

**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
СТУДИЈЕ КЛИНИЧКЕ МЕДИЦИНЕ**



**Јелена Вулетић Ракић**

**Испитивање биокомпатибилности објеката од  
полимера произведених адитивном  
технологијом за примену у области  
стоматологије**

Докторска дисертација

**Ментори:**

**Проф. др Татјана Пушкар  
Проф. др Матилда Ђолаи**

Нови Сад, 2016.

**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА**

Редни број: РБР	
Идентификациони број: ИБР	
Тип документације: ТГД	Монографска документација
Тип записа: ТЗ	Текстуални штампани материјал
Врста рада (дипл., маг., докт.): ВР	Докторска дисертација
Име и презиме аутора: АУ	Јелена Вулетић Ракић
Ментор (титула, име, презиме, звање): МН	Проф. др Татјана Пушкар Проф. др Матилда Ђолаи
Наслов рада: НР	Испитивање биокompatibilности објеката од полимера произведених адитивном технологијом за примену у области стоматологије
Језик публикације: ЈП	Српски (ћирилица)
Језик извода: ЈИ	српски / енглески
Земља публикавања: ЗП	Република Србија
Уже географско подручје: УГП	Аутономна Покрајина Војводина
Година: ГО	2016.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МА	Србија, 21000 Нови Сад, Хајдук Вељкова 3

Физички опис рада: ФО	7 поглавља / 96 страница / 14 слика / 1 графикон/ 18 табела/ 121 референца
Научна област: НО	Стоматологија, Хистологија са ембриологијом
Научна дисциплина: НД	Стоматолошки материјали
Предметна одредница, кључне речи: ПО	биокомпатибилни материјали; производња вештачког ткива; испитивање биокомпатибилности; стоматолошки материјали; епокси смоле; имунолошки тестови цитотоксичности; орална мукоза; субкутано ткиво; лабораторијске животиње; експерименти са животињама
УДК	616.31-77:678.7 612.085.2
Чува се: ЧУ	Библиотека Медицинског факултета у Новом Саду, Хајдук Вељкова 3, 21000 Нови Сад, Србија
Важна напомена: ВН	
Извод: ИЗ	<p>Уобичајени приступ у тестирању биолошког понашања материјала је да се почне са једноставним <i>in vitro</i> тестовима базираним на ћелијским културама. <i>In vitro</i> тестови цитотоксичности су данас један од основних начина за процену биолошког одговора на материјал јер су бржи, лакши за понављање, оцењивање и јевтинији у односу на експерименте који се изводе на животињама и људима. Користе се као нека врста скрининг тестова за процену биолошке сигурности материјала. За разлику од ћелијских култура, истраживања која укључују експерименталне животиње пружају бољи увид у биокомпатибилност материјала, због могућности праћења комплексног имунолошког одговора живог организма. Сматрају се неопходним за оцену биолошких одговора на нови материјал, пре него што се он употреби на људима. Многи аспекти биолошког одговора не могу бити репродуковани <i>in vitro</i> тестовима укључујући крвне интеракције, зарастање рана, реакције преосетљивости, карциногенезу, хроничну инфламацију. Експерименти на животињама пружају информације о овим типовима ефеката без излагања људи ризику.</p> <p>Циљ овог истраживања био је да се оцени биокомпатибилност објеката од полимера на бази епокси смоле Асцига® ClearVue™ (хемијски састав: 4,4'- изопропилидендициклохексанол, продукти олигомерне реакције са 1-хлор-2,3-епоксипропаном (40-65%), смеша триарил-сулфонијум соли (50% пропилен-карбоната и 50% триарил-сулфонијум хексафлуороантимонатних соли) (1-10%) и 3-етил-3-хидроксиметил-оксетан (10-20%).</p>

	<p>У оцени цитотоксичности материјала Assura® ClearVue™ коришћени су агар дифузиони и МТТ тест. Оба теста рађена су на ћелијским културама L929 (мишији фибробласти) и MRC-5 (хумани фибробласти). Оцена биокомпатибилности тестираног материјала вршена је на основу урађеног теста иритације оралне мукозе на моделу образне кесице хрчка, што је дефинисано стандардом ISO 10993-10:2010. Биокомпатибилност материјала испитана је и имплантацијом узорака у поткожно ткиво дорзума пацова соја Wistar. Тест субкутане имплантације, као једна од најпоузданијих метода у евалуацији биокомпатибилности стоматолошких материјала, дефинисан је стандардом ISO 10993-6:2010. Испитивање је спроведено на 30 пацова који су жртвовани у групама од по 10 животиња у временским интервалима од 10, 30 и 90 дана након имплантације.</p> <p>На основу резултата спроведеног истраживања може се закључити да материјал Assura® ClearVue™ има добру биокомпатибилност и велики потенцијал за употребу у стоматологији. Како би се добио потпуни увид у биокомпатибилност овог материјала потребно је спровести даља <i>in vivo</i> истраживања на људима.</p>
Датум прихватања теме од стране сената: ДП	12.02.2015.
Датум одбране: ДО	
Чланови комисије: (име и презиме / титула / звање / назив организације / статус) КО	председник: члан: члан:

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TTD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Jelena Vuletić Rakić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Tatjana Puškar Prof. dr Matilda Đolai
Naslov rada: NR	Ispitivanje biokompatibilnosti objekata od polimera proizvedenih aditivnom tehnologijom za primenu u oblasti stomatologije
Jezik publikacije: JP	Srpski (ćirilica)
Jezik izvoda: JI	srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Autonomna Pokrajina Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Srbija, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	7 poglavlja / 96 stranica / 14 slika / 1 grafikon / 18 tabela / 121 referenca
Naučna oblast: NO	Stomatologija, Histologija sa embriologijom

Naučna disciplina: ND	Stomatološki materijali
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	biokompatibilni materijali; proizvodnja veštačkog tkiva; ispitivanje biokompatibilnosti; stomatološki materijali; epoksi smole; imunološki testovi citotoksičnosti; oralna mukoza; subkutano tkivo; laboratorijske životinje; eksperimenti na životinjama
UDK	616.31-77:678.7 612.085.2
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Uobičajeni pristup i testiranju biološkog ponašanja materijala je da se počne sa jednostavnim <i>in vitro</i> testovima baziranim na ćelijskim kulturama. <i>In vitro</i> testovi citotoksičnosti su danas jedan od osnovnih načina za procenu biološkog odgovora na materijal jer su brži, lakši za ponavljanje, ocenjivanje i jeftiniji u odnosu na eksperimente koji se izvode na životinjama i ljudima. Koriste se kao neka vrsta skrining testova za procenu biološke sigurnosti materijala. Za razliku od ćelijskih kultura, istraživanja koja uključuju eksperimentalne životinje pružaju bolji uvid u biokompatibilnost materijala, zbog mogućnosti praćenja kompleksnog imunološkog odgovora živog organizma. Smatraju se neophodnim za ocenu bioloških odgovora na novi materijal, pre nego što se on upotrebi na ljudima. Mnogi aspekti biološkog odgovora ne mogu biti reprodukovani <i>in vitro</i> testovima uključujući krvne interakcije, zarastanje rana, reakcije preosetljivosti, karcinogenezu, hroničnu inflamaciju. Eksperimenti na životinjama pružaju informacije o ovim tipovima efekata bez izlaganja ljudi riziku.</p> <p>Cilj ovog istraživanja bio je da se oceni biokompatibilnost objekata od polimera na bazi epoksi smole Accura® ClearVue™ (hemijski sastav: 4,4'-izopropilidencikloheksanol, produkti oligomerne reakcije sa 1-hlor-2,3- epoksipropanom(40-65%), smeša triaril-sulfonijum soli (50% propilen-karbonata i 50% triaril-sulfonijum heksafluoroantimonatnih soli) (1-10%) i 3-etil-3hidroksimetil-oksetan(10-20%).</p> <p>U oceni citotoksičnosti materijala Accura® ClearVue™ korišćeni su agar diguzioni i MTT test. Oba testa rađena sun a ćelijskim kulturama L929 (mišiji fibroblasti) i MRC-5 (humani fibroblasti). Ocena biokompatibilnosti testiranog materijala vršena je na osnovu urađenog testa iritacije oralne mukoze na modelu bukalne kesice hrčka, što je definisano standardom ISO 10993-10:2010. Biokompatibilnost materijala ispitana je i implantacijom uzoraka u potkožno tkivo dorzuma pacova soja Wistar.</p>

	<p>Test subkutane implantacije, kao jedna od najpouzdanijih metoda u evaluaciji biokompatibilnosti stomatoloških materijala, definisan je standardom ISO 10993-6:2010. Ispitivanje je sprovedeno na 30 pacova koji su žrtvovani u grupama od po 10 životinja u vremenskim intervalima od 10, 30 i 90 dana nakon implantacije.</p> <p>Na osnovu rezultata sprovedenog istraživanja može se zaključiti da materijal Accura® ClearVue™ ima dobru biokompatibilnost i veliki potencijal za upotrebu u stomatologiji. Kako bi se dobio potpuniji uvid u biokompatibilnost ovog materijala potrebno je sprovesti dalja <i>in vivo</i> ispitivanja na ljudima.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	12.02.2015.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: član: član:

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
MEDICAL FACULTY**

**KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Jelena Vuletić Rakić
Mentor: MN	Professor Tatjana Puškar, MD, PhD Professor Matilda Đolai, MD, PhD
Title: TI	Testing the biocompatibility of objects from polymers produced by additive manufacturing for use in dentistry
Language of text: LT	Serbian (cyrillic)
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Serbia, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	number of chapters 7/ pages 121/ pictures 14/ graphic1 / tables 11 / references 121
Scientific field SF	Dentistry, Histology and embriology
Scientific discipline SD	Dental Materials



Subject, Key words SKW	Biocompatible Materials; Tissue Engineering; Materials Testing; Dental Materials; Epoxy Resins; Cytotoxicity Tests, Immunologic; Mouth Mucosa; Subcutaneous Tissue; Animals, Laboratory; Animal Experimentation
UC	616.31-77:678.7 612.085.2
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, Serbia 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Note: N	
Abstract: AB	<p>The usual approach in testing biological behavior of materials is to start with simple <i>in vitro</i> tests based on cell cultures. <i>In vitro</i> cytotoxicity tests are one of the basic methods of assessing the biological response to material because they are faster, cheaper, easier for repeating and evaluating compared to experiments carried out on animals and humans. They are used as a kind of screening test for evaluating the biosafety of materials. Unlike cell culture, studies involving experimental animals provide better insight into the biocompatibility of materials due to the possibility of monitoring the complex immune response of a living organism. They are considered necessary for assessing the biological response to new material before it is used on humans. Many aspects of a biological response cannot be reproduced with <i>in vitro</i> tests, including blood interaction, wound healing, hypersensitivity reactions, carcinogenesis, chronic inflammation. Animal experiments provide information about these types of effects without exposing humans to risk.</p> <p>The aim of this study was to evaluate the biocompatibility of polymer objects on the basis of epoxy resins Accura® ClearVue™ (chemical composition: 4.4' Isopropylidenedicyclohexanol, oligomeric reaction products with 1-chloro-2.3-epoxypropane (40-65%), a mixture of triaryl sulfonium salt (50% propylene carbonate and 50% of a triarylsulfonium hexafluoroantimonate salt) (1- 10%) and 3-ethyl-3-hydroxymethyl-oxetane (10-20%).</p> <p>In the assessment of the cytotoxicity of materials Accura® ClearVue™ agar diffusion and MTT tests were used. Both tests were conducted on cell cultures L929 (mouse fibroblasts) and MRC-5 (human fibroblasts). An assessment of the biocompatibility of the tested material was done on the basis of an oral mucosa irritation test on a hamster cheek pouch as defined by ISO 10993-10: 2010. The biocompatibility of the material was also tested with the implantation of a samples into the dorsal subcutaneous tissue of a Wistar rats. The subcutaneous implantation test, as one of the most reliable methods for assessing the biocompatibility of dental materials, is defined by ISO 10993-6: 2010. The study was conducted on 30 rats which were sacrificed in groups</p>

	<p>of 10 animals, at intervals of 10, 30 and 90 days after implantation.</p> <p>Based on the research results, it can be concluded that the Accura® ClearVue™ material has good biocompatibility and great potential for use in dentistry. In order to fully understand the biocompatibility of the material it is necessary to conduct further <i>in vivo</i> studies on humans.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>February 12, 2015</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: member: member:</p>

## Захвалница

У току рада на овој дисертацији осетила сам подршку и охрабрење од многих особа које су на различите начине помогле да се успешно приведе крају.

Пре свега, желела бих да изразим велику захвалност својим менторкама, проф. др Тапјани Пушкар и проф. др Матилди Ђолаи на свему што су ме научиле у току израде ове докторске дисертације.

Проф. др Тапјани Пушкар, са којом сам започела свој научни рад током писања студентских радова, а потом га успешно наставила и на докторским студијама, желела бих да захвалим на указаном поверењу, уложеном труду, бројним стручним саветима, дискусијама и помоћи коју ми је пружила током израде ове дисертације. Велико хвала и на томе што ми је дала слободу при избору теме, што је од изузетне важности за једног младог научника. Велико хвала што ми је обезбедила материјал који је био предмет испитивања у овом испраживању и услове да спроведем испраживање.

Велико хвала проф. др Матилди Ђолаи на несебичној помоћи и усмеравању у писању сваког поглавља овог рада. Захваљујем на свим сугестијама, крипикама и похвалама које су ми пуно значиле. Посебно се захваљујем на указаном поверењу, спрљивости, вољи и жељи да подели своје знање. Неизмерно сам јој захвална на свему.

Захваљујем проф. др Душану Лалошевићу на указаном поверењу и обезбеђивању услова да се део испраживања спроведе у виваријуму Пастеровог завода у Новом Саду.

Доц. др Ивану Чапо, који ми је несебично и пријатељским приступом помогао у раду у лабораторији на Катедри за хистологију са ембриологијом велико хвала на указаном поверењу и стручној помоћи, као и на томе што је мој рад у лабораторији учинио пријатним.

Захваљујем Др Весни Којић на пажљивом ишчитавању материјала дисертације и на свим сугестијама и корекцијама током израде и писања дисертације.

Захваљујем колегама са Факултета техничких наука који су омогућили испитивање површинске храпавости узорака.

Нади и Љиљи велико хвала на помоћи при статистичкој обради података, као и на моралној подршци.

На крају, али не и мање важно...

Од срца бих се захвалила мојим родитељима, тати Антонију и мами Милици на учењу правим животним вредностима, на њиховим усмеравањима, непрекидним подстицањима као и на свим одрицањима која су била потребна током свих година мог школовања.

Сестри Ивани и зету Славку захваљујем на неисцрпној љубави, разумевању и непрекидној и безрезервној подршци у сваком тренутку.

Посебно се захваљујем мом Пеђи који има бескрајно пуно љубави, стрпљења, разумевања и вере у мене и мој рад.  
Захваљујем се свим драгим људима и пријатељима на разумевању и искреној подршци.

Најлепше хвала!

