalitet kontaktne površine t.j hrapavost uzorka. Hrapavost utiče na biokompatibilnost na dva načina, mehaničkom iritacijom i promenom ugla kvašenja. Uzorci materijala implantirani su u subkutane džepove nastale tupom disekcijom sa ograničenom slobodom pokreta. Kontrakcijom skeletnih mišića dolazilo je do malih pomeranja i frikcije uzorka sa okolnim tkivom, pa je očekivano da materijal sa većom hrapavošću prozrokuje veću mikrotraumu, kao što se desilo kod teflona u prvom implantacionom periodu. Imobilizacija uzorka nastala je u toku vremena od strane samog organizma, zadebljanjem i fibrozom kapsule. Poređenjem prvog i trećeg implantacionog perioda kod teflona, osetno je smanjenje reakcije okolnog tkiva, koja u kasnijem periodu verovatno više zavisi od hemijskog sastava materijala u odnosu na mehaničku iritaciju.

Kvalitet površine utiče na biokompatibilnost materijala i promenom ugla kvašenja. Kvašenje je pojava kada dolazi do slaganja adhezivne i kohezivne sile na spoju tri agregatna stanja čvrstog, tečnog i gasnog. Najpogodnija površina za kvašenje je idealno ravna, shodno tome zavisi od kvaliteta ispoliranosti (78,125). Kod neravnih površina sloj vazduha ostaje inkorporiran ispod mesta gde čvrsto telokontaktira sa tečnošću, pri čemu dolazi do narušavanja adhezivne sile i predomnaciji kohezivne, što se manifestuje povećanjem ugla kvašenja i slabljenjem interakcije okoline sa materijalom. Subkutano implantirani uzorci nalazili su se u vlažnoj sredini, pri čemu adhezija intersticijalne tečnosti zavisi od ugla kvašenja. Uspešna integracija materijala sa okolinom zahteva urastanje i prožimanje tkiva oko implantiranog materijala, što je nemoguće u slučaju visokog površinskog napona tečnosti, koji dovodi do smanjenja ugla kvašenja. Površinski napon čvrstih tela definiše se kao površinska energija (79). Uspešno kvašenje zahteva visoku površinku energiju tela i nizak površinski napon tečnosti. Površinska energija pomoću istog principa deluje na konformaciju proteina iz tečnosti, stvarajući sa njima elektrostatičku vezu (78). Mobilnost polimernih lanaca dovodi do bolje adhezije proteina što smanjuje inflamatornu reakciju i dovodi do deponovanja kolagenih vlakana. Dobar pokazatelj pokretljivosti lanaca je Tg, ali mehanizmi nastanka i uticaja mikromolekularnih činilica prevazilaze okvire ove diskusije (79,125).

4.3 Test oralne iritacije sluzokože

Ispitivanje iritacije oralne sluzokože odabran je kao pogodan model za ispitivanje polimera za bazu zubne proteze. Prisustvo pločastoslojevitog epita sa orožavanjem, koji se nalazi u bukalnoj kesici hrčka, odgovara tvrdom nepcu i gingivi koji predstavljaju potporna tkiva za ležište zubne proteze (83,84). U istraživanju je odabran materijal za koji se očekivalo da će postići najbolje rezultate (Biokril), najlošije rezultate (Cold) i njihova međusobna kombinacija (Bio/Cold). Kombinacija termoplastične folije sa hladnopolimerizujućim akrilatom odabrana je zbog kliničke relevantnosti, gde se baza proteze pravi od termoplastične folije a rubovi formiraju ulivanjem hladnopolimerizujućeg akrilata.

Istraživanje je vršeno u periodu od 21 dana, tokom kojih dnevna ekspozicija sa materijalom je iznosila 12 sati, kao što je očekivano za nosioce zubnih proteza. Retencija uzorka vršena je plastičnom ogrlicom, pri čemu su zabeleženi rezultati od 89 do 91%, što se smatra uspešnim u poređenju sa ostalim istraživanjima, gde je retencija iznosila 6.4%, 48% i 97% (85,86). Pored toga prednost metode nazali se u izostanku hirurške intervencije kod fiksiranja uzorka za bukalnu kesicu, čime je eliminisan uticaj reparacije tkiva kao što je bio slučaj u pojedinim istraživanjima (85,86). Makroskopskim pregledom nije zabeleženo prisustvo patoloških promena, dok je kod mikroskopskog pregleda u pojedinim slučajevima zabeležena minimalna inflamacija. Od posmatranih parametara, prisustvo edema i leukocitna infiltracija zabeležni su podjednako u eksperimentalnoj grupi i u prvoj negativnoj kontroli. Prvu negativnu kontrolu činila je prazna bukalna kesica, pa razlog zabeležene inflamacije se najverovatnije nalazi u mehaničkoj iritaciji hranom. Originalnost metodološkog pristupa ogleđa se u izradi histoloških preparata. Bukalna kesica hrčka je umotavana na štapić i stavljena u fiksativ. Posle toga sledilo je dehidriranje, kalupljenje i sečenje na mikrotomu. Poprečnim sečenjem kalupa omogućeno je sagledavanje svih slojeva bukalne kesice i bolja analiza preparata. U dostupnoj literaturi ovakav način pripreme preparata nije do sada zabeležen. Opravdanost za korišćenje modela bukalne kesice sirijskog hrčka, nalazi se u histološkoj sličnosti sa tkivima usne duplje. Rezultati istraživanja pokazuju da je pločastoslojeviti epitel sa orožavanjem koji se nalazi u bukalnoj kesici, rezilijentna podloga sa dobrom imunološkom zaštitom. Visoka rezilijenca pokazala se kao prepreka za analizu subtilnih uticaja koji se očekuju od ovih vrsta materijala, pa se može zaključiti da model iritacije oralne sluzokože, iako načelno pogodan, nije dovoljno senzitiv za ispitivanje akrilata za bazu zubne proteze, nego predstavlja samo prvi skrining test, nakon koga je ipak neophodno uraditi i ostale testove za ispitivanje biokompatibilnosti.

4.4 Ispitivanje mehaničkih karakteristika

Konvencionalni postupci pravljenja baze proteze obuhvataju hladno i topopolimerizujuće materijale. Savremeniji tehnološki postupci kao što je svetlosna, mikrotalasna polimerizacija ili tehnika termoplastičnog presovanja, imaju za cilj dobijanje materijala boljih karakteristika u vidu povećane otpornosti i većeg stepena biokompatibilnosti. Pošto se konverzija monomera u

dugačke lance polimera ne odvija u potpunosti, što se odražava na slabije mehaničke karakteristike kao i smanjenu biokompatibilnost, cilj usavršavanja novih materijala usmeren je na smanjenje rezidualnog monomera, uz brže i lakše rukovanje sa materijalom. Rezidualni monomer procesom difuzije vremenom se otpušta u usnu duplju, što se manifestuje smanjenom otpornošću materijala kao i mogućim negativnim uticajem na zdravlje oralne sluzokože u vidu iritacije i alergijske reakcije (10,11,63,126). U zavisnosti od načina polimerizacije, neophodna je dodatna standardizacija postupaka pravljenja proteza kako bi odstupanja kod materijala bila minimalna, čime bi se dobijale proteze jednakog kvaliteta. Zbog složene interakcije različitih bioloških i mehaničkih činioca u usnoj dupli, ponašanje materijala se može lakše predvideti ako se uzme u obzir korelacija njegovih pojedinačnih karakteristika (127,128). Podaci dobiveni korelacijom mogu da se koriste za detaljniju analizu materijala u isto vreme smanjujući vreme i cenu dodatnog ispitivanja svakog materijala ponaosob.

Cilj istraživanja je bio da se poredе konvencionalni hladno i toplopolimerizujući akrilati (H i C) sa novim PMMA materijalom, u dobijenom-fabrički polimerizovanom stanju i stanju posle termopresovanja (AR i TF). Evaluacija osobina ispitivanih materijala posmatrana je sa različitih aspekata, utemeljenih na detaljnom ispitivanju njihovih mehaničkih karakteristika.

Grupa C, koja obuhvata hladnopolimerizujuće akrilate, imala je najmanju elongaciju, savojnu čvrstoću, čvrstoću loma i mikrotvrdoću. Ovakvi rezultati su očekivani, s obzirom na ograničeno vreme mešanja pre nego što polimer postaje previše viskozан za dalju manipulaciju (94,95). Skraćeno vreme mešanja utiče na hemijsku reakciju polimerizacije, kada zbog ubrzanog postupka nastaju kraći lanci polimera. Pored toga, standardna devijacija je bila najveća među hladnopolimerizovanim akrilatima, sa izuzetkom testa čvrstoće loma, što dodatno potvrđuje slabo kontrolisan postupak polimerizacije. U poređenju sa hladnopolimerizujućim, mehaničke karakteristike toplopolimerizujućih akrilata (Grupa H) su znatno više, što je očekivano kod produženog vremena mešanja kao i dodatnog presovanja i vodene postpolimerizacije, čime se postiže smanjenje rezidualnog monomera (129). Lokalizacija frakturne pukotine se kod hladnopolimerizujućih nalazi u jednoj određenoj oblasti (na ramenu uzorka) što pokazuje da uzorci iz ove grupe imaju strukturne nedoslednosti.

Zatezna i savojna čvrstoća termopresovane grupe (TF) je viša u poređenju sa nepresovanom grupom (AR) sa manjim standardnim devijacijama. Dodatno, grupa AR ima veću mikrotvrdoću u poređenju sa grupom TF, ali je ova prednost ispod statističke značajnosti. Samo čvrstoća loma je kod grupe AR viša u odnosu na grupu TF. U poređenju sa ostalim grupama, TF ima značajno manju čvrstoću loma u odnosu na H i AR, a sličnu sa grupom C. To znači da materijali iz ove grupe su osetljiviji na opterećenje u prisustvu površinskih pukotina, i lakše dolazi do loma materijala. Iako zubne proteze teoretski ne bi trebalo da imaju površinske pukotine, u praksi se to dešava i postoji niz defekata koji narušavaju strukturnu konzistenciju materijala: poroznost, nehomogenost, nečistoće, površinske pukotine, itd (130). Standardne devijacije se kod testa čvrstoće loma ne mogu u potpunosti smatrati reprezentativnim, zato što je

inicijalna pukotina napravljena ručno a propagacija ručno napravljene pukotine iziskuje određeni stepen netačnosti. Međutim, prema dobijenim rezultatima može se zaključiti da grupa TF zahteva dodatno i pažljivije poliranje u odnosu na grupu H. Niske standardne devijacije zabeležene u grupi AR i TF, posledica su sinteze i polimerizacije u fabričkim uslovima. Takva priprema materijala je verovatno preciznija i tačnija od postupaka koji se vrše u zubnoj laboratoriji, gde faze izrade zavise od veštine tehničara.