Аутор

# Садржај

1. Увод .....	1
1.1 Стоматолошки материјали .....	1
1.1.1 Материјали, нежељене реакције и класификација материјала .....	1
1.1.2 Нове технологије и нови материјали у стоматологији .....	1
1.1.3 Предности адитивне производње.....	3
1.2 Биокомпатибилност .....	5
1.2.1 Теорије биокомпатибилности.....	5
1.2.2 Материјал-ткиво међуспој .....	6
1.2.3 Ткивни одговори на материјале .....	8
1.3 Стратегије за евалуацију биокомпатибилности.....	15
1.3.1 In vitro тестови .....	17
1.3.2 Експерименти на животињама .....	22
1.3.3 Клиничке студије.....	25
1.4 Одређивање површинске храпавости узорака .....	26
2. Циљ, хипотеза и научна оправданост.....	28
3. Материјал и методе .....	29
3.1 Испитивани материјал.....	29
3.2 Одређивање површинске храпавости узорака .....	29
3.3 In vitro испитивање цитотоксичности Accura ClearVue полимера.....	30
3.3.1 Начин извођења експеримента.....	30
3.3.2 Припрема елуата.....	30
3.3.3 Ћелијске линије .....	30
3.3.4 Mosmann-ов колориметријски МТТ тест .....	32
3.3.5 Агар дифузиони тест .....	36
3.4 Тест иритације оралне мукозе .....	38
3.4.1 Експерименталне животиње и експозиција испитиваним материјалима	38
3.4.2 Хистолошка обрада слузокоже .....	41
3.5 Тест субкутане имплантације .....	45
3.5.1 Експериментални протокол.....	45
3.6 Анализа података .....	50
3.6.1 In vitro испитивање цитотоксичности .....	50

3.6.2	Тест иритације оралне мукозе .....	50
3.6.3	Тест субкутане имплантације .....	50
4.	Резултати .....	51
4.1	Резултати мерења површинске храпавости узорака .....	51
4.2	In vitro испитивање цитотоксичности .....	51
4.2.1	Резултати МТТ теста .....	51
4.2.2	Резултати агар дифузионог теста .....	54
4.3	Степен иритације оралне мукозе хрчака .....	54
4.4	Степен биокомпатибилности материјала Accura ClearVue .....	57
4.4.1	Показатељи инфламације појединачно по испитиваним (експерименталним) групама .....	57
4.4.2	Показатељи инфламације између испитиваних група .....	62
4.4.3	Корелација параметара инфламације у испитиваним групама .....	65
5.	Дискусија .....	69
5.1	In vitro испитивање цитотоксичности материјала .....	70
5.2	Тест иритације оралне мукозе .....	74
5.3	Тест субкутане имплантације .....	76
5.3.1	Реакција ткива на имплантацију .....	77
5.3.2	Полимери у стоматологији .....	81
6.	Закључак .....	84
7.	Литература .....	85

# **1. Увод**

## **1.1 Стоматолошки материјали**

### **1.1.1 Материјали, нежељене реакције и класификација материјала**

Појам стоматолошки материјали подразумева широки спектар материјала који се користе при различитим стоматолошким процедурама (1). Ови материјали могу бити намењени за сталну или привремену примену у усној дупљи пацијента, или се могу користити током израде различитих надокнада (2).

Широка палета стоматолошких материјала може се поделити у неколико група: стоматолошки материјали за узимање отисака, материјали за израду привремених надокнада, материјали за израду круница и протеза, материјали за употребу у ендодонцији, материјали за испуне, материјали за подлоге и цементирање, материјали за употребу у имплантологији (2).

Како би примена материјала на пацијентима била што успешнија, неопходно је, упознати се са њиховим физичким, хемијским, механичким и биолошким особинама. Ове особине зависе не само од хемијске структуре материјала, већ и од понашања материјала у променљивим условима који владају у усној шупљини (1, 3-5).

### **1.1.2 Нове технологије и нови материјали у стоматологији**

Током последњих година дошло је до брзог напретка и примене дигиталних технологија у стоматологији (5).

Термин „rapid prototyping” означава читаву класу технологија које подразумевају претварање виртуелног 3D модела (направљеног у CAD- Computer Aided Design алатима), у реалан физички објекат (5, 6).

Ове технологије се темеље на изради објекта слој по слој: узимају геометријску слику модела из CAD датотека, која се путем софтвера припрема за

штампу помоћу посебних штампача који слажу слојеве материјала, док се не направи жељени тродимензионални (3D) објекат (6-10). Отуда и јесте адитивна производња дефинисана као: „процес спајања материјала како би се направили објекти од 3D података, обично додавањем „слој по слој“ и описује технологије које могу да се примењују било где у циклусу производње (дефинисано од стране American Society for Testing and Materials (ASTM) (8).

Појам адитивна технологија подразумева више технологија које се разликују у врсти материјала од ког се објекти израђују и у методама спајања материјала. Материјал од ког се праве будући модели може бити течност, влакно, пудер, прах или чак метални материјал који очврсне хемијским реакцијама, дејством UV светлости или неким другим методама. Модели који се креирају су, према томе, различитих физичких и механичких карактеристика (7, 8).

Опрема коју користе рачунарске технологије постаје конкурентна са традиционалним производним алатима у смислу трошкова, брзине, једноставности као и поузданости. Све ово је разлог експанзивног развоја и употребе дигиталних технологија у различитим областима (5, 6, 8).

Ове технологије укључују више различитих метода израде модела: стереолитографија (Stereolithography, SLA- енг. прим. аут.), селективно ласерско синтеровање (Selective Laser Sintering, SLS- енг. прим. аут.), ламинарна објектна производња (Liminated Object Manufacturing, LOM- енг. прим. аут.), моделовање топљеним депозитима (Fused Deposition Modeling, FDM- енг. прим. аут.), мултиџет моделовање (Multi Jet Modeling, MJM- енг. прим. аут.), топљење електронским снопом (Election Beam Melting, EBM- енг. прим. аут.), 3D штампање (3D Printing, 3DP- енг. прим. аут.) и производња објеката полицет технологијом (Object PolyJet Modeling, MJM- енг. прим. аут.) (7, 8,11, 12).

Због краћег времена производње објеката било које сложености, 3D штампач је своју примену нашао у различитим областима, а посебно у подручју дизајна, архитектуре, медицине и производног машинства (5).

Једна од првих примена 3D штампања у медицини била је израда људског физичког анатомског модела на бази СТ снимка. Данас се адитивна технологија користи у медицини и стоматологији као средство за конструисање



индивидуалних имплантата као што су краниопластике, под орбите, и онлеји (врста ливене пломбе која прекрива већи део зуба), привремене круне и мостови, а рутински се користи и за израду хируршких вођица за постављање денталних имплантата (5, 7, 8).

### **1.1.3 Предности адитивне производње**

Основна карактеристика адитивне производње јесте да се објекти формирају додавањем материјала слој по слој, за разлику од традиционалних технологија код којих се објекти производе одузимањем или обликовањем материјала (стругање, глодање, сечење, ливење, ковање), што представља уштеду материјала јер нема његовог расипања (5, 7, 8).

Израда објеката адитивним технологијама елиминише употребу алата и потребу за скупим и извештеним радом као код традиционалних технологија. Такође се скраћује процес производње комплексних модела, који су иначе тешки за моделовање конвенционалним стоматолошким процесима (5, 7, 12).

3D технологије прошириле су како дијагностичке, тако и терапијске могућности у области медицине и стоматологије (8, 12, 13). 3D симулације хируршких и ортодонтских процедура користе се све више, како у истраживањима тако и у клиничком раду. Дигитални модел се сада може користити у стоматологији у области оралне, максилофацијалне и неуро хирургије, а доступно је и много софтверских пакета за дизајнирање денталних рестаурација као што су крунице, мостови, базе парцијалних протеза и биолошки активних имплантата (5, 14). Главна предност ове методе је у могућности да се креирају фини детаљи сложених геометријаских облика као што су подмираност, шупљине, сложена унутрашња геометрија... Са побољшањима у брзини, поузданости и тачности хардвера (може се направити велики број сложених објеката истовремено), адитивна производња озбиљно конкурише традиционалној производњи (5, 8).

Доступни материјали у стоматологији за израду имплантата, хируршких вођица и зубних протеза 3D технологијама играју све важнију улогу, с обзиром на брз развој индустрије и захтеве које материјали морају задовољити (5). Долази до

континуираног развоја широког спектра нових материјала за примену у различитим клиничким стањима у медицини и стоматологији (5).

Када се нов материјал појављује на тржишту, или је већ постојећи материјал предложен за другачију примену, особине тог материјала се морају истражити и добијени резултати се морају упоредити са резултатима других аутора (15-19). Материјали и њихове површине треба да испуне неколико захтева од којих су стабилност и биокомпатибилност најважнији (15, 19).

Биокомпатибилност стоматолошких материјала је важан предуслов с обзиром на њихову употребу у усној дупљи, јер токсичне компоненте могу узроковати иритацију или чак деградацију околних ткива (15, 20, 21).

Предмет испитивања у овом истраживању је полимер на бази епокси смоле Accura® ClearVue™ (22). Информације о особинама овог материјала заснивају се за сада само на подацима који потичу од произвођача, јер нема података о његовом коришћењу у области медицине и стоматологије (22). Прва планирана примена овог полимера у области стоматологије је израда хируршких вођица адитивном технологијом- SLA (stereolithography- енг. прим. аут.). Међутим, с обзиром на растућу популарност материјала на бази смола у стоматологији, уколико се докажу добре особине овог материјала, дошло би до проширења могућности за његову примену (23).

Епокси смоле су мономери или преполимери са функционалношћу оксирана. Могу бити полимеризовани у чврсте полимере са добром хемијском стабилношћу (24). Модификација еоксида у циљу унапређења физичких и механичких особина (чврстоћа, ригидност, отпорност на високе температуре, хемијска стабилност, адхезивност) је активно поље истраживања већ више деценија (25-27). Познавање понашања епокси смола приликом малих модификација хемијске структуре, може допринети осмишљавању смоласог матрикса са пожељним особинама како би се постигао чвршћи и термички отпорнији систем (27, 28).

Упркос растућој популарности материјала на бази смола у стоматологији, постоје схватања да ови материјали могу бити токсични уколико се узме у обзир могућност отпуштања невезаних компонената (мономери и адитиви) (23).

Познавање особина материјала Accura® ClearVue™, је први корак ка сагледавању потенцијала тог материјала за примену у области медицине и стоматологије (29).

Изазов за научну заједницу која изучава стоматолошке материјале јесте да повеже нове технологије са новим материјалима који су подесни за употребу у стоматологији (5). Ово отвара могућност да се истраживање стоматолошких материјала преусмери у сасвим другом правцу (5).

## **1.2 Биокompatибилност**

### **1.2.1 Теорије биокompatибилности**

Термин биоматеријал се односи на сваки авитални материјал који је намењен за интеракцију са ткивима унутар или на људском телу (16, 30). Према томе, стоматолошки материјали уведени у усну дупљу припадају групи биоматеријала, и као такви, представљају предмет специфичних законских регулатива. Већина земаља широм света дозвољава употребу само оних материјала који су успешно прошли посебне процесе провере безбедности материјала односно, могу се употребити само сертификовани материјали (16, 31, 32).

Биокompatибилност се описује као особина материјала да у биолошкој средини изазива жељени одговор домаћина при својој специфичној примени (17, 30, 33-35).

Подесан одговор домаћина у већини случајева значи да је реакција живог система на присуство биоматеријала подношљива или да је нема. Реакција живог организма на присуство стоматолошких материјала може бити и одсутна с обзиром на то да је основна активност многих денталних материјала постигнута физичким/механичким деловањем, а не фармаколошким, имунолошким или метаболичким дејством (33, 35). Стоматолошки материјали, као и импланти намењени за употребу у медицини би требали да буду биокompatибилни: нетоксични, неалергени, неканцерогени- што све подразумева хемијски и физички стабилне материјале (3, 16, 34). Биокompatибилност материјала који се користе у

медицини и стоматологији је већином одређена њиховим хемијским саставом (отпуштањем супстанци кроз растворљивост или корозију), као и храпавошћу површине материјала.

У материјал-ткиво међуспоју ипак може доћи до хемијских интеракција или деловања ткивних ензима, што може довести до ослобађања појединих супстанци и адитива из материјала у ткиво (3, 16). Хемијске супстанце могу оштетити ћелије, или стимулацијом одређених протеина изазвати запаљење. Површинска адхезија и акумулација протеина или интеракција материјала са екстрацелуларним матриксом, са друге стране, је важна за биолошко понашање материјала, а под утицајем је и хемијских и физичких карактеристика материјала.

Биокомпатибилност се другачије назива и ткивна компатибилност, и описује особину материјала да врши своју функцију уз адекватан одговор домаћина када се примени на начин за који је предодређен (16). Биокомпатибилан материјал не мора да буде и инертан, као што се раније сматрало, већ је у оцени биокомпатибилности одлучујућа прикладност одговора домаћина (17). Током последњих година, изучавање биокомпатибилности стоматолошких материјала постаје комплексна и независна научна дисциплина.

## 1.2.2 Материјал-ткиво међуспој

Материјал у контакту са ткивом изазива реакцију домаћина, али исто тако и ткиво узрокује промене у материјалу, па се из тог разлога материјал-ткиво међуспој сматра једним динамичним спојем (17). Какав међуспој ће бити креиран, зависи првенствено од ткива са којим материјал долази у контакт. На пример, међуспој материјал-дентин биће различит у односу на онај креиран у кости или меком ткиву. Ефекат ткива на материјал и обрнуто ће бити битно различит у сваком окружењу. Због тога, материјал који је биокомпатибилан у контакту са једном врстом ткива, не значи да ће бити биокомпатибилан и на неком другом месту у телу (17). Ово се најбоље види на примерима силикатног цемента који је биокомпатибилан када се тестира у *in vitro* условима, а у тестовима на пулпи зуба делује као веома јак иританс (16, 36). Пример понашања цинк-оксид еугенол цемента такође иде у прилог различитој биокомпатибилности у различитим

тквивима, јер је изразито цитотоксичан *in vitro*, а показао се као погдан у клиничкој употреби због свог аналгетичког, антисептичког и хемостатичког дејства (17, 36).

Биоматеријали су страна тела, па су и биолошки одговори на ове материјале окарактерисани као одговори на страна тела (17). Реакција типа око страног тела започиње непосредно након имплантације материјала у ткиво (32). Већина теорија говори у прилог томе да материјали промовишу неспецифичну адсорпцију протеина по својој површини, која затим стимулише формирање циновских ћелија типа око страног тела од моноцита и макрофага, а које даље утичу на стварање колагено фиброзне аваскуларне баријере између материјала и ткива (17, 32). Површинска адсорпција или акумулација протеина, као и интеракција материјала са екстрацелуларним матриксом, је важна за биолошко понашање материјала. Адхезија протеина је под утицајем како хемијских, тако и физичких особина материјала (16, 32). И ослобађање супстанци из материјала кроз растворљивост или корозију одређује биокомпатибилност. Ове супстанце могу оштетити ћелије, или стимулисањем ћелијске синтезе или извесних протеина (проинфламаторних медијатора (интерлеукина 1 и интерлеукина 6) индуковати запаљење (16). Промене у материјалу који је уведен у биолошку средину могу настати било због корозије, хемијске модификације, депозиције супстанце, деградације или неког другог механизма (16).

Биоматеријали се сматрају заправо биоактивним материјалима услед стварања активног односа материјал-ткиво (16, 17). Са препознавањем ове биоактивне димензије материјала, Вилијамс је ажурирао постојећу дефиницију биокомпатибилности: „биокомпатибилност је способност материјала да испуни своју функцију медицинског терапијског средства, без изазивања било каквих непожељних локалних или системских ефеката у примаоцу односно кориснику такве терапије, али са стварањем најадекватнијег целуларног/ткивног одговора у специфичној ситуацији и оптимизирањем клинички релевантне терапије“ (17).