Umereno povećanje zatezne i savojne čvrstoće, kao i elongacije uzoraka grupe TF u odnosu na AR, može biti rezultat parcijalne orijentacije polimernih lanaca tokom termopresovanja. Kod uzoraka kod kojih striktno dolazi do lokalne deformacije (mikrotvrdoća, čvrstoća loma), parcijalno orijentisanje lanaca može da smanji rezilijencu zbog negativnog uticaja na njihove sekundarne molekularne sile. Propagacija frakturne pukotine lakše se širi kod parcijalno orijentisanih lanaca (TF) u odnosu na nasumično raspoređene (AR). Rezultati ispitivanja takođe su potvrdili činjenicu da je kod krutih polimernih materijala savojna čvrstoća veća od zatezne. Pregledom literature može se naći nekoliko objašnjenja za ovu pojavu (131,132,133). Moguća interpretacija ove razlike može se naći u strukturi polimernog materijala t.j u vezama između individualnih komponenti monomera unutar dugačkih lanaca polimera, kao što su ugljenik-ugljenik sigma veze. Dodatno, komponente monomera imaju dipol usmeren pod pravim uglom u odnosu na dužinu lanaca (134). Dipol je uzrok odbijanja između paralelnih lanaca, što doprinosi savojnoj čvrstoći na makroskopskom nivou. Interakcija koja nastaje savijanjem, mora da nadjača odbijanje među lancima kao i da pokida veze između monomera kako bi došlo do loma materijala. Kod istezanja, dovoljno je da se pokidaju samo veze između monomera kako bi došlo do loma na makroskopskom nivou.

Posmatrano sa aspekta stomatološke struke, može se zaključiti da je novi PMMA materijal korišćen u ovoj studiji (AR, TH) pokazao je zadovoljavajuće rezultate u poređenju sa konvencionalnim sistemima (H, C). Prednosti navedenog materijala, strukturalna konzistentnost i lakoća rukovanja, pružaju pogodnosti zubnim tehničarima i lekarima tokom izrade mobilnih zubnih nadoknada. Buduće istraživanje biće usmereno na kliničku procenu karakteristika materijala, u odnosu na njihovu rezilijentnost i udobnost nošenja kod pacijenata.

5. ZAKLJUČCI

Prema rezultatima istraživanja o biokompatibilnosti i mehaničkim karakteristikama polimera za bazu zubne proteze doneseni su sledeći zaključci:

- Ispitivanjem citotoksičnosti hladnopolimerizujućih, toplopolimerizujućih i termoplastičnih akrilata, utvrđeno je da ni jedan materijal nije imao citotoksičan niti značajan proliferativni efekat.
- Rezultati ispitivanja citotoksičnosti na ćelijskoj liniji MRC 5 i L929 nisu pokazali značajne razlike između hladnopolimerizujućih, toplopolimerizujućih i termoplastičnih akrilata u smislu citotoksičnosti i proliferacije ćelija.
- Uočene su izvesne razlike u odgovoru ćelija dve različite ćelijske kulture, humane MRC5 i mišjih fibroblasta L929 na prisustvo akrilata za bazu zubne proteze.
- Način kontakta između materijala i ćelijske kulture nije uticao na povećanje citotoksičnosti.
- Ispitivanje biokompatibilnosti subkutanom implantacijom na eksperimentalnim životinjama, utvrđeno je da toplopolimerizujući akrilati pokazuju veći stepen biokompatibilnosti od hladnopolimerizujućih i termoplastičnih akrilata.
- Kod svih implantiranih materijala došlo je do opadanja inflamacije tokom perioda od 90 dana.
- Površinska hrapavost implantiranih materijala utiče na povećanje stepena inflamacije.
- Testom oralne iritacije sluzokože utvrđeno je da ni jedan ispitivani materijal ne izaziva iritaciju sluzokože.
- Test oralne iritacije sluzokože se nije pokazao kao dovoljno senzitivni model za ispitivanje razlike u stepenu biokompatibilnosti stomatoloških materijala.
- Mehaničke karakteristike termoplastičnih akrilata uporedive su sa hladnopolimerizujućim i toplopolimerizujućim akrilatima. Zatezna čvrstoća termoplastičnih PMMA akrilata značajno je niža u odnosu na hladnopolimerizujuće i toplopolimerizujuće akrilate. Čvrstoća loma termoplastičnih akrilata je niža od toplopolimerizujućih akrilata.
- Standardne devijacije su kod termoplastičnih akrilata niže u odnosu na hladnopolimerizujuće i toplopolimerizujuće akrilate. Reproducibilnost i postojanost mehaničkih karakteristika je viša kod termoplastičnih akrilata u odnosu na ostale.
- Konzistentnosti i postojanosti termoplastičnih akrilata uzrokovana je fabričkom polimerizacijom, koja je preciznija u odnosu na polimerizaciju u zubnoj laboratoriji.

6. ZAHVALNICA

Rezultati prezentovani u ovom radu su realizovani u okviru projekta „Istraživanje i razvoj metoda modeliranja i postupaka izrade dentalnih nadoknada primenom savremenih tehnologija i računarom podržanih sistema“, TR – 35020, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike.

7. LITERATURA

- [1] Krstić M, Petrović A, Sinobad D.S, Stošić Z. Stomatološka protetika-Totalna proteza. *Velarta* 2006:13-71.
- [2] McCabe J. F, Walls A.W.G. *Applied Dental Materials*. Blackwell publishing 2008:110-123.
- [3] Krunić N, Kostic M, Anđelković M. Akrilati-još uvek nezamenljivi materijali u stomatološkoj protetici. *Acta Stomatologia Naissi* 2007;23:747-752.
- [4] Anusavice K.J. *Philip's Science of Dental Materials*. Elsevier 2003:143-169.
- [5] Stamenković D, Đuričić K.O, Beloica D, Leković V, Ivanović V, Pavlović G, Popović G. Stomatološki materijali. *Zavod za udžbenike i nastavna sredstva*, 2003:237-255.
- [6] Lung C.Y.K, Darvell B.W. Minimization of the inevitable residual monomer in denture base acrylic. *Dental materials* 2005;21:1119–1128.
- [7] Harison A, Huget R. Effect of the curing cycle on residual monomer levels of acrylic resin denture base polymers. *Journal of dentistry* 1992;20:240-243.
- [8] Pfeiffer P, Rosenbauer E.U. Residual methyl methacrylate monomer, water sorption, and water solubility of hypoallergenic denture base materials. *Journal of prosthetic dentistry* 2004;92(1):72–78.
- [9] Tandon R, Gupta S, Agarwal S.K. Denture base materials: From past to future. *Indian journal of dental sciences* 2010;2(2):33-39.
- [10] Jagger R.G, Okdeh A. Thermoforming polymethyl methacrylate. *Journal of prosthetic dentistry* 1995;74:542-545.
- [11] Ramos-Cruz M.V, Bohle G.C. A technique for fabricating the dental positioning component for stereotactic radiotherapy. *Journal of prosthetic dentistry* 2008;99:160-161.
- [12] Oh W.S, Saglik B. Use of a thermoplastic vacuum-formed matrix for secure engagement of an implant surgical template. *Journal of prosthetic dentistry* 2008;100:326-327.
- [13] Sullivan M.O, Hansen N, Cronin R.J, Cagna D.R. The hollow maxillary complete denture: A modified technique. *Journal of prosthetic dentistry* 2004;91:591-594.
- [14] Matsui R, Ueno T, Ohyama T. Fabrication of a custom diving mouthpiece using a thermoforming material. *Journal of prosthetic dentistry* 2004;92:392-394.
- [15] Waghorn S, Kuzmanovic D. Technique for preparation of parallel guiding planes for removable partial dentures. *Journal of prosthetic dentistry* 2004;92:200-201.
- [16] Preuzeto sa <http://www.scheu-dental.com/>. [stranica na internetu], citirano maj, 2015.
- [17] Schmalz G, Bindeslev D.A. *Biocompatibility of dental materials*. Springer 2009:255-266.

- [18] Chaves C.A.L, Machado A.L, Vergani C.E, De Souza R.F, Giampaolo E.T. Cytotoxicity Of Denture Base And Hard Chairside Reline Materials: A Systematic Review. *Journal of prosthetic dentistry* 2012;107:114-127.
- [19] Urban V.M, Machado A.L, Vergani C.E, Giampaolo E.T, Pavarina A.C, De Almeida F.G, Cass Q.B. Effect of water-bath postpolymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside reline resins. *Dental materials* 2009;25:662-71.
- [20] Gautam R, Singh R.D, Sharma V.P, Siddhartha R, Chand P, Kumar R. Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. *Journal of biomedical materials research B: Applied biomaterials* 2012;100(5):1444-1450.
- [21] Austin A.T, Basker R.M. Residual monomer levels in denture bases- the effect of varying short curing cycles. *British dental journal* 1982;153:424-426.
- [22] Autian J. Structure-toxicity relationship of acrylic monomers. *Environmental health perspectives* 1975;11:141-152.
- [23] Kallus T. Evaluation of the toxicity of denture base polymers after subcutaneous implantation in guinea pigs. *Journal of prosthetic dentistry* 1984;52:126–134.
- [24] Nathanson D, Gettleman L, Schnitman P, Shklar G. Histologic response to porous PMMA implant materials. *Journal of biomedical materials research* 1978;12:13–33.
- [25] Peterson L.J, Pennel B.M, McKinney R.V, Klawitter J.J, Weinstein A.M. Clinical, radiographical, and histological evaluation of porous rooted polymethylmethacrylate dental implants. *Journal of dental research* 1979;58:489–496.
- [26] Bereznowski Z. In vivo assessment of methyl methacrylate metabolism and toxicity. *International journal of biochemistry and cell biology* 1995;27:1311–1316.
- [27] Phillips H, Cole P.V, Lettin A.W. Cardiovascular effects of implanted acrylic bone cement. *British medical journal* 1971;772:460–461.
- [28] Powell J.N, McGrawth P.J, Lahiri S.K, Hill P. Cardiac arrest associated with bone cement. *British medical journal* 1970;3:326.
- [29] Sokmen S, Oktemer M. Histopathological examinations of rat lungs that exposed to low concentration of methylmethacrylate monomer vapor. *Journal of Hacettepe face dentistry* 1988;12:1-4.
- [30] Shmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clinical oral investigation* 1997;1:154-162.
- [31] Moharamzadeh K, Brook I.M, Ven Noort R. Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials* 2009;2:514-548.