Треба напоменути да је избегавање или ограничавање одговора на страног тело био главни циљ у развоју материјала у протеклој деценији (17).

### 1.2.3 Ткивни одговори на материјале

Одговор домаћина на страног тела наступа непосредно након контакта ткива и материјала. Материјал у контакту са ткивом домаћина може изазвати локалне и системске реакције. Реакције ткива могу бити:

- инфламација
- алергијске реакције
- локалне реакције
- системска токсичност
- канцерогена, мутагена и тератогена дејства (16).

Односно, по новијој класификацији, интеракције ткива и материјала могу бити:

- локалне интеракције
- системске интеракције
- придружене компликације (32).

Локално деловање материјала на ткиво домаћина могу бити: крв-материјал интеракције, запаљење и/или инфекције, токсичност материјала, промене у зарастању ране, карциногенеза (32).

Ефекти ткива на материјале су адсорпција протеина на имплантат, ензимско деловање, деградација материјала као и физичко-механички ефекти хабање, корозија, ломљење.

Системски ефекти присуства биоматеријала подразумевају опште реакције организма на присуство страног тела, а укључују системску токсичност, тромбоеболијске и алергијске реакције (32).

У стоматологији, локалне реакције се примарно дешавају на пулпи, периапикалном периодонцијуму, на гингиви/оралној мукози (16). Међутим, хемијске супстанце ослобођене из материјала могу проћи епителну баријеру и крвним или лимфним судовима доспети до удаљених органа и ткива.

### 1.2.3.1 Локалне реакције

Супстанце ослобођене из стоматолошких материјала могу узроковати реакцију (запаљење или некрозу) околних ткива, као што је орална слузокожа/гингива, пулпа, алвеоларна кост. Уколико материјал утиче на ћелијски метаболизам, последица може бити ослобађање про-инфламаторних медијатора. Због тога се спроводе тестови цитотоксичности који се односе на оштећење појединачне ћелије у ћелијским културама (16).

Поред тога, локалне ткивне реакције могу бити узроковане и неким другим факторима, а не само супстанцама ослобођеним из стоматолошких материјала. Неки од њих су присуство бактерија које се акумулирају на површини, ивицама или испод материјала (16). Поједини сојеви бактерија добро пријањају и на глатку и на храпаву као и на хидрофобну површину (тефлон), што је важно напоменути, јер не постоји савршена површина материјала која је резистентна на бактеријску колонизацију.

### 1.2.3.2 Инфламација

Запаљење представља високо сврсисходну одбрамбену реакцију организма на оштећење ћелија и ткива (37). Сврха инфламаторне реакције је иста, било да је оштећење ткива проузроковано механичком траумом, микробиолошким узрочницима, страним антигенима или електричним, хемијским или радиолошким утицајима. Запаљење је процес чија је сврха да умањи, ограничи, разори или изолује штетни агенс, а потом да покрене репараторне процесе у циљу зарастања и оздрављења оштећеног ткива. Надражаји средњег интензитета могу изазвати запаљење, за разлику од надражаја слабог интензитета који изазивају реверзибилне дегенеративне промене и за разлику од надражаја јаког интензитета који ће изазвати иреверзибилна оштећења ткива (нпр. некроза) (38). Другим речима, запаљење ће настати када штетни агенс не оштети потпуно структуру ткива, већ га оштети у тој мери да је ткиво у стању да одреагује. Одговор прогредира кроз стадијуме запаљења (зарастања ране) са учешћем разних типова ћелија као специфичних показатеља посебних стадијума реакције. Ове ћелије могу пријањати, ослобађати различите медијаторе запаљења, привући друге ћелије,

расти, умножавати се, умирати (31). Микроскопски се процеси који се одвијају на месту оштећења могу поделити на: алтерацију, ексудацију и пролиферацију.

Запаљење се може поделити према узроку, према доминантној промени у запаљењу и према току. Узроци инфламације могу бити инфективни агенси (бактеријска, вирусна, паразитарна, гљивична запаљења), исхемија, имунолошке реакције, физички или хемијски агенси. Према морфолошким променама запаљење се дели на алтернативна, ексудативна и пролиферативна. Алтернативна запаљења су карактеристична по доминацији дегенерације, атрофије или некрозе ткива. Ексудативна се карактеришу накупљањем течности и уобличених елемената из крвних судова, односно накупљањем ексудата у екстрацелуларном простору. Пролиферативна запаљења су она у којима доминира пролиферација ћелија- пролиферација крвних судова и фибробласта у циљу репарације ткива. Новостворено ткиво представља младо гранулационо ткиво, које ће временом сазрети у зрело везивно ткиво- ожиљак. По току запаљења могу бити перакутна, акутна, субакутна, субхронична и хронична. Запаљења која се јављају као реакција на присуство страног тела припадају групи примарно хроничних запаљења у којима је доминантна пролиферативна компонента, а ексудативна је слабо изражена. Настају као последица стално присутног слабог надражаја (присуство страног тела) (38).

### **1.2.3.3 Алергије**

Алергијска реакција јесте стање (генетски предиспонирано) које настаје као резултат пренаглашене реакције на поновно излагање организма страној супстанци. Резултат нетолеранције организма су различита стања као што су алергијска кијавица, астма и копривњача, контактни дерматитис и екцем.

Неподношљивост је наслеђена реакција која личи на алергију и има сличне медијаторе и факторе, као што је активација комплемента и ослобађање хистамина, али није зависна од претходних процеса сензибилизације. Реакције неподношљивости су обично повезане са храном и лековима, као што је на пример ацетилсалицилна киселина.



Супстанце које имају способност изазивања реакција хиперсензитивности се називају алергени и то су често супстанце мале молекуларне тежине (хаптени), које постају прави алергени тек после везивања са неким већим молекулама (носачи хаптена) као што су протеини. Хаптени повезани са биоматеријалима су обично липосолубилне органске супстанце из полимерних материјала или метални јони и соли метала.

Концентрације компоненти материјала које су потребне да отпочне алергијска реакција се разликују индивидуално и много су ниже у односу на потребне концентрације за токсичне реакције. Алергијска реакција на супстанцу може бити покренута једино уколико је организам претходно био изложен сензибилишућој дози супстанце, па је уследило излагање новој дози исте супстанце која се сада назива шокна доза.

Разликују се четири различита типа алергијских реакција. Тип I, II и III су реакције посредоване антителима, док је тип IV примарно посредован ћелијама. Стоматолошки материјал може узроковати алергије типа I (имедијатна реакција) и типа IV (одложена реакција) (16). Алергијске реакције узроковане стоматолошким материјалима могу се испољити интраорално или као удаљене реакције екстраорално, као што су реакције на изложеност никлу (16).

Бројни извештаји и истраживања о алергијским својствима стоматолошких материјала су објављени у научној литератури. Алергије повезане са стоматолошким материјалима су све више значајне, због све шире производње смоластих мономера. Реакције како пацијената, тако и стоматолошког особља могу бити алергијског порекла (16).

#### **1.2.3.4 Токсичност материјала**

Токсичност материјала се може дефинисати као особина материјала да оштети биолошки систем хемијским путем (16). Имунотоксичност материјала описује нежељене ефекте на структуру и функцију имуног система.

Локална токсичност материјала подразумева нежељену реакцију ткива која је ограничена на место примене материјала. Системска токсичност материјала, са друге стране, подразумева нежељену реакцију домаћина у којој се нежељене

реакције јављају на местима удаљеним од места примене материјала (16). Најчешће су то регионални лимфни чворови и плућа (32).

Локална токсичност мора бити разликована од локалне ткивне компатибилности. Локална токсичност је базирана на хемијској интеракцији токсичне супстанце са биолошки релевантним молекулима. Ткивна компатибилност зависи и од других фактора као што је, на пример, акумулација бактерија испод или на материјалу (испуну, мосту, протези). Одлике локалне токсичности се одређују различитим тестовима. Релативно једноставни тестови (ћелијске културе, тестови имплантације) не репрезентују циљна ткива након апликације материјала у усну дупљу пацијента, и због тога подаци добијени из таквих тестова говоре о неспецифичној токсичности материјала. Насупрот томе, у такозваним тестовима примене, експериментални материјали се користе на животињама или у изузетним случајевима на људима, и они су еквивалент примени материјала на људима (16).

Скоро сви стоматолошки материјали ослобађају супстанце у усну дупљу, које могу различитим путевима (путем пљувачке или инхалацијом, или продирањем кроз епителну баријеру) ући даље у тело, са последичним проласком епителијалних баријера гастроинтестиналног тракта или плућа. Путем циркулације, ове супстанце могу бити транспортоване до различитих органа (16).

Место апликације на тај начин може бити битно различито од места где се испољава нежељени ефекат. Системска токсичност подразумева испољавање ефеката на специфичан орган уколико је концентрација штетне супстанце довољно висока. Према временским оквирима, разликујемо акутну (време експозиције је до 24 сата), субакутну (до три месеца) и хроничну токсичност (16).

Како би се одредила системска токсичност обично се спроводе експерименти на животињама. Материјали и супстанце које се испитују могу бити примењени на различите начине. У стоматологији, већина супстанци се примењује орално (храћењем екстрактом материјала или самим материјалом). Хронична системска токсичност се одређује применом материјала или екстракта у трајању од неколико месеци или се испитивања некада продужавају на читав животни век животиње.

На крају ових студија, одређују се степен преживљавања животиња и патохистолошке промене специфичних органа (16).

Потпуније информације које се тичу хроничне токсичности се добијају случајно и базирају се на опсервацији денталног особља које је често у контакту са активним, невезаним материјалом (16).

Подаци о акутној системској токсичности у прошлости су се рутински презентовали како би се материјал оценио према релевантним легалним регулативама и стандардима. На жалост, ове информације се често не објављују и нису доступне за научну дискусију. Доступни подаци који се односе на акутну LD50 (средња смтрна доза- доза токсичне супстанце која убија 50 процената тест популације) показују да су стоматолошки материјали окарактерисани као генерално ниско акутно токсични.

Само ретка истраживања су доступна, а тичу се хроничне токсичности. Обимни налази су објављени само о денталном амалгаму (о различитим аспектима хроничне експозиције, а нарочито о токсикологији живе) (16).

Парацелзус је још у раном 16. веку истакао како токсичне реакције зависе од дозе (*“Dosis facit venenum”*). За денталне материјале, доза значи количину супстанце која је ослобођена из датог материјала (16).

#### **1.2.3.5 Мутагена, канцерогена и тератогена дејства**

Поједини материјали или супстанце ослобођене из ових материјала могу испољити генотоксичан, мутаген или канцероген ефекат. Генотоксичност материјала је заправо способност материјала да узрокује промене односно оштећења генома и ДНК ћелија. Ћелије могу избећи преношење ових алтерација на следеће генерације ћелија било механизмима репарације, било апоптозом. Мутагеност материјала јесте изазивање промена на геному која се преносе на следећу генерацију ћелија. Канцерогеност материјала се огледа у промовисању аутономне несврхисходне пролиферације ћелија, односно у туморогенези, а последица је мутација ћелијских регулаторних гена (гени неопходни за физиолошко функционисање ћелије, репликацију, раст и репарацију) (32).

Тератогене супстанце су оне које узрокују оштећење плода (нпр. талидомид). Мада су ови ефекти, када су у питању стоматолошки материјали више теоретски, ипак и супстанце које се ослобађају из стоматолошких материјала треба да буду истражене у погледу потенцијалног тератогеног дејства. Ово се односи и на могућ утицај на репродуктивну способност (16).

У релевантним стандардима су описане различите методе, нарочито *in vitro* технике за процену мутагености материјала. У основи, истражује се утицај материјала на геном бактерије или ћелије сисара (16).

Број објављених студија које се односе на мутагеност стоматолошких материјала је мали. Већина документованих *in vitro* података односи се на материјале за пуњење канала корена, композитне смоле/адхезиве и поједине цементе (16).

Код појединих материјала, на пример код адхезива који садрже глутаралдехид, код специфичних материјала за пуњење канала корена базираних на епоксидима и код појединих акрилних материјала, посебно док су још неvezани, примећени су мутагени ефекти (16).

Број студија на животињама у којима се испитује мутагеност и канцерогеност су малобројне. Оцена резултата добијених тестовима мутагености је веома тешка. Евалуација серије од 300 хемикалија посредством АМС теста открило се да су око 90% испитиваних канцерогених супстанци мутагене, а 87% неканцерогених супстанци су немутагене (16).

Да би се оценила тератогена оштећења, тест супстанца се мора применити на животињама, као што су глодари, пре парења (мужјаци и женке) или после парења (само женке). На крају студије, женке и фетуси се макроскопски и микроскопски прегледају на малформације. Ова проба се може проширити и на следећу генерацију.

Индикације за ове екстензивне студије се разматрају са великом резервом у релевантним стандардима који се тичу стоматолошких материјала (ISO 10993-3) (16, 39).

### 1.3 Стратегије за евалуацију биокомпатибилности

Испитивање биокомпатибилности стоматолошких материјала је комплексна и изазовна научна област из разлога што је једна експериментална метода често погодна за испитивање само једног типа нежељених реакција од широког спектра могућих (3). То значи да је потребно спровести различите тестове за испитивање, на пример, иритирајућег потенцијала новог материјала на оралну слузокожу и за испитивање његове токсичности.

Табела 1- Избор уобичајених тест метода за оцену биокомпатибилности стоматолошких материјала (16).

	Системке реакције	Локалне реакције	Алергијске реакције	Друге реакције
In vitro	Културе ћелија за испитивање специфичних проблема	Културе ћелија - Агар дифузиони тест - МТТ тест - Тест дентинске баријере	-Модели ћелијских култура се тренутно развијају	Мутагеност - Амесов тест - Микронуклеус тест - HPRT тест - Mouse lymphoma
Експерименти на животињама	-Акутна LD50 (нпр., орална апликација) - Хронична LD50 (нпр., орална апликација)	-Тестови имплантације -Тестови употребе - пулпа/дентин тест - Ендодонтски тестови -Тестови имлантације	-Тест максимизације са модификацијама -Тест локалних лимфних чворова	-Микронуклеус тест (глодари) -Тестови тератогености (глодари) -Тестови репродуктивне токсичности (глодари)
Експерименти на пацијентима	Клиничке студије			
Друго	Професионална изложеност, тровање			

Поједине тест методе су обично адекватне за испитивање једног одређеног типа нежељене реакције, односно једног аспекта одређеног типа нежељене реакције. На пример, испитивањем на ћелијским културама ће се открити само утицај материјала на изоловану ћелију. Ови налази се не могу тумачити и пренети на пацијенте без ограничења. Материјал који не узрокује реакцију на ћелијским културама ипак може узроковати проблеме код пацијента због присуства пљувачке, променљиве рН вредности или температурних промена у усној дупљи. Ови фактори могу узроковати различите промене у материјалу *in vivo*, у поређењу са неутралним условима у ћелијским културама. Из тог разлога, налази на ћелијским културама могу пружити почетне информације у разјашњавању механизма нежељених реакција код пацијената (16).

Уобичајени приступ у испитивању биокомпатибилности је да се почне са једноставним *in vitro* тестовима базираним на ћелијским културама, као што се рутински ради у токсикологији. Уколико ови експерименти дају обећавајуће резултате, онда се раде сложенији експерименти на животињама и тестови употребе на људима (17). Клиничке студије су последњи корак у процесу евалуације биокомпатибилности (16). Преглед тест метода је дат у табели 1 (16).

Треба напоменути да се у овом процесу, прво морају анализирати доступни подаци о физичким и хемијским карактеристикама материјала, а потом се доноси одлука о потреби и врсти даљих испитивања.

Уколико је материјал већ био примењиван у пракси, а састав му је само мало измењен, онда се његова штетност може потврдити на основу хемијске анализе екстракта. Уколико су потребни даљи тестови- на пример зато што је формулација значајно измењена или су употребљене нове компоненте- онда су прво потребни *in vitro* тестови. Последично, ризик може бити поновно процењен спровођењем даљих тестова уколико је то потребно. Ова правила имају предности јер се сваки материјал индивидуално оцењује. На тај начин се могу избећи непотребни експерименти на животињама и може се убрзати производња и пласирање материјала на тржиште (16).

Не само материјал чији је хемијски састав измењен, већ и сваки материјал који се производи другачијим технолошким поступком од до тада коришћеног и

тестираног (сертификованог) мора се проверити и тестирати. Постоји могућност да технолошки поступак, у нашем случају адитивна производња, утиче на особине материјала (4). У адитивној производњи објекти се граде полимеризацијом „слој по слој“ па се може претпоставити да ће у тако произведеним објектима бити мање невезаних компоненти материјала.

### 1.3.1 In vitro тестови

*In vitro* тестови су најмлађа стратегија у одређивању биолошког одговора на материјал и користе се као иницијални тестови у испитивањима биокомпатибилности (39).

Тренутно се *in vitro* тестови дефинишу као тестови који се изводе изван живог организма, у лабораторијском посуђу, уз коришћење култура ћелија или саставних делова ћелије (40, 41). *In vitro* тестови осмишљавају се тако да симулирају биолошку реакцију ћелија и ткива које долази у контакт са испитиваним материјалом. У њиховој најсофистициранијој форми, *in vitro* тестови користе мултипле ћелије, баријере или специјалне услове како би што боље имитирали услове *in vivo* (17).

*In vitro* тестови су бржи, једноставнији, јефтинији, лакши за понављање и лакши за оцењивање од других врста тестова (42, 43). Прилагођени су за препознавање механизма целуларног одговора, чак до мутације једноставног пара гена или до нивоа фосфорилације аминокиселина у протеине. У условима *in vitro* могу се испитивати и међусобни утицаји биоматеријала и микроорганизама са којима су исти материјали у контакту у устима пацијента (40, 41).

Недостатак *in vitro* тестова је непостојање одбрамбених реакција ткива и читавог организма на присуство испитиваног материјала, па се резултати добијени на овакав начин морају на посебан начин тумачити у односу на клиничку употребу материјала (30). Резултати *in vitro* тестова се, пре свега, односе на акутни токсични ефекат, и из тог разлога се *in vitro* тестови користе као тестови за процену биолошке сигурности материјала (17, 31). Упркос манама, могућност да контролишемо и посматрамо однос ћелија–материјал у *in vitro* окружењу дају добар увид у то како материјали утичу на биолошке системе (17). Компоненте *in*

*in vitro* тестова су биолошки систем (културе ткива или органа, ћелијске културе), врста контакта материјала и ћелија и коначна биолошка реакција на присуство материјала (33).

За *in vitro* испитивања стоматолошких материјала користе се једнослојне културе ћелија или тродимензионални (3D) модели оралне мукозе (добијени ткивним инжињерингом), чији избор и распоред симулирају *in vivo* услове. Избор ћелија (перманентне или примарне ћелијске линије) зависи од биолошког циља предвиђеног у тесту цитотоксичности.

Перманентне (континуиране, инморталне) ћелијске линије су јасно морфолошки и функционално дефинисане, релативно се лако култивишу и комерцијално су доступне. Њихова употреба омогућава добру корелацију резултата различитих лабораторија. Са друге стране, оне су једноставнији репликациони системи, без специфичног метаболичког потенцијала нормално присутног у организму. У циљу испитивања потенцијалне токсичности стоматолошких материјала најчешће се користе фибробластне, епителне, остеобластне, остеокластне, одонтобластне и туморске ћелије (44).

Примарне ћелијске линије добијене су биопсијом оралне слузокоже, пулпе, пародонцијума или из периферне крви и установљене су у самој лабораторији. Њима се постиже боља симулација ситуације *in vivo* јер поседују све особине ткива из кога су узете. Избор примарних ћелија зависи од врсте испитиваног материјала, као и од врсте ткива са којим је испитивани материјал у непосредном контакту. Доступне су само у специјализованим лабораторијама, па се користе за специфична научна истраживања (44).

Увођење 3D модела имало је за циљ превазилажење главног недостатка једнослојних ћелијских култура- ограничене клиничке релевантности. Употребом ових модела могуће су сложене анализе биолошког одговора оралне мукозе на присуство рестауративног материјала, чиме се смањује потреба за тестирањем на експерименталним животињама (33). Контакт између ћелијске културе и испитиваног материјала остварује се директним, индиректним путем или посредством екстракта (40). У случају директног контакта, цитотоксичност се мери стопом ћелијске смрти у функцији времена експозиције и удаљености од



узорка који је у чврстом агрегатном стању (44). Најчешће компликације *in vitro* тестова са директним контактом су бактеријска контаминација ћелијске културе, као и механичко оштећење ћелија непосредним додиром са материјалом. (33). Стерилизација узорака стоматолошког материјала који се испитује на ћелијским културама је неопходна. Некада је то веома захтеван процес током кога је потребно стерилисати материјал на ниској температури без промене његових механичких карактеристика. Из тог разлога могу се јавити грешке у процесу стерилизације и контаминација ћелијске културе. Индиректни контакт ћелија и материјала подразумева употребу пропустљивог интермедијума, најчешће синтетичког филтера или дентинске мембране. Овај метод је независан од физичког стања материјала, те материјал може бити у чврстом, полутечном или течном стању. Интимни контакт између материјала и ћелија омогућава дејство и компоненти које нису растворљиве у води (44).

Контакт између нерастворљивих материјала и ћелија се може успоставити екстраховањем ослобођених компоненти растварачем (ћелијски медијум, дестилована вода, физиолошки раствор и пуферисани раствори соли) (45).

Табела 2 – Предности и мане појединих *in vitro* метода (31).

	Директни контакт	Агар дифузија	Елуција
Предности	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Елиминише припреме за екстракцију</li> <li>• Зона дифузије</li> <li>• Циљне ћелије се додирују са материјалом</li> <li>• Подражава физиолошке услове</li> <li>• Стандардизује количину тест материјала или тест недефинисаних облика</li> <li>• Продужава време изложености додавањем свежих посредника</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Елиминише припреме за екстракцију</li> <li>• Зона дифузије</li> <li>• Боља концентрација градијента од токсиканата</li> <li>• Може да тестира једну страну материјала</li> <li>• Не зависи од густине материјала</li> <li>• Користи котуре филтер папира за тестирање течности или екстракта</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Одваја екстракцију од тестирања</li> <li>• Последице реакција на дозу</li> <li>• Продужено време изложености</li> <li>• Избор услова екстракта</li> <li>• Избор растварача</li> </ul>
Мане	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Оштећење ћелија ако се материјал помери</li> <li>• Оштећење ћелија код материјала велике густине</li> <li>• Опадање популације ћелије код врло растворљивих токсиканата</li> <li>• Ограничено време изложености</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Захтева равну површину</li> <li>• Растворљивост токсиканата у агару</li> <li>• Могућ топлотни удар код припремања агар облоге</li> <li>• Могућа апсорпција воде из агара</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Захтева више фаза и времена</li> </ul>

Стерилизација растварача врши се центрифугирањем или стерилним филтрирањем, чиме се значајно смањује могућност контаминације ћелијске културе. Ово је најчешће примењивана метода испитивања цитотоксичности различитих стоматолошких материјала (рестауративни материјали, стоматолошки материјали, амалгами, дентални цементи, акрилати за базу зубне протезе и стоматолошки адхезиви) (46-48).

Биолошка реакција ћелија може да се опише морфолошки или квантитативном анализом. Третирање ћелија цитотоксичним материјама може довести до различитих оштећења ћелија. Оне могу подлећи некрози, када губе интегритет мембране и брзо умиру као резултат лизе ћелије. Затим, нормални раст и деоба ћелија могу престати (опадање ћелијске пролиферације), или се може активирати генетски програм контролисане ћелијске смрти (апоптоза). За

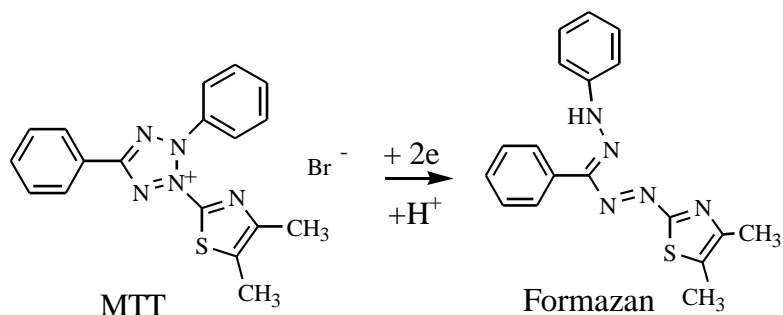
једноставнија истраживања потенцијалне токсичности стоматолошких материјала користе се методе које се базирају на оштећењу ћелијске мембране и испитивању степена ћелијске вијабилности и пролиферације (агар и филтер дифузиони тест, алмар плаво, трипан плаво, МТТ, пропиридијум јодид тест, тестови инкорпорације радиоизотопа и др.). Цитотоксичност и цитостатичност материјала се могу одредити преко тестова вијабилности.

Ћелијска вијабилност се дефинише као број живих ћелија у укупном ћелијском узорку. Процена ћелијске вијабилности може се вршити на два начина: директно и индиректно. Директна метода је најједноставнија и заснована је на очувању интегритета мембране здраве ћелије и особини да не пропушта боје као што је трипан плаво. У овом случају мртве ћелије се обоје, а здраве ћелије не примају боју па се могу директно избројати у хемоцитометарској комори.

Поједине боје имају способност да прођу кроз мембрану вијабилних ћелија, да уђу у унутрашњост ћелија и да их обоје везујући се за одређене ћелијске структуре (49). Боја неутрално црвено транспортована кроз плазмалему у унутрашњост ћелије везује се за лизозоме и пролиферативну ДНК (49). На тај начин неутрално црвено боји живе ћелије интензивно црвено. На овом феномену заснива се тест агар дифузије.

Индиректна метода се заснива на процени метаболичке активности која представља индикатор ћелијске вијабилности. Метаболичка активност се одређује тако што се ћелије инкубирају са тетразолијумским солима (МТТ, ХТТ, WST-1) и на тај начин се добијају формазански производи. Количина обојених формазанских продуката је директно сразмерна метаболичкој активности ћелија (50).

МТТ тест се заснива на редукцији тетразолијумове соли [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид, (МТТ)] у љубичасто обојени производ (формаза; шема 1), у присуству митохондријалног ензима сукцинат дехидрогеназе (32, 46, 49, 51). Количина надрађеног формазана директно је пропорционална броју вијабилних ћелија, а апсорбанца се одређује на спектрофотометру (микрочитачу), на две таласне дужине: тест таласној дужини од 540 nm и референтној таласној дужини од 690 nm.



Шема 1.- Метаболичка трансформација МТТ у формазан.

Адаптација *in vitro* тестова је допринела успеху у корелацији са клиничком употребом материјала. Међутим, број варијабли које истраживач мора да дефинише у чак једноставном *in vitro* тесту је тежак задатак. Са много варијабли које треба контролисати, може се очекивати варијација у резултатима међу различитим истраживачким групама (17). Модерни концепт тестирања биокompatibilности стоматолошких материјала заснован је на редукцији експеримената на животињама кроз бољу симулацију *in vivo* услова у *in vitro* експериментима.

## 1.3.2 Експерименти на животињама

### 1.3.2.1 *In vivo* тестови

*In vivo* тестови биокompatibilности подразумевају експериментална истраживања на животињама или на људима који су на то добровољно пристали. Идеалан експеримент за тестирање особина медицинских и стоматолошких материјала био би на људима. Тестирање на људима није увек безбедно, самим тим ни етички, па су у употреби експерименти на животињама као алтернативним моделима. Експерименти спроведени на животињама дају нам одређени степен знања о понашању испитиваног материјала у биолошкој средини (52-54).

Чак и уколико се ризик од оштећења датим материјалом сматра прихватљивим, важно је имати на уму, да ће поједини пацијенти ипак имати проблеме под одређеним условима- што се може дефинисати и као проблем

индивидуалне компатибилности (16). Треба напоменути да је, кад год је то могуће, потребно модификовати *in vitro* тестове и тестове на животињама, како би боље имитирали клиничке услове и како би резултати ових тестова били у што већој мери клинички релевантни (17). *In vitro* тестови нам не могу дати информације везане за све сфере биолошког одговора као што су крвне интеракције, зарастање рана, реакције преосетљивости, карциногенеза, хронична инфламација, формирање кости, дентиногенеза. О овим типовима ефеката пружају нам информације експерименти на животињама без излагања људи ризику (17).

Експериментална испитивања биолошког одговора на малим лабораторијским животињама врше се тестовима имплантације, алергијским тестовима и испитивањима акутне и хроничне системске токсичности стоматолошког материјала (41).

Експерименти на животињама могу бити осмишљени тако да имитирају клиничку употребу до одређеног степена јефтинији су и бржи од експеримената на људима, и могу бити у већем степену контролисани (54). Животиње могу бити изложене материјалу или продуктима деградације материјала, са путевима администрације или уз дозе које би било неетички применити на људима. Такође, животиње могу бити третиране у различитим стадијумима живота (ембриони, младунчад) на начин на који то није могуће спровести код људи. Ипак, добијене резултате треба узимати са резервом јер разлике у морфолошким и функционалним особинама ткива и органа људи и животиња ипак постоје. Такође, могућност за прилагођавање експеримената на животињама тако да тачно одговарају и имитирају материјал-човек међуспој може бити ограничена до те мере да је релевантност компромитована.

### **1.3.2.2 Тест иритације оралне мукозе**

За тестирање стоматолошких материјала који долазе у контакт са слузокожом усне дупље препоручује се тест иритације оралне мукозе на сиријским златним хрчковима (55). Сиријски златни хрчак се често користи у биомедицинским истраживањима (56-60). Постојање букалне кесице код хрчка чини ову врсту посебно корисном у различитим областима истраживања као што

су имунолошка, патолошка, микробиолошка и др. (61). Букалне кесице сиријских златних хрчака су инвагинације усне дупље у форми епителијалних врећица (60). То су парне, високоваскуларизоване, растегљиве и слободне структуре танких зидова који се хистолошки састоји од четири слоја (61). Функција букалних кесица је транспорт и чување хране, па је епител који их облаже високоотпоран на абразију, што иде у прилог тестирању на овај начин јер је и плочасто слојевити епител са орожавањем који облаже гингиву и тврдо непце у усној дупљи људи изложен најјачем дејству мастикаторних сила (60). Контакт између епитела и везивног ткива остварује се преко таласасте базалне мембране уз формирање епителних пречки. На тај начин повећава се контактна површина, чиме се превенира евентуална сепарација ова два слоја током мастикације.