- [32] Council directive of 14 June 1993 concerning medical devices (93/42/EEC) (1993) Official journal of the european communities 169:1–43.
- [33] ISO 10993. Biological evaluation of dental devices. International Standards Organization. 1992.
- [34] ISO 7405. Dentistry - Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry - Test methods for dental materials. International Standards Organization; 1996.
- [35] Tillberg A, Jarvholm B, Berglund A. Risks with dental materials. *Dental materials* 2008;24:940-943.
- [36] Hanks C.T, Wataha J.C, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: A Review. *Dental materials* 1996;12:186-193.
- [37] Bettencourt A.F, Neves C.B, Almeida M.S, Pinhero L.M, Oliveira S.A, Lopes L.P, Castro M.F. Biodegradation of acrylic resins: A review. *Dental materials* 2010;26:e171-e180.
- [38] Graham B.S, Jones D.W, Suttow E.J. An in vivo and in vitro study of the loss of plasticizer from soft polymer-gel materials. *Journal of dental research* 1991;70:870–3.
- [39] Sadamori S, Kotani H, Hamada T. The usage period of dentures and their residual monomer contents. *Journal of prosthetic dentistry* 1992;68:374-376.
- [40] Baker S, Brooks SC, Walker DM. The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: An assay for monomer in saliva. *Journal of dental research* 1988;67:1295-1299.
- [41] Dahl O.E, Garvik L.J, Lyberg T. Toxic effects of methyl methacrylate monomer on leukocytes and endothelial cells in vitro. *Acta orthopaedica Scandinavica* 1994;65:147-153.
- [42] Tay L.Y, Herrera D.R, Quishida C.C.C, Carlos I.Z, Jorge J.H. Effect of water storage and heat treatment on the cytotoxicity of soft liners. *Gerodontology* 2012; 29: e275–e280.
- [43] Makila E, Hopsu-Havu V.K. Mycotic growth and soft denture lining materials. *Acta odontologica Scandinavica* 1976;35:197–205.
- [44] Schmalz G. Die lokale Gewebeertraglichkeit von Komposit- Kunststoffen. [The local tissue compatibility of composite resins] In: *Neue Fullungsmaterialien. [New filling materials]* Hanser, Munchen 1990, 89–110.
- [45] Hansel C, Leyhausen G, Mai U.E.H, Geurtsen W. Effects of various resin composite (co)monomers and extracts on two caries- associated micro-organisms in vitro. *Journal of dental research* 1998;77:60–67.
- [46] Chaves C.A.L, Machado A.L, Carlos I.Z, Vergani C.E, Giampaolo E.T, Pavarina A.C. Cytotoxicity of monomers, plasticizer and degradation by-products released from dental hard chairside reline resins. *Dental materials* 2010;26:1017–1023.

- [47] Jorge J.H, Giampaolo E.T, Vergani C.E, Machado A.L, Pavarina A.C, Carlos I.Z. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and postpolymerisation treatments. *Gerodontology* 2007;24:52–57.
- [48] Zhang L, Steinmaus C, Eastmond D.A, Xin X.K, Smith M.T. Formaldehyde exposure and Leukemia: A New Meta-Analysis and Potential Mechanisms. *Mutation research* 2009;681:150–168.
- [49] Tsuchiya H, Hoshino Y, Kato H, Takagi N. Flow injection analysis of formaldehyde leached from denture-base acrylic resins. *Journal of dentistry* 1993;21:240-243.
- [50] Labban N, Song F, Al-Shibani N, Windsor L.J. Effects of provisional acrylic resins on gingival fibroblasts cytokine/growth factor expression. *Journal of prosthetic dentistry* 2008;100:390-397.
- [51] Ozturk F, Malkoc S, Ersoz M, Hakki S.S, Bozkurt B.S. Real time analysis of the cytotoxicity of the components of orthodontic acrylic materilas on gingival fibroblasts. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics* 2011;40:e243-e249.
- [52] Murray P.E, Godoy C.G, Godoy F.G. How is the biocompatibilty of dental biomaterials evaluated? *Medicina oral, patologia oral i cirurgia bucal* 2007;12:E258-66.
- [53] Pettersen H.A, Helgeland K. Sensitivity of different human cell line in the biologic evaluation of dental resin-based restorative materials. *Scandinavian journal of dental research* 1981;89:102-107.
- [54] International Standards Organization. ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices—part 5. Geneva: ISO; 1999.
- [55] Schmalz G, Arenholt-Bindslev D, Hiller K.A, Schweikl H. Epithelium-fibroblast co-culture for assessing mucosal irritancy of metals used in dentistry. *European journal of oral sciences* 1997;105:86-91.
- [56] Lefebvre C.A, Schuster G.S, Marr J.C, Knoernschild K.L. The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. *International journal of prosthodontics* 1995;8:122-128.
- [57] Tang A.T.H, Li J, Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ poliymerized resins: Methodological comparisons and introduction of a tissue culture inserts as a testing device. *Journal of biomedical materials research* 1999;45:214-222.
- [58] Hanks C.T, Anderson M, Craig R.G. Cytotoxic effects of dental cements on two cell culture systems. *Journal of oral pathology* 1981;10:101-112.
- [59] Cimpan M.R, Matre R, Cressey L.I, Tysnes B, Lie S.A, Gjertsen B.T, Skaug N. The effect of heat- and auto-polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis in fibroblasts: Denture base polymers induce apoptosis and necrosis. *Acta odontologica Scandinavica* 2000; 58:217-228.