Лamina проприја се састоји од везивног ткива са бројним и густо пакованим везивним влакнима са пар фиброцита (61). Између уздуж и попречно оријентисаних колагених влакана налазе се фини капиларни простори. Мишићни слој или туника мускуларис је састављена од попречно-пругастих мишића различите дебљине, окружених растреситим фиброзно-везивним ткивом. У зиду букалне кесице нема ни дифузног ни нодуларног лимфног ткива. Макрофаги, присутни у слоју везивног ткива представљају посреднике у дренажи одређених супстанци у мандибуларне лимфне чворове (61). Са ових локализација, макрофаги могу уклонити све стране материјале, али претпоставља се да не могу мигрирати кроз компактну ламину проприју како би то постигли. Поред тога, субепително ткиво је толико густо, да би лимфна дренажа била практично немогућа.

Поједини аутори наводе да антигени напуштају зид букалне кесице и дистрибуирају се по букалном везивном ткиву, вероватније него да се дренирају у регионалне лимфне чворове (61).

### **1.3.2.3 Тест субкутане имплантације**

Тест субкутане имплантације на пацовима се сматра једном од поузданих метода за евалуацију биокомпатибилности. Ова метода испитивања биокомпатибилности нашла је широку примену из више разлога: пацови су доста економични и најотпорнији на постоперативне инфекције, а субкутано везивно

ткиво дорзума лако реагује на хемијске компоненте и даје објективну слику односа ткива и биоматеријала (62).

Кожа пацова је грађена од три слоја: епидермис, дермис и хиподермис. Епидермис је спољашњи слој, састављен од кератиноцита, меланоцита, Меркелових ћелија и Лангерхансових ћелија. Овај слој је не васкуларизован. Исподлежећи слој је дермис кога чине густо распоређена колагена и еластична влакна. Овај слој је прожет крвним и лимфним судовима као и нервним влакнима. У најдубљем слоју коже, хиподермису налазе се адипоцити, фибробласти и макрофаги и такође крвни, лимфни судови и нервна влакна. Испод овог слоја налази се мишићни слој дорзума и фасција суперфицијалис. Кожа пацова садржи бројне фоликуле и знојне жлезде које могу утицати на изглед препарата и реакцију на материјал (62).

Као и у случају са *in vitro* тестовима, када су у питању експерименти на животињама, велик број варијабли се мора размотрити како би се добиле валидне информације. Број варијабли је можда мањи него у *in vitro* тестовима, али су и даље бројне: форма материјала, како изложити животињу материјалу, врста, старост, пол животиње, дужина трајања контакта, како оценити одговор.

Контролни узорци у експериментима на животињама су најчешће направљени од тефлона (политетрафлуороетилен). То је инертан, нецитотоксичан материјал, често коришћен као инертна негативна контрола у тестовима цитотоксичности. Тефлон има мали афинитет за адхезију ћелија, а присуство инфламације у додиру са ткивом може бити повезано са реакцијом на страном телу, с обзиром да локална иритација може узроковати инфламацију (63-65).

### 1.3.3 Клиничке студије

Клиничке студије представљају „златни стандард“ у оцени било које особине стоматолошких материјала, укључујући и биокомпатибилност. Ове студије су скупе, временски ограничене, тешке за контролу и интерпретирање резултата и правно и етички јако компликоване (65).

Постоји неколико врста клиничких студија. Тестови примене су специјална клиничка контрола новог материјала на волонтерима и представљају најрелевантније тестове биокомпатибилности.

С обзиром на све већи притисак јавности у циљу заштите експерименталних животиња и како испитивање на људима подлеже строгим етичким принципима, предност треба дати тестовима заснованим на вештачким моделима ткива и органа, са што бољом симулацијом услова који постоје у живом организму. Неопходно је да сваком *in vivo* испитивању претходи детаљна анализа на компјутерски симулираним моделима и испитивање у условима *in vitro*. Права оцена о неком материјалу може се дати тек након дужег коришћења у клиничкој пракси (65).

#### **1.4 Одређивање површинске храпавости узорака**

У процени биокомпатибилности битни су и површина и облик узорака материјала (31). Узорци који су направљени од истог материјала, али различитог облика (троугао и диск) изазваће различите реакције након уградње у меко ткиво. Јачу реакцију ће изазвати узорци облика троугла (31). Параметри који описују површину материјала а важни су за биолошке реакције су храпавост, квашење, површинска покретљивост, хемијски састав, електрични набој, кристална структура и хетерогеност. За сваки појединачни случај, најзначајнији параметри се одређују посебно.

Методe за мерење површинске храпавости узорака се могу поделити на дводимензионалне и тродимензионалне, као и на контактне и безконтактне методе (66, 67). Контактне методе храпавост материјала мере помоћу мерача: игла, пипак, сонда, фокусирани сноп светла. Безконтактне методе користе скенирајућу сонду. Контактне методе користе мерни инструмент којим се мери висина сваке тачке на испитиваној површини. Основни инструменти за мерење храпавости површине састоје се од мерача који је у контакту са површином клизи по њој, потом уређаја за прикупљање и појачавање сигнала и конвертора- уређаја који прикупљене



сигнале претвара у нумеричке параметре (68). Метода контактне профилометрије је често коришћена у различитим истраживањима (69-74).

## 2. Циљ, хипотеза и научна оправданост

Циљ овог истраживања је одредити степен биокомпатибилности новог материјала на бази епокси смоле- Accura ClearVue, и то:

1. Испитати цитотоксичност полимера Accura® ClearVue™ на ћелијској култури мишијих фибробласта L929 и хуманих фибробласта MRC-5.
2. Утврдити степен иритације оралне слузокоже материјалом Accura® ClearVue™ на анималном моделу сиријског хрчка.
3. Испитати биокомпатибилност материјала Accura® ClearVue™ на анималном моделу пацова.

Хипотезе истраживања су:

- Полимер на бази епокси смоле Accura® ClearVue™ не делује цитотоксично на L929 фибробласте миша и MRC-5 хумане фибробласте.
- Полимер на бази епокси смоле Accura® ClearVue™ не изазива иритацију оралне слузнице хрчка.
- Полимер на бази епокси смоле Accura® ClearVue™ изазива благу реакцију ткива при субкутаној имплантацији у леђа пацова.

### 3. Материјал и методе

#### 3.1 Испитивани материјал

У сврху истраживања начињени су узорци од од новог полимера на бази епокси смоле, који је добијен адитивном технологијом Accura® ClearVue™ (хемијски састав: 4,4'-изопропилидендициклохексанол, продукти олигомерне реакције са 1-хлор-2,3-епоксипропаном (40-65%), смеша триарил-сулфонијум соли (50% пропилен-карбоната и 50% триарил-сулфонијум хексафлуороантимонатних соли) (1-10%) и 3-етил-3-хидроксиметил-оксетан (10-20%) (22).

#### 3.2 Одређивање површинске храпавости узорака

Површинска храпавост експерименталних узорака и контролних узорака од тефлона измерена је помоћу уређаја *MarSurf PSI*, *Mahr GmbH*, *Nemačka* методом контактне профилометрије.

Пипак малог радијуса (2  $\mu\text{m}$ ) сопственом, непромењеном фреквенцијом, под дејством силе  $F=0.7\text{mN}$  клизио је по површини узорка. Ход пипка, дефинисан дужином снимања, износио је  $L_t=5.6$ . У зависности од храпавости површине пулсације пипка су се модулирале, добијени подаци су се појачавали, а затим демодулирали. У електронском делу уређаја се добијао напон у зависности од изгледа површине (68).

Опсег мерења био је  $R_a=0.01$  до  $38\mu\text{m}$ , резолуција  $0.001\text{mm}$ , проширена мерна несигурност  $U=4.12\%$ . Дужина процењивања,  $L_m=4\text{mm}$ , а вредност референтне дужине  $\lambda_c=0.8\text{mm}$  одређена је избором  $L_t$  према ISO стандарду (ISO 4287) (75). Вредност средњег аритметичког одступања профила ( $R_a$ ) узимао се као највише коришћен параметар који описује изглед површине (71).

### **3.3 *In vitro* испитивање цитотоксичности Accura ClearVue полимера**

#### **3.3.1 Начин извођења експеримента**

Испитивање цитотоксичности материјала вршено је директним контактом и помоћу екстракта.

#### **3.3.2 Припрема елуата**

Узорци експерименталног материјала су припремљени адитивном технологијом као дискови једнаких димензија. Дијаметар је био 5.5 mm, а дебљина 3mm.

Узорци (n=36) су очишћени и дезинфиковани ултразвуком у алкохолном воденом раствору у трајању од 5min, потом су испрани у дестилованој води и поново третирани ултразвуком 5min у изо-пропил алкохолу (76).

Елуати (екстракти) су добијени инкубацијом узорка материјала у 4ml Дулбековог модификованог раствора (DMEM, Sigma) без серума, у затвореним епруветама на температури од  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  и у воденом купатилу (GFL, Немачка) (46, 77, 78). Дужина екстракционог периода износила је 3, 5, 7 и 21 дан. После сваког екстракционог периода, екстракти су уклоњени и епрувете су поново напуњене свежим раствором. Сви екстракти су исфилтрирани пре рада у циљу стерилизације.

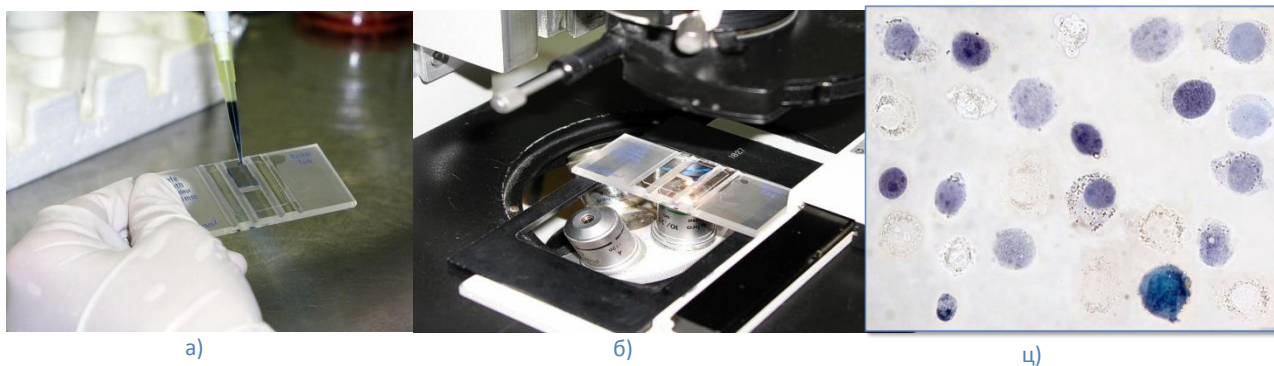
Цитотоксичност је одређивана 48 часова након инкубације ћелија и елуата од првог до 21 дана.

#### **3.3.3 Ћелијске линије**

Истраживање је спроведено на линији MRC-5 (хумани фибробласти, American Type Culture Collection CCL 171) и на линији L929 (мишији фибробласти, American Type Culture Collection CCL1) (77, 79, 80). Културе ћелија узгајане су у хранљивом ДМЕМ (Dulbecco's Modified Eagle's Minimal Essential Medium, PAA Laboratories GmbH) медијуму обогаћеним 10%-ним (V/V), топлотно инактивираним феталним говеђим серумом (Sigma) уз додатак 4.5% глукозе и

антибиотика: пеницилина (100 IU/ml), стрептомицина (100 mg/ml). Ћелије су расле у стерилним флаконима (25 cm<sup>2</sup>, Costar, Corning, NY, USA) на температури од 37°C у атмосфери засићеној воденом паром (100% влажности) и 5% CO<sub>2</sub> (46). Субкултивација ћелија рађена је двапут недељно, а одвајање ћелија од подлоге вршено је помоћу 0.1% трипсина у EDTA (Serva, Heidelberg, Немачка).

За потребе експеримента коришћене су ћелије у експоненцијалној фази раста- када су достигле 80-90% конфлуентности. Тест одбацивања боје ("Dye exclusion test", DET) са трипан плавим је коришћен како би се одредио број ћелија и проценат вијабилних ћелија (слика 1). Тест трипан плавим (у односу 1:5 - 50 µl суспензије ћелија + 200µl трипан плавог) се заснива на проласку различитих боја кроз оштећену ћелијску мембрану и бојењу цитоплазме невијабилних ћелија, док вијабилне ћелије остају необојене.



*Слика 1 – Тест вијабилности (DET) : а) додавање 100 µl боје 0,1 % трипан-плаво, б) бројање ћелија уз помоћ микроскопа (REICHERT) у четири квадрата у коморицама за бројање, ц) мртве ћелије- обојене плаво, живе ћелије- необојене.*

Ћелије су посматране под микроскопом у Нојербауеровој (Neubauer) коморици. На основу разлике у боји цитоплазме омогућена је квантификација вијабилних ћелија (81).

Број ћелија у 1ml суспензије израчунат је према следећој формули, узимајући у обзир димензије коморе и разблажење:

$$N = N_0 \times 10^4 \times 5$$

Где је:

$N$  = укупан број живих ћелија у 1ml суспензије;

$N_0$  = број живих ћелија избројан по квадрату коморе хемоцитометра;

5 = фактор разблажења;

$10^4$  = корекциони фактор (дубина коморе и запремина у ml).

Вијабилност ћелија је израчуната према следећој формули:

$$V(\%) = (N_0 / (N_0 + M_0)) \times 100$$

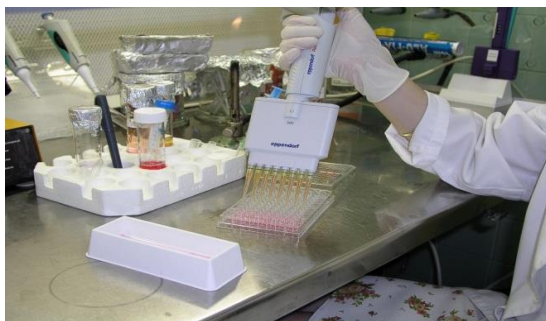
Где је:

$M_0$  = број мртвих ћелија избројан по квадрату коморе хемоцитометра.

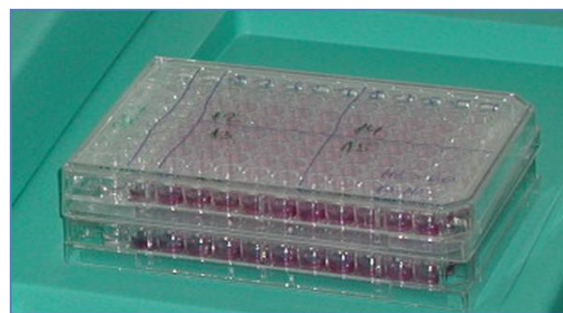
Вијабилност ћелија коришћених у експерименту је била већа од 90%.

### 3.3.4 Mosmann-ов колориметријски МТТ тест

У експерименту су коришћене само живе (вијабилне) ћелије. Ћелије су засејане у осмоплекату стерилне плоче за култивацију ћелија са 96 отвора, тако да је у 100 $\mu$ l било  $5 \times 10^3$  ћелија (како би се обезбедио оптимални раст ћелија) за сваки од екстракционих периода (слика 2а).



а)



б)

*Слика 2 – а) Сејање вијабилних ћелија у осмоплекату у микротитар плоче са 96 отвора, б) микротитар плоче са елуатима.*

Након инкубације на 37°C у трајању од 24 сата, супернатант је уклоњен и ћелијама је додато по 100  $\mu$ L елуата различитог екстракционог периода, након чега су ћелије инкубиране наредних 48 сати на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> (слика 2б).

Потом су елуати у коме су инкубиране ћелије аспирирани, а ћелијама је додато 5mg/ml МТТ реагенса (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијев бромид) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Немачка) (46, 32, 82, 83).

Ћелије и МТТ су инкубиране 3h на 37°C, а након тога су и медијум и МТТ уклоњени сукцијом, а ћелијама додато је 100 $\mu$ l 0.04 mol/l HCl у изопропанолу како би се растворили кристали формазана (46, 82). Контрола су биле ћелије без додатог елуата. Након неколико минута стајања на собној температури, измерена је апсорбанција на тест таласној дужини од 540nm и референтној таласној дужини од 690nm на спектрофотометријском читачу плочица (Multiskan Ascent (MTX Lab systems, Финска) (слика 3) (79, 84).



Слика 3 – Апсорбанција је очитавана одмах по истеку инкубације на читачу за микротитар плоче (Multiscan, MCC/340) на талсној дужини од 540nm и референтној од 690nm.

Измерена апсорбанција (интензитет плаве боје) директно је пропорционална броју живих ћелија. Отвори на плочи који су садржавали само медијум и МТТ, али не и ћелије, служили су као слепа проба (“бланк”).

Инхибиција раста је изражена формулом:

$$\%K = \frac{A_{test}}{A_{control}} \times 100$$

Где:

$A_{test}$  представља апсорбанцију ћелија инкубираних са елуатима материјала

$A_{control}$  представља апсорбанцију ћелија инкубираних са медијумом (DMEM).

#### 3.3.4.1 Преживљавање ћелија – МТТ тест

Ћелије су сакупљене у логаритамској фази раста, трипсинизирани, ресуспендоване и избројане у 0,1% трипан плавом. Вијабилне ћелије су посејане у



Петријеве шоље (50мм, Center well, Falcon) у којима су се налазиле испитиване супстанце/дискови, у концентрацији  $2 \times 10^5/\text{ml}$ . Контролни узорци не садрже испитиване супстанце. Петријеве шоље са засејаним ћелијама остављају се у термостат на  $37^\circ\text{C}$ , са 5%  $\text{CO}_2$  наредна 24 часа (h). По истеку инкубације врши се пресејавање ћелија са испитиваних супстанци у свеж медијум. Вијабилне ћелије су посејане ( $5 \times 10^3/100\mu\text{l}$ ) у квадрипликату у микротитар плоче са 96 отвора. Плоче са засејаним ћелијама остављају се у термостат на  $37^\circ\text{C}$ , са 5%  $\text{CO}_2$  наредна 24, 48, 72 часа (h).

Раствор МТТ, припремљен непосредно пре додавања, додат је у све отворе на плочи у запремини од  $10 \mu\text{l}$  /отвору и инкубација је настављена наредна 3h (у термостату на  $37^\circ\text{C}$ , са 5%  $\text{CO}_2$  ). По истеку 3h у сваки отвор је додато по  $100 \mu\text{l}$   $0.04\text{mol/l}$   $\text{HCl}$  у изопропанолу. Апсорбација је очитавана одмах по истеку инкубације на читачу за микротитар плоче (Multiscan, MCC/340) на таласној дужини од  $540\text{nm}$  и референтној од  $690\text{nm}$ . Отвори на плочи који су садржавали само медијум и МТТ, али не и ћелије, служили су као слепа проба (“бланк”).

Цитотоксичност је изражена процентом према формули:

$\text{CI} = (1 - A_s/A_k) \times 100$ , при чему је  $A_k$  апсорбација контролних узорака, а  $A_s$  апсорбација узорака са испитиваним диском.

Фракција преживелих ћелија изражава се као проценат од контролне вредности према формули:

$\%K = (A_s/A_k) \times 100$ , при чему је  $A_k$  број ћелија контролних узорака, а  $A_s$  број ћелија узорака са испитиваном супстанцом.

Експеримент је поновљен два пута. Контролу квалитета при извођењу теста представљали су следећи параметри:

- Вијабилност посађених ћелија је била већа од 90%, одређена тестом са трипан-плавим (DET);
- Ћелије су коришћене у логаритамској фази раста и у концентрацији која је обезбеђивала логаритамски раст ћелија током трајања теста (за адхерентне ћелије то је било  $5 \cdot 10^3/\text{отвору}$ );

- Коефицијент варијације (CV) у експерименталним и контролним културама био је мањи од 15%, а за већину експеримената кретао се испод 10%;
- Апсорбанција (A) контроле (ћелије у медијуму) била је најмање три пута већа од средње вредности A за слепу пробу (медијум).

Цитотоксичност/процент вијабилних ћелија се рачуна у односу на нетретиране ћелије (контролу) при чему се од измерених апсорбанција одузима апсорбанција слепе пробе (“бланк”) коју чини медијум без ћелија.

Резултати су презентовани као проценти вијабилних ћелија. Квантитативне промене у вијабилности ћелија представљене су описно:

- Вијабилност ћелија > 90% контроле- материјал је нецитотоксичан
- Вијабилност ћелија > 60-90% контроле- материјал је благо цитотоксичан
- Вијабилност ћелија > 30-59% контроле- материјал је умерено цитотоксичан
- Вијабилност ћелија < 30% контроле- материјал је озбиљно цитотоксичан (38).

### 3.3.5 Агар дифузиони тест

Тест агар дифузије изводи се према интернационалном стандарду ISO (78, 85).

Ћелије, L929 мишији фибробласти и MRC-5 хумани фибробласти (10ml; концентрација  $2.5 \times 10^5$  ћелија/ml), су засејане у стерилне Петријеве шоље (10mm) и узгајане до експоненцијалне фазе раста (инкубација на 37°C, уз 5% CO<sub>2</sub> и влажност 96% у трајању од 24h) (78). Затим је течни хранљиви медијум из сваке Петријеве шоље је уклоњен аспирацијом и замењен са 10ml свеже припремљене

мешавине агар хранљивог медијума. Директно на ћелије залепљене на дно Петријеве шоље додат је стерилни агар (Difco, Detroit, Michigan, USA) који је претходно помешан са двоструко концентрованим медијумом у односу 1:1 и загрејан на 100°C у воденом купатилу, а затим охлађен до 48°C. Формиран је танак слој агара на површини ћелија (78). Узорци испитиваног материјала су у виду дискова постављани на горњи слој агара у сваку перти шољу, и инкубирани у контролисаним условима (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) у трајању од 24h (слика 4). Након стврдњавања агар хранљивог медијума на собној температури (приближно 30 минута) ћелије су обојене са 10 ml неутралног црвеног и остављене у мраку 15 минута. Бојење ћелија постигнуто је додавањем неутрално црвеног (10ml, 0.01% раствор неутрално црвеног у фосфатном пуферу) који дифундује кроз агар и боји живе ћелије. Вишак раствора неутралног црвеног је аспириран (78).



*Слика 4 – Сејање вијабилних ћелија у Петријеве шоље (Center well, Falcon) на испитиване дискове.*

Ћелије су посматране под инвертним микроскопом. Посматране су зоне деколоризације коју су чиниле измењене ћелије са оштећеном ћелијском мембраном и зоне вијабилних живих ћелија које су биле обојене црвено (78). Зоне деколоризације су мерене лењиром. Сваки узорак је мерен у тетрапликату, а експеримент је поновљен двапут. Резултати су евалуирани на основу зонског и индекса лизе ћелија.

Критеријуми који су се користили за процену нивоа цитотоксичности били су: зонски индекс (односи се на ширину зоне обезбојавања невијабилних ћелија око материјала), индекс лизе (промена величине и облика ћелија, дегенерација мембране услед лизе ћелије) и индекс одговора (однос зонског индекса и индекса лизе) приказани су на табели 3 (78, 86).

Табела 3 –Опис зонског индекса индекса лизе у тесту агар дифузије.

Зонски или индекс лизе	Дијаметар зоне деколоризације	Лиза ћелија
0	Деколоризација није уочљива	Није приметна
1	Деколоризација се налази испод испитиване супстанце (15mm)	Мања од 20%
2	Деколоризација није већа од 20 mm (15-20 mm)	20-40%
3	Деколоризација није већа од 25 mm (20-25 mm)	40-60%
4	Деколоризација је већа од 25 mm (>25 mm)	60-80%
5	Цела култура је деколоризована	>80%

### 3.4 Тест иритације оралне мукозе

#### 3.4.1 Експерименталне животиње и експозиција испитиваним материјалима

Експеримент је рађен на сиријским златним хрчковима (*Mesocricetus auratus*). Хрчкови на којима је рађен овај експеримент били су стари 6 недеља и тежине између 80 и 120g (слика број 2). Током трајања експеримента животиње су биле смештене у виваријуму Пастеровог завода у Новом Саду у пластичним кавезима, са неограниченим приступом стандардној лабораторијској храни и води (17, 56). Иверица у кавезима је мењана два пута недељно, а кавези су дезинфиковани једном недељно (56). Хрчкови су означени и њихова тежина је мерена на почетку, затим сваког другог дана као и последњег дана истраживања (17).



Слика 5 - Сиријски златни хрчак - *Mesocricetus auratus*.

Према упутствима и ISO стандарду, сви узорци су фабрички направљени и обликовани у дискове пречника 5mm и дебљине 2mm.

Узорци од тефлона су представљали негативну контролу (17, 87). И експериментални и контролни дискови су били причвршћени на смотуљке направљене од газе, како би се лакше стављали и вадиле из букалне кесице (87).

Сви узорци су стављани у десну букалну кесицу уз помоћ стоматолошке пинцете (слика 6а и 6б), док је лева букална кесица служила као двострука негативна контрола (17). Палпацијом је проверавано да ли су узорци уметнути до дна (фундуса) букалне кесице. Направљене су и пластичне огрлице (22mm пречника и 2cm ширине рама) са циљем да спрече да хрчак избаци узорак из букалне кесице. Након постављања узорка, огрлице су стављане око врата тако да узорак лежи иза огрлице, уз неометану респирацију (слика 6ц и 6д). Испитивање је трајало 21 дан. Излагање животиње материјалу трајало је 12h сваког дана, након чега су узорци били уклоњени из уста (87).

Испитивање је спроведено на десет хрчака. Испитиване животиње су подељене у три групе:

- 1) прва контролна група- КхрТ- састојала се од 5 хрчака код којих је у десну букалну кесицу стављан диск од тефлона (стандардни контролни материјал),

- 2) друга контролна група- КхрП- састојала се од 5 букалних кесица без материјала/диска (двострука негативна контрола),
- 3) трећа група- Ехр- састојала се од 5 хрчака код којих је у десну букалну кесицу стављан експериментални материјал.



а)



б)



ц)



д)

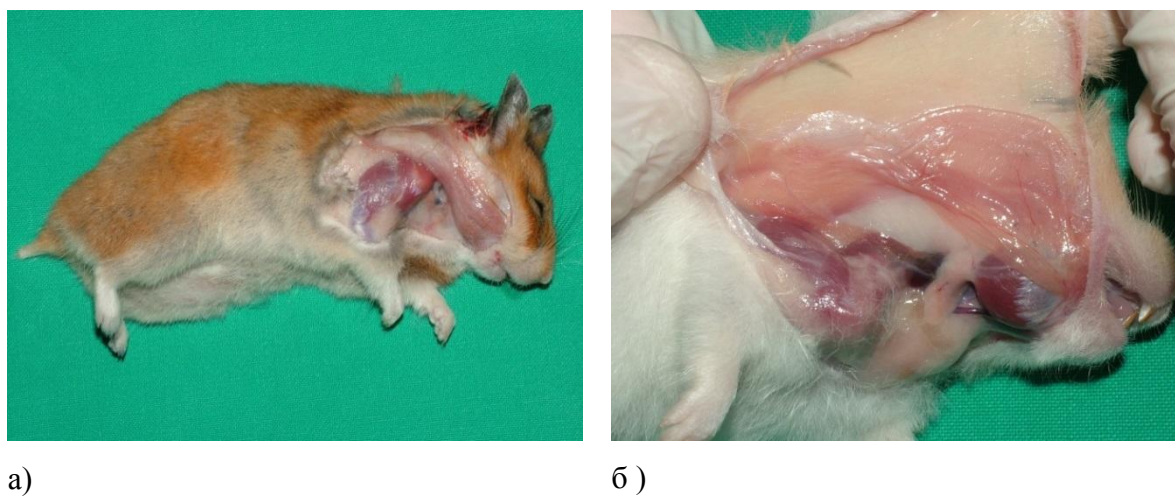
*Слика б- Уметање узорка у десну букалну кесицу (а и б); постављање пластичне огрлице око врата хрчка (ц и д).*

Свим животињама, без обзира на испитивану групу, букалне кесице су испиране физиолошким раствором и макроскопски прегледане према одговарајућој скали сваки пут након вађења узорака (табела 4) (87).

Табела 4 – Класификација и бодовање реакција посматраних макроскопски (упоређене су промене на слузницама контралатералних страна).

Реакција слузокоже (формирање еритема):	Цена
Без еритема	0
Веома благ еритем (једва видљив)	1
Јасно уочљив еритем	2
мерен еритем	3
Јак еритем (цвекла црвено) до формирања ешара	4
*Остале нежељене промене ткива такође су наведене	

Након 24 часа од последње експозиције материјалу, сви хрчкови су жртвовани анестетиком (кетамин 200mg/kg) (56).

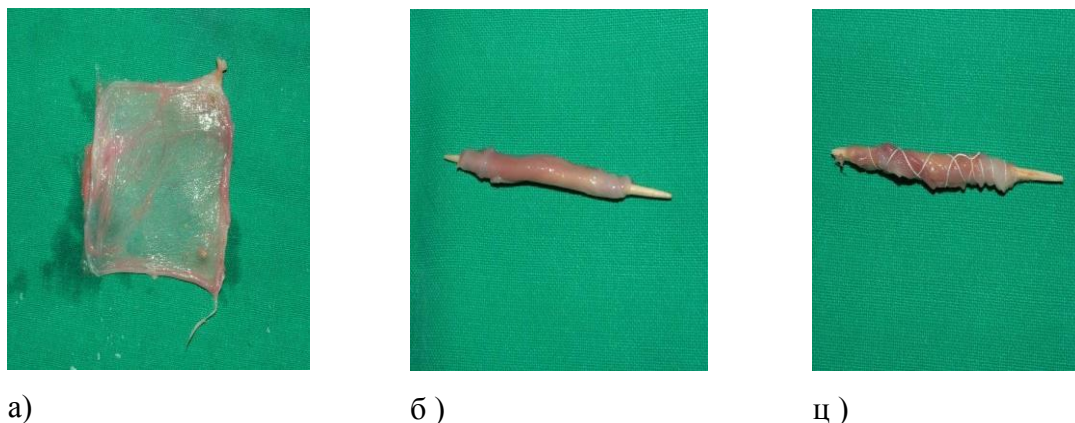


Слика 7- Приступ и ексцизија букалне кесице (а и б).

### 3.4.2 Хистолошка обрада слузокоже

Након жртвовања хрчака, слузница букалне кесице је пажљиво ексцидирана, а затим раширена до правоугаоног облика (слика 8а) како би се макроскопски прегледала (56, 88). Како би се хистолошке структуре што потпуније приказале и прегледале урађена је „SwissRoll“ (енгл. прим. аут.) техника обраде слузокоже (88, 89).