- [60] Kim H.H, Kim M.J, Kwon H.B, Lim Y.J, Kim S.K, Koak J.Y. Strength and cytotoxicity in glass-fiber-reinforced denture base resin with changes in the monomer. *Journal of applied polymer science* 2012;126:E260–E266.
- [61] Kim S.K, Heo S.J, Koak J.Y, Lee J.H, Lee Y.M, Chung D.J, Lee J.I, Hong S.D. A biocompatibility study of a reinforced acrylic-based hybrid denture composite resin with polyhedraloligosilsesquioxane. *Journal of oral rehabilitation* 2007;34:389–395.
- [62] Vallittu P.K, Ekstrand K. In vitro cytotoxicity of fibre-polymethyl methacrylate composite used in dentures. *Journal of oral rehabilitation* 1999;26:666-671.
- [63] Bural C, Aktas E, Deniz G, Unlucerci Y, Kizilcan N, Bayraktar G. Effect of post-polymerization heat-treatments on degree of conversion, leaching residual MMA and in vitro cytotoxicity of autopolymerizing acrylic repair resin. *Dental materials* 2011;27:1135–1143.
- [64] Ata S.O, Yavuzylmaz H. In vitro comparison of the cytotoxicity of acetal resin, heat-polymerized resin, and auto-polymerized resin as denture base materials. *Journal of biomedical materials research part B: Applied biomaterials* 2009;91:905-909.
- [65] Kostić M, Najman S, Kocić J, Krunić N, Anđelković Z, Petrović D, Anđelković M. Efekat ekstrakata akrilata za bazu pločaste zubne proteze na rast Hela ćelija in vitro. *Hemijska industrija* 2008;62(3):217-222.
- [66] SRPS ISO 20795-1. Stomatologija- Bazni polimer, Deo 1: Polimeri za bazu zubne proteze, 2011.
- [67] Kopperdud H.M, Kleven I.S, Wellendorf H. Identification and quantification of leachable substances from polymer based orthodontic base plate materials. *European journal of prosthodontics* 2011;22:26-31.
- [68] Pettersen H.N, Helgeland K. Evaluation of biological effects of dental materials using four different cell culture techniques. *Scandinavian journal of dental research* 1977;85:291-6.
- [69] Wennberg A, Mjor I.A, Pettersen H.N. Biological evaluation of dental restorative materials-a comparison of different test methods. *Journal of biomedical materials research* 1983;17:23-36.
- [70] Mittal M, Chandra S, Chandra S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. *Journal of endodontics* 1995;21:622-62.
- [71] Witte J, Jacobi H, Juhl-Strauss U. Suitability of different cytotoxicity assays for screening combination effects of environmental chemicals in human fibroblasts. *Toxicology letters* 1996;87:39-45.
- [72] Zafalon E.J, Versiani M.A, De Souza C.J.A, Moura C.C.G, Dechichi P. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology* 2007;103:e88-e94.