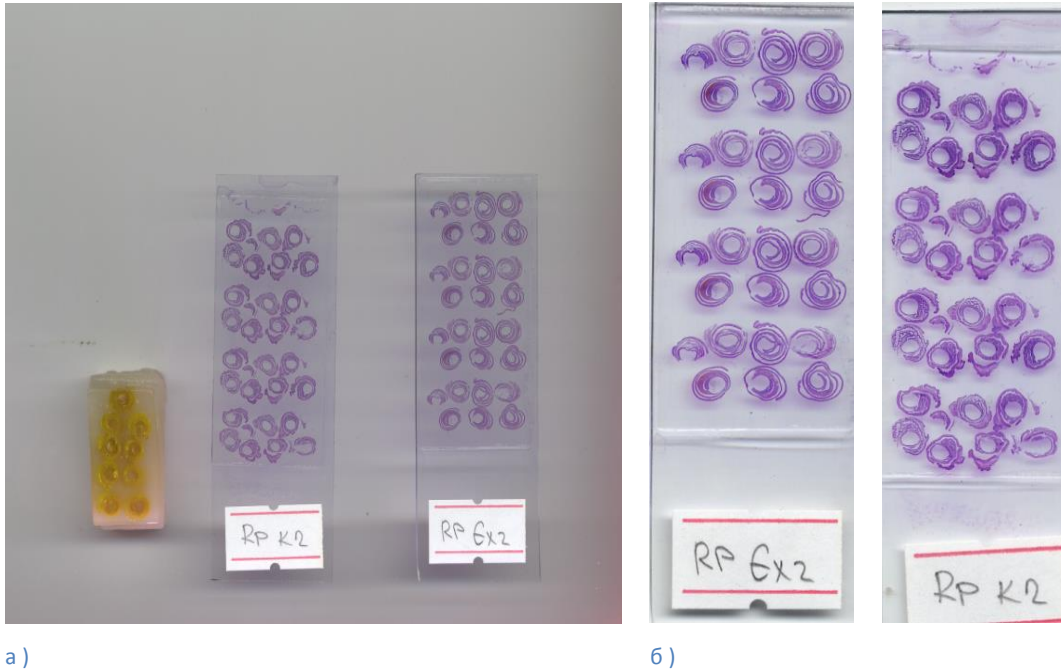
Након последњег макрокопског прегледа, кесице су уролане око чачкалица за зубе, почев од дуже стране правоугаоника (слика 8б) (88). Додатно су стабилизоване свиленим концем како би се физички спречило одмотавање узорака (слика 8ц).



*Слика 8- Исечак слузнице исправљен до ректангуларне форме (а), а затим обмотан око чачкалице (б) и учвршћен свиленим концем (ц).*

На овај начин припремљене кесице су фиксиране у свеже припремљеном Бујономом раствору (56, 90). 24h касније, чачкалице су уклоњене, а фиксирано ткиво исечено на комадиће дебљине 5mm (добијено је просечно 6 комадића фиксираниог ткива) (88), које су потом дехидриране и све заједно укалупљене у један заједнички парафински калуп. Парафински калупи су потом сечени на ротационом микротому (Leica) на дебљини од 5 $\mu$ m, а потом бојени стандардном хематоксилин-еозин процедуром. (слика 9) (56, 88, 89).





*Слика 9- Парафински калуп и препарати слузнице обојени методом Н&Е (а) и препарати слузнице у крупнијем плану (б).*

Узета су три пресека на различитим дубинама у циљу узимања што веће површине слузнице у обзир и тако избегавања лажно позитивних и лажно негативних резултата. Узорци су посматрани под светлосним микроскопом (Leica DMLB) и фотографисани (слика 10).



*Слика 10 - Пресек обмотане слузнице посматран под микроскопом.*

У презентованој студији биокомпатибилност предложеног експерименталног материјала за примену у стоматологији и узорака од тефлона је оцењена у односу на присуство инфламаторних ћелија, фибробластне реакције, односно на основу озбиљности инфламаторног одговора током времена (87).

На овако припремљеном материјалу урађена је хистолошка и семиквантитативна анализа хистолошких параметара који су показатељи ткивног одговора и инфламације, као што су:

- семиквантитативна процена оштећења епитела
- семиквантитативна процена густине лимфоцита
- семиквантитативна процена присуства васкуларне конгестије
- семиквантитативна процена присуства едема.

Сви набројани параметри су семиквантитативном хистолошком методом оцењени од 0-3 и бодовани на начин приказан у табели 5 (88).

*Табела 5 — Систем за оцењивање ткивне реакције оралне мукозе.*

Реакција ткива	Оцена
Епител	
Нормалан, интактан	0
Ћелијска дегенерација	1
Метаплазија	2
Ерозија	3
Леукоцитна инфилтрација	
Одсутна	0
Блага (од 0 до 50)	1
Умерена (од 51 до 100)	2
Изражена (више од 100)	3
Васкуларна конгестија	
Одсутна	0
Блага	1
Умерена	2
Изражена	3
Едем	
Одсутан	0
Благ	1
Умерен	2
Изражен	3

### 3.5 Тест субкутане имплантације

Тест субкутане имплантације вршен је на 30 пацова (n=30) соја *Wistar albino*, који су тежили 200-300g (91-94).

Животиње су за време трајања експеримента биле смештене у виваријуму Завода за Фармакологију на Медицинском факултету у Новом Саду у строго контролисаним условима (24С°, 12h/12h адекватним дневно-ноћним ритмом, уз неограничен приступ стандардној лабораторијској храни и води) (91, 94, 95).

У сваку животињу имплантирано је по два дискоидна узорка (10mm/2 mm) - испитивани материјал и тефлон (контрола). Према дужини апликације материјала, животиње су подељене у три групе:

1. животиње са материјалом имплантираним 10 дана,
2. животиње са материјалом имплантираним 30 дана,
3. животиње са материјалом имплантираним 90 дана.

Сходно томе и испитиване групе су подељене у три контролне групе: Кп10, Кп30 и Кп90 и три експерименталне групе: Еп10, Еп30 и Еп90.

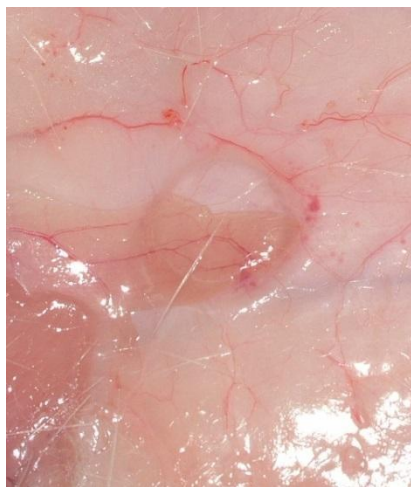
#### 3.5.1 Експериментални протокол

Животиње су анестезиране интраперитонеалном администрацијом кетамина НС1 (50mg/kg), а затим је извршена трихотомија и дезинфекција дорзума 5% раствором јодоформа (91, 92, 94, 96, 97) (слика 11). Тупом дисекцијом направљена су два одвојена субкутана цепа дубине 20mm, ширине 10mm у које су имплантирани узорци материјала (91, 92, 96, 97). Након имплантације узорака, инцизије су затваране сатурама уз помоћ хируршког конца (91, 94, 96).



*Слика 11– Анестезиран пацов припремљен за имплантацију.*

Групе од по 10 пацова су хумано жртвоване у следећим временским интервалима: након 10 дана, 30 дана и 90 дана. Животиње су жртвоване анестетиком (91, 92). Имплантирани материјал свих испитиваних група је ексцидиран заједно са околним ткивом и потопљен у 10% раствор формалина (слика 12) (91, 92, 94, 96, 97).



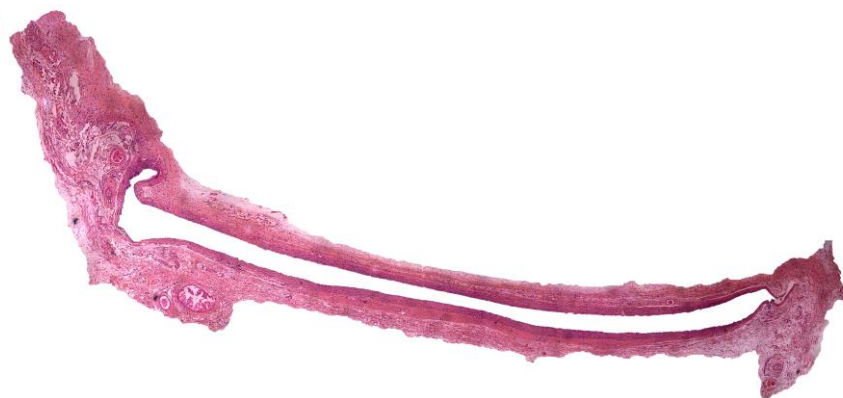
*а)*



*б)*

*Слика 12– Имплантирани материјали а) експериментани материјал- Accura® ClearVue™ и б) контролни материјал- тефлон.*

Након фиксирања ткива у формалину у трајању од 48h, уследила је дехидратација у три купатила изопропил алкохола, након које су узорци ткива укалупљени методом течног парафина (91, 92, 96, 97). Парафински калупи су сечени на микротому (Leica) на резове дебљине 5µm. Након лепљења на микроскопске стаклене плочице, резови су бојени стандардном хематоксилин-еозин процедуром (92, 97).



*Слика 13– Исечак субкутаног ткива где се налазио имплантирани диск.*

На овако припремљеним препаратима извршена је хистолошка микроскопска анализа и оцењиване су ткивне реакције на имплантирани материјал (96, 97). Семиквантитативно су праћени и оцењени хистолошки параметри који су показатељи ткивног одговора и инфламације (Табела 5а ) . Сви набројани параметри су семиквантитативном хистолошком методом оцењени од 0-4 (табела б) и бодовани на начин приказан у табели 7 (87).

Табела 6- Семиквантитативна процена густине инфламаторног инфилтрата.

Тип ћелијског одговора	Оцена				
	0	1	2	3	4
Полиморфонуклеари	0	Ретки (од 1 до 5)	Од 5 до 10	Изражен инфилтрат	Густ инфилтрат
Лимфоцити	0	Ретки (од 1 до 5)	Од 5 до 10	Изражен инфилтрат	Густ инфилтрат
Плазма ћелије	0	Ретки (од 1 до 5)	Од 5 до 10	Изражен инфилтрат	Густ инфилтрат
Макрфаги	0	Ретки (од 1 до 5)	Од 5 до 10	Изражен инфилтрат	Густ инфилтрат
Џиновске ћелије	0	Ретке (од 1 до 2)	Од 3 до 5	Изражен инфилтрат	Плаже ћелија
Некроза	0	Минимална	Блага	Умерена	Изражена
Неоваскуларизација	0	Минимална капиларна пролиферација, 1-3 пупољка фокално	Групе од 4-7 капилара са потпорним фибробластним структурама	Широка мрежа капилара са потпорним структурама	Екстензивна мрежа капилара са потпорним фибробластним структурама
Капсула	0	Узана	Умерено дебела	Дебела	Екстензивна

Табела 7- Параметри (показатељи ткивног одговора) посматрани након имплантације материјала у субкутано ткиво пацова.

	Експериментална група			Контролна група		
	10 дана	30 дана	90 дана	10 дана	30 дана	90 дана
Број животиња						
Неутрофилни гранулоцити						
Лимфоцити						
Плазма ћелије						
Макрофаги						
Џиновске ћелије						
Неоваскуларизација						
Капсула						
неоваскуларизација						
Страни дебрис						
Маст ћелије						
Еозинофили						
Пигмент						
Хијалинизација						
Средња вредност	Експериментални			Контрола		
Ткива која нису прегледана						

Тумачење резултата: у условима овог истраживања, материјал се сматра:

- неиритирајућим (0,0 до 2,9)
- лако иритирајућим (3,0 до 8,9)
- умерено иритирајућим (9,0 до 15,0)
- јако иритирајућим (• 15)

према ткиву у поређењу са негативном контролом.

Претходно описани критеријуми, коришћени у овом истраживању ради оцене степена биокомпатибилности у складу су са ISO стандардом.

## **3.6 Анализа података**

### **3.6.1 In vitro испитивање цитотоксичности**

Добијени резултати су статистички обрађени помоћу програма SPSS. Резултати добијени мерењем вијабилности ( $n=36$ ) МТТ тестом и тестом агар дифузије изражени су као средње вредности ( $M$ ) са стандардном девијацијом ( $SD$ ) и стандардном грешком ( $SE$ ). Средња вредност, стандардна девијација и коефицијент варијације ( $CV$ ) израчунати су за репликате (најмање трипликат) узорака у сваком експерименту. Сваки експеримент је урађен два пута. Цитотоксичност је изражена процентом. Поређење одговора две културе у различитим периодима екстракције вршено је помоћу  $t$  теста уз ниво значајности  $p=0.05$ .

### **3.6.2 Тест иритације оралне мукозе**

Како би се утврдила разлика у реакцији оралне мукозе на тефлон и експериментални материјал, по свим посматраним параметрима, коришћен је Фишеров тест.

### **3.6.3 Тест субкутане имплантације**

Средње вредности, стандардне девијације и стандардне грешке посматраних параметара контролне и експерименталне групе израчунате су помоћу SPSS програма. Статистичка анализа добијених вредности тестом субкутане имплантације је изведена уз помоћ  $t$  теста за поређење у групама- интрагрупно (П10, П30 и П90), и интергрупно поређење (поређење контроле и експерименталне групе- Еп10, Еп30, Еп90 и Кп10, Кп30, Еп90). Резултати су проверени и ANOVA анализом и Post Hoc тестом. Међусобна повезаност показатеља инфламације проверена је Пирсоновим коефицијентом корелације.



## 4. Резултати

### 4.1 Резултати мерења површинске храпавости узорака

На табели 8 приказани су резултати мерења површинске храпавости узорака. Уочава се да су узорци од тefлона били знатно храпавији у односу на узорке од експерименталног материјала.

*Табела 8 – Приказ добијених вредности мерења површинске храпавости узорака.*

Период Имплантирање	10 дана		30 дана		90 дана	
	Еп10	Кп10	Еп30	Кп30	Еп90	Кп90
1.	1.100	2.523	0.660	2.285	1.257	1.612
2.	0.625	2.764	0.494	2.006	0.715	4.149
3.	0.948	3.044	1.084	1.763	0.771	2.989
4.	0.537	3.286	0.872	2.201	0.670	2.814
5.	2.121	1.911	1.142	1.598	2.268	1.938
6.	0.722	1.993	1.096	4.190	0.681	1.860
7.	0.640	1.653	1.671	2.480	0.403	2.126
8.		0.814	0.820		1.055	1.192
9.					1.199	1.420
Средња вредност	0.904	2.248	0.979	2.360	1.002	2.229

### 4.2 In vitro испитивање цитотоксичности

Четири елуата испитиваног материјала, различитих концентрација, су испољили дозно зависно цитотоксично дејство према ћелијским културама MRC-5 и L929 фибробласта. Процент вијабилности ћелија одређен је МТТ и агар дифузионим тестом.

#### 4.2.1 Резултати МТТ теста

Након инкубације L929 ћелија са екстрактима експерименталног материјала у DMEM-у уочено је да цитотоксични ефекат зависи од периода екстракције и да

има тренд пораста са дужином екстракције. Највећу цитотоксичност испољио је елуат из 21. дана, а најмању из првог. Ћелије у контакту са елуатом из првог екстракционог периода нису показале цитотоксично дејство материјала, за разлику од ћелија које су биле у контакту са елуатима из петог, седмог и 21-ог екстракционог периода које су показале благу цитотоксичност материјала (табела 9).