- [73] John C. Wataha. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *Journal of prosthetic dentistry* 2001;86:203-9.
- [74] International Standards Organization. ISO 10993-6: biological evaluation of medical devices—part 6. Geneva: ISO; 1999.
- [75] Ebadian B, Razavi M, Soleimanpour S, Mosharraf R. Evaluation of tissue reaction to some denture-base materials: An animal study. *Journal of contemporary dental practice* 2008;9:1-9.
- [76] Khedr E.S.G, Yossef A.H. Evaluation of subcutaneous tissue response to implanted samples of acrylic resin mixed with metal fillers. *Egyptian journal of hospital medicine* 2002;9:74-84.
- [77] Jassim R.K, Radhi A.A. Evaluation of the biological effects of two types of denture base materials reinforced with silanated glass fiber. *Journal of Baghdad college dentistry* 2011;23(2):26-30.
- [78] Vlasova L.F, Nepomnyashchikh L.M, Petrov A. K, Reznikova E.O. Patomorphology of subcutaneous implantation of basic resin specimens modified by glow discharge. *Bulletin of experimental biology and medicine* 2000;129(2):228-233.
- [79] Andersson M, Suska F, Johansson A, Berglin M, Emanuelsson L, Elwing H, Thomsen P. Effect of molecular mobility of polymeric implants on soft tissue reactions: An in vivo study in rats. *Journal of biomedical materials research* 2008;84A:652–660.
- [80] Kidd K.R, Dal Ponte D.B, Kellar R.S, Williams S.K. A comparative evaluation of the tissue responses associated with polymeric implants in the rat and mouse. *Journal of biomedical materials research* 2002;59: 682–689.
- [81] Sellborn A, Andersson M, Fant C, Gretzer C, Elwing H. Methods for research on immune complement activation on modified sensor surfaces. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 2003; 27:295–301.
- [82] Andersson M, Sellborn A, Fant C, Gretzer C, Elwing H. Acoustics of blood plasma on solid surfaces. *Journal of biomaterials science; Polymer edition* 2002;13:907–917.
- [83] Ghoshal N.G, Bal H.S. Histomorphology of the hamster cheek pouch. *Laboratory animals* 1990;24(3):228–33.
- [84] Riley J.H. Letter to the Editor. *Veterinary pathology online* 2007;44:963.
- [85] Harsaniy B.B, Foong W.C, Howell R.E, Jones D.W. Hamster cheek pouch testing of dental soft polymers. *Journal of dental research* 1991;70:991-997.
- [86] Roy M, Wishe H.I. Establishment of an improved implantation technique for hamster mucous membrane irritation testing. *Journal of dental research* 1986;65:1365-1370.

- [87] Stanley H.R. Mucous Membrane Irritation Test (Hamster's Pouch). Toxicity of Dental Materials, Boca Raton, FL: CRC Press 1985:55-60.
- [88] Wilson J, Francis A. The hamster cheek pouch as a model for testing biomaterials: A short-term test. Evaluation of biomaterials, New York: John Wiley and Sons, 1980:325-332.
- [89] EN ISO 10993-10. Biological evaluation of medical devices, Part 10: Tests for irritation and skin sensitization, 2010.
- [90] Aframian D.J, Davidowitz T, Benoliel R. The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. Oral diseases 2006;12:420-423.
- [91] Jagger D.C, Harrison A, Jandt K.D. The reinforcements of dentures-review. Journal of oral rehabilitation 1999; 26:185-194.
- [92] Vallittu P.K. A review of fiber reinforced denture base resins. Journal of prosthodontics 1996;5(4):270-276.
- [93] Balos S, Balos T, Sidjanin L, Markovic D, Pilic B, Pavlicevic J. Study of PMMA biopolymer properties treated by microwave energy. Materiale plastice 2011;48:127-31.
- [94] Balos S, Balos T, Sidjanin L, Markovic D, Pilic B, Pavlicevic J. Flexural and impact strength of microwave treated autopolymerized poly(methyl-methacrylate). Materiale plastice 2009;46:261-265.
- [95] Balos S, Pilic B, Markovic D, Pavlicevic J, Luzanin O. PMMA nanocomposites with low silica addition. Journal of prosthetic dentistry 2014;111:327-334.
- [96] Hargreaves A.S. The prevalence of fractured dentures. A survey. British dental journal 1969;126:451-455.
- [97] Demir H, Dogan O.M, Dogan A. Tensile properties of denture base resin reinforced with various esthetic fibers. Journal of applied polymer science 2012;123:2354-2362.
- [98] Khasawneh S.F, Arab J.M. A clinical study of complete denture fractures at four military hospitals in Jordan. JRMS 2003;10(2):27-31.
- [99] Prombonas A.E, Vlissidis D.S. Comparison of the midline stress fields in maxillary and mandibular complete dentures: A pilot study. Journal of prosthetic dentistry 2006;95:63-70.
- [100] Sakaguchi R, Powers J. Craig's Restorative dental materials. Elsevier Mosby 2012:84-107.
- [101] Shahdad S, McCabe J, Bull S, Rusby S, Wasell R. Hardness measured with traditional Vickers and Martens hardness methods. Dental materials 2007;23:1079-1085.
- [102] Diaz-Arnold A, Vargas M, Shaull K, Lafoon J, Qian F. Flexural and fatigue strengths of denture base resin. Journal of prosthetic dentistry 2008;100:47-51.
- [103] Gurbuz O, Unalan F, Dikbas I. Comparative study of the fatigue strength of five acrylic denture resins. Journal of mechanical behavior of biomedical materials 2010;3(8):636-639.

- [104] Bogdanović G, Raletić-Savić J, Marković N. In vitro assays for antitumor-drug screening on human tumor cell lines: Dye exclusion test and colorimetric cytotoxicity assay. *Archive of oncology* 1994;2(4):181-184.
- [105] Mosmann T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 1983;65:55–63.
- [106] Sulym I.Y, Borysenko M.V, Goncharuk O.V, Terpilowski K., Sternik D, Chibowski K. Structural and hydrophobic–hydrophilic properties of nanosilica/zirconia alone and with adsorbed PDMS. *Applied surface science* 2011;258:270-7.
- [107] Lazzara G, Milioto S. Dispersions of nanosilica in biocompatible copolymers. *Polymer degradation and stability* 2010;95:610-7.
- [108] Zhu A, Cai A, Zhou W, Shi Z. Effect of flexibility of grafted polymer on the morphology and property of nanosilica/PVC composites. *Applied surface science* 2008;254:3745-52.
- [109] Balos S, Sidjanin L, Pilic B. Indentation size effect in autopolymerized and microwave post treated Poly(methyl methacrylate) denture reline resin. *Acta polytechnical Hungarica* 2014;11(7):239-249.
- [110] Kawahara T, Nomura Y, Tanaka N, Teshima W, Okazaki M, Shintani H. Leachability of plasticizer and residual monomer from commercial temporary restorative resins. *Journal of dentistry* 2004;32:277–283.
- [111] Jorge J.H, Giampaolo E.T, Machado A.L, Vergani C.E. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: A literature review. *Journal of prosthetic dentistry* 2003;90:190-3.
- [112] Kedjarune U, Charoenworakul N, Koontongkaew S. Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer. *Australian dental journal* 1999;44(1):25-30.
- [113] Nakamura M, Kawahara H. Long-term biocompatibility test of denture base resins in vitro. *Journal of prosthetic dentistry* 1984;52:694-9.
- [114] Sheridan P.J, Koka S, Ewoldsen N.O, Lefebvre C.A, Lavin M.T. Cytotoxicity of denture base resins. *International journal of prosthodontics* 1997;10:73-77.
- [115] Moreau M.F, Chappard D, Lesourd M, Montheard J. P, Basle M.F. Free radicals and side products released during methylmethacrylate polymerization are cytotoxic for osteoblastic cells. *Journal of biomedical materials research* 1998;40:124–131.
- [116] Laskin D.M, Robinson I.B, Weinmann J.P. Experimental production of sarcomas by methyl methacrylate implants. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine* 1954;87:329–332.
- [117] Schweikl H, Schmalz G, Rackebrandt K. The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutation research/genetic toxicology and environmental mutagenesis* 1998;415(1–2):119–130.

- [118] Cimpan M.R, Cressey L.I, Skaug N, Halstensen A, Lie S.A, Gjerstsen B.T. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *European journal of oral sciences* 2000;108:59-69.
- [119] Ata S.O, Yavuzylmaz H. In vitro comparison of the cytotoxicity of acetal resin, heat-polymerized resin, and auto-polymerized resin as denture base materials. *Journal of biomedical materials research part B: Applied biomaterials* 2009;91B:905–909.
- [120] ISO 10993-5. Biological evaluation of dental devices. International Standards Organization. 1992.
- [121] Campanha N.H, Pavarina A.C, Giampaolo E.T, Machado A.L, Carlos I.Z, Vergani C.E. Cytotoxicity of hard chairside relines resins: effect of microwave irradiation and water bath postpolymerization treatments. *International journal of prosthodontics* 2006;19:195–201.
- [122] Urban V.M, Machado A.L, Vergani C.E, Giampaolo E.T, Pavarina A.C, Cass Q.B. Leachability of degradation products from hard chairside relines resins in artificial saliva: Effect of water-bath post polymerization treatment. *Journal of applied polymer science* 2012;123:732–739.
- [123] Mjor I.A, Hensten-Pettersen A, Skogedal O. Biological evaluation of filling materials. A comparison of results using cell culture techniques, implantation tests and pulp studies. *International dental journal* 1977;27:124-9.
- [124] Kostić M, Krunic N, Nikolić LJ, Nikolić V, Najman S, Kostić I, Rajković J, Manić M, Petković D. Uticaj redukcije rezidualnog monomera na kvalitet akrilatnih stomatoprotetskih materijala. *Hemijska industrija* 2011;65(2):171–177.
- [125] Rompen E, Domken O, Degidi M, Pontes A.E.F, Piattelli A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review. *Clinical oral implants research* 2006;17(2):55–67.
- [126] Hide M. Kopperdud I.S, Kleven H.W. Identification and quantification of leachable substances from polymer based orthodontic base plate materials. *European journal of prosthodontics* 2011;22:26-31.
- [127] Lee H.H, Lee C.J, Asaoka K. Correlation in the mechanical properties of acrylic denture base resins, *Dental materials journal* 2012;31(1):157–164.
- [128] Balos S, Milutinovic M, Potran M, Vuletic J, Puskar T, Pepelnjak T. The Mechanical properties of molded and thermoformed denture resins. *Strojnicki vestnik - Journal of mechanical engineering* 2015;61(2):138-145.
- [129] Lamb D.J, Ellis B, Priestley D. The effects of process variables on levels of residual monomer in autopolymerizing dental acrylic resin. *Journal of dentistry* 1983;11(1):80-88.
- [130] Phillips' Science of Dental Materials, Elsevier Saunders, 2013:489-490.
- [131] Odian G. Principles of Polymerization, 3rd ed., J. Wiley, New York, 1991:24-39.

- [132] Van Krevelen D.W, Nijenhuis K.T. Properties of polymers: their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions., 4th ed., Elsevier; 2009:383-500.
- [133] Landel R.F, Nielsen L.E. Mechanical properties of polymers and composites, 2nd edition, rev. and expanded, Marcel Dekker, Inc., 1994:233-299.
- [134] Rosen C.Z, Hiremath B.V, Newnham R.E. Piezoelectricity – Key papers in physics. American Institute of Physics, 1992:159-181.