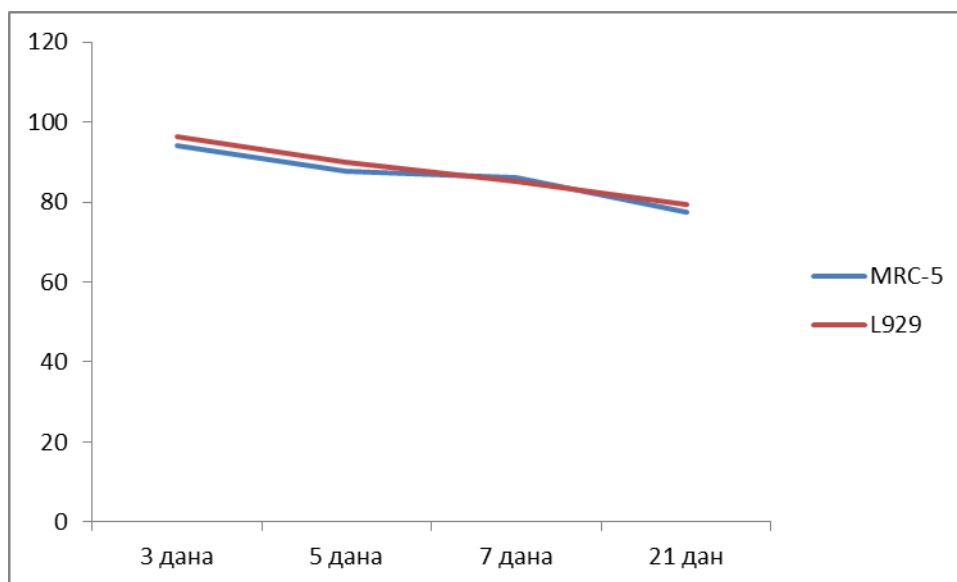
MRC-5 хумани фибробласти у контакту са елуатима испитиваног материјала показују сличну вијабилност у односу на L929 ћелије (нецитотоксичан и благо цитотоксичан ефекат).

*Табела 9- Резултати испитивања цитотоксичности материјала МТТ тестом у обе културе.*

<b>L929</b>	<b>K</b>	<b>3 dana</b>	<b>5 dana</b>	<b>7 dana</b>	<b>21 dan</b>	<b>MRC-5</b>	<b>K</b>	<b>3 dana</b>	<b>5 dana</b>	<b>7 dana</b>	<b>21 dan</b>
	1.008	0.855	0.689	0.824	0.742		0.539	0.525	0.475	0.572	0.442
	0.962	0.915	0.457	0.769	0.781		0.575	0.555	0.496	0.611	0.436
	0.951	0.824	0.650	0.725	0.743		0.458	0.522	0.407	0.588	0.458
	0.985	0.822	0.695	0.773	0.784		0.457	0.519	0.499	0.602	0.441
	0.968	0.971	0.839	0.745	0.738		0.599	0.477	0.409	0.540	0.412
	0.860	0.895	0.760	0.798	0.764		0.616	0.566	0.411	0.464	0.410
	0.943	0.856	0.920	0.812	0.719		0.543	0.556	0.548	0.419	0.423
	0.963	0.872	0.840	0.821	0.743		0.461	0.489	0.576	0.490	0.422
<b>Blank: 0.012</b>						<b>Blank: 0.034</b>					
<b>Average</b>	0.934	0.899	0.840	0.794	0.741		0.555	0.522	0.486	0.478	0.431
<b>Sd</b>	0.050	0.051	0.065	0.034	0.018		0.070	0.045	0.089	0.051	0.007
<b>Cv</b>	5.375	5.667	7.779	4.283	2.490		12.591	8.713	18.210	10.569	1.557
<b>% Ci</b>	0.000	3.749	10.043	14.944	20.624		0.000	5.904	12.393	13.790	22.397
<b>%K</b>		96.251	89.957	85.056	79.376			94.096	87.607	86.210	77.603

Статистичком анализом показане су значајне разлике у цитотоксичности између култура L929 и MRC-5 у свим временским интервалима ( $p < 0.05$ ). Интрагрупним поређењем су такође показане статистички значајне разлике у проценту преживелих ћелија између појединих периода екстракције у обе ћелијске културе ( $p < 0.05$ ).

Поређењем одговора две различите ћелијске културе може се закључити да је вијабилност L929 мишијих фибробласта била незнатно већа у односу на вијабилност MRC-5 хуманих фибробласта, за све екстракционе периоде осим за елуат из седмог дана екстракције, када је незнатно већа била вијабилност хуманих фибробласта (графикон 1).



Графикон 1- Вијабилност ћелија (%) у обе културе (MTT тест).

#### 4.2.2 Резултати агар дифузионог теста

Резултати испитивања цитотоксичности тестом агар дифузије показују да је материјал Accura® ClearVue™ нецитотоксичан. Није примећена деколоризација око постављених узорака ни у једној култури ћелија (табела 10).

Табела 10- Резултати испитивања цитотоксичности материјала Агар дифузионим тестом у обе културе.

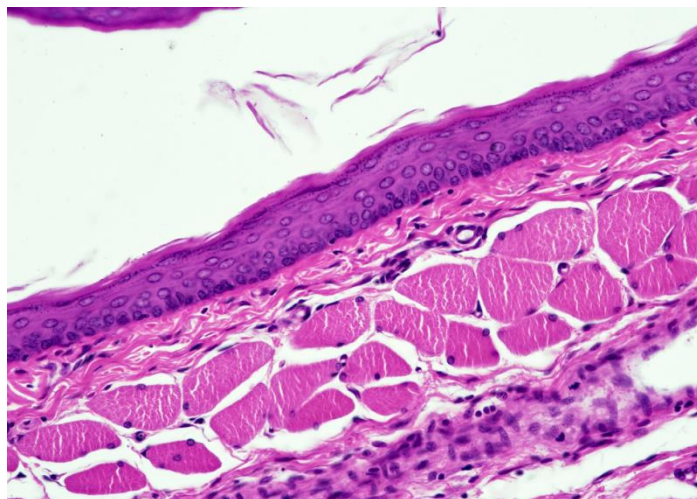
Тест агар дифузије	L929		MRC-5	
	Accura® ClearVue™	Контрола	Accura® ClearVue™	Контрола
Зонски индекс	0	0	0	0
Индекс лизе	0	0	0	0
Индекс одговора	0	0	0	0

#### 4.3 Степен иритације оралне мукозе хрчака

Све животиње су добро поднеле екперименталну процедуру и нису показале губитак на тежини током трајања експеримента. Статистичке анализе базиране су на узорку од пет хрчака.

Процент задржавања узорка у букалној кесици био је 92% за тефлон и 90.5% за експериментални материјал.

Макроскопским прегледом током експеримента нису примећене патолошке промене. Посматрано микроскопски, епител је у свим прегледима био интактан (слика 14).



Слика 14- Интактан епител мукозе букалне кесице хрчка.

Микроскопским прегледом препарата слузокоже букалних кесица примећене су углавном фокалне накупине малог броја лимфоцита у ламини проприји, око крвних судова. Микроскопски је утврђена разлика у ткивној реакцији букалне мукозе на присуство тefлона и експерименталног материјала. У препаратима слузнице која је била у контакту са експерименталним материјалом, биле су видљиве мале накупине лимфоцита фокално око крвних судова. У препаратима слузнице која је била у контакту са тefлоном- видљив је био благ едем. Резултати указују да постоји значајна разлика у едему између хрчака којима је букална слузокожа била у контакту са експерименталним материјалом (Ехр) и оних којима је била у контакту са тefлоном (КхрТ) ( $p=0,01$ ). Сви хрчкови групе Ехр немају едем и сви хрчкови групе КхрТ имају едем (табела 11).

Резултати указују да постоји значајна разлика у леукоцитној инфилтрацији између група Ехр и КхрТ ( $p=0,01$ ). Сви хрчкови Ехр групе имају минималну (>25 леукоцитну инфилтрацију) и сви хрчкови КхрТ групе немају леукоцитну инфилтрацију.

Резултати указују да постоји статистички значајна разлика у леукоцитној инфилтрацији између хрчкова Ехр групе и КхрП групе ( $p=0,03$ ). Сви хрчкови Ехр групе имају минималну леукоцитну инфилтрацију и сви хрчкови КхрП немају леукоцитну инфилтрацију. Резултати указују да постоји значајна разлика у ткивном одговору између хрчака КхрТ групе (букалне кесице са контролним

материјалом- тефлоном) и хрчака КхрП групе ( $p=0,01$ ). Сви хрчкови без материјала (КхрП) нису имали ниједан показатељ инфламације, док су у групи хрчака са тефлоном (КхрТ) сви испитивани узорци имали едем у везивном ткиву.

*Табела 11- Резултати микроскопског прегледа оралне мукозе хрчака.*

Тест иритације оралне мукозе	Букална кесица са узорком од Accura® ClearVue™ материјала- Ехр	Букална кесица без узорка- КхрП	Букална кесица са узорком од тефлона- КхрТ
<b>Епител</b>			
Нормалан, интактан	5	5	5
Ћелијска дегенерација			
Метаплазија			
Ерозија			
<b>Леукоцитна инфилтрација</b>			
Одсутна		5	5
Блага (0-50)	5		
Умерена (51-100)			
Изражена (>100)			
<b>Васкуларна конгестија</b>			
Одсутна	5	5	5
Блага			
Умерена			
Изражена, са дисрупцијом крвних судова			
<b>Едем</b>			
Одсутан	5	5	
Благ			5
Умерен			
Изражен			

#### **4.4 Степен биокомпатибилности материјала Accura ClearVue**

Од 30 експерименталних животиња на којима је вршено истраживање, две животиње нису преживеле први имплантациони период. Преостале животиње су процедуру поднеле добро, без губитка телесне тежине и промене у понашању. У групама Еп10, Кп10, и Кр30 било је седам узорака ткива. У групама Еп30, Еп90 и Кп90 било је по осам узорака. До губљења узорака дошло је услед њиховог померања у поткожном ткиву.

##### **4.4.1 Показатељи инфламације појединачно по испитиваним (експерименталним) групама**

У имплантационом периоду од десет дана, присутно је накупљање лимфоцита, макрофага и циновских ћелија. Неутрофилни гранулоцити, као ни плазма ћелије, нису били примећени ни у једном временском интервалу. Одсуство неутрофилних гранулоцита показује да нема ткивне реакције- нема некрозе нити акутног оштећења ткива. Лимфоцити су били присутни и у Кп10 и у Еп10 у истом броју, као и циновске ћелије. Макрофаги су били присутни у већем броју у Кп10. Капсула је била незнатно дебља око узорака од експерименталног материјала (Еп10). Неоваскуларизација је била подједанко изражена у обе групе. Еозинофила и мастоцита је било више у Еп10 него у Кп10 (табела 12).

Разлике између експерименталне (Еп10) и контролне групе (Кп10) након десет дана од имплантације, по параметрима инфламације (t тест) приказане су на табели 12. Експериментална група- Еп10 ( $M=1$ ,  $SD=0,57735$ ) имала је значајно већи број мастоцита у односу на контролну групу- Кп10 ( $M=0,2857$ ,  $SD=0,48795$ ), ( $p=0,02$ ).

Табела 12- Разлика између експерименталне и контролне групе по посматраним показатељима инфламације 10 дана.

Посматрани параметри инфламације	F	P	t	Df	p	Разлика аритметичких средина	Стандардна грешка разлике
Лимфоцити	,000	1,000	,000	12	1,000	,00000	,26082
Макрофаги	,372	,553	1,000	12	,337	-,28571	,28571
Џиновске ћелије	1,560	,236	,000	12	1,000	,00000	,29738
Капсула	,139	,716	1,260	12	,232	,42857	,34007
Неоваскуларизација	8,000	,015	,000	12	1,000	,00000	,30861
Еозинофили	,941	,351	1,044	12	,317	,28571	,27355
Страни дебрис	5,333	,040	1,155	12	,271	,28571	,24744
Пигмент	5,760	,034	1,000	12	,337	-,14286	,14286
Хијалинизација	5,760	,034	1,000	12	,337	-,14286	,14286
Мастоцити	,372	,553	2,500	12	,028	,71429	,28571

У имплантационом периоду од тридесет дана, број лимфоцита у Еп30 био је мањи у односу на Кп30, као и број макрофага, џиновских ћелија и еозинофила. Узорци око експерименталног материјала (Еп30), показали су већу дебљину капсуле, као и већи број мастоцита. Број еозинофила је био приближан у обе групе. Капсула је око узорака са тефлоном (Кп30) била танка (50-100  $\mu\text{m}$ ), док је код узорака са експерименталним материјалом (Еп30) и даље била умерене дебљине (табела 13).

Резултати указују да постоји статистички значајна разлика између Еп30 и Кп30 у следећим параметрима: броју макрофага ( $p=0,04$ ) и броју мастоцита ( $p=0,03$ ). Еп30 је имала заступљеније маст ћелије ( $M=1,2500$ ) у односу на Кп30 ( $M=0,1429$ ). Макрофаги су били присутнији у групи Кп30 него у Еп30 (табела 13).



Табела 13- Разлика између експерименталне и контролне групе по посматраним показатељима инфламације 30 дана.

Посматрани параметри инфламације	F	p	T	Df	P	Разлика аритметичких средина	Стандардна грешка разлике
Лимфоцити	,412	,532	2,026	13	,064	-,60714	,29963
Макрофаги	1,052	,324	2,212	13	,045	-,62500	,28256
Џиновске ћелије	,469	,505	1,300	13	,216	-,33929	,26090
Капсула	1,000	,000	1,908	13	,079	,37500	,19655
Неоваскуларизација	,144	,710	-,258	13	,800	-,07143	,27664
Еозинофили	,084	,777	-,145	13	,887	-,03571	,24564
Страни дебрис	,036	,853	-,095	13	,926	-,01786	,18892
Хијалинизација	4,719	,049	,931	13	,369	,12500	,13427
Мастоцити	3,482	,085	3,695	13	,003	1,10714	,29963

У имплантационом периоду од 90 дана, ткиво око узорака од контролног материјала (Кп90) показало је присутан већи број лимфоцита, макрофага и џиновских ћелија, као и присуство заостатака страног материјала у односу на ткиво око узорака од експерименталног материјала (Еп90). У ткиву око експерименталног материјала (Еп90) бројнији су били еозинофилни гранулоцити и мастоцити и незнатно израженија је била неоваскуларизација као и дебљина капсуле (табела 14).

Резултати указују да постоји статистички значајна разлика између Еп90 и Кп90 у броју мастоцита. У узорцима ткива групе Еп90 мастоцити су били статистички значајно присутнији у групи Еп90 него у групи Кп90 ( $p=0,032$ ) (табела 14). Међу осталим параметрима није било статистички значајне разлике.

Табела 14- Разлика између експерименталне и контролне групе по посматраним показатељима инфламације 90 дана.

Посматрани параметри инфламације	F	P	t	Df	P	Разлика аритметичких Средина	Стандардна грешка Разлике
Лимфоцити	,000	1,000	,000	14	1,000	,00000	,23146
Макрофаги	1,000	,334	-1,528	14	,149	-,37500	,24550
Циновске ћелије	2,333	,149	-1,000	14	,334	-,25000	,25000
Капсула	,000	1,000	,000	14	1,000	,00000	,17678
неоваскуларизација	,467	,506	-,475	14	,642	-,12500	,26305
Еозинофили	9,000	,010	1,655	14	,120	,37500	,22658
Страни дебрис	21,000	,000	-1,528	14	,149	-,25000	,16366
Пигмент	5,444	,035	1,000	14	,334	,12500	,12500
Мастоцити	1,657	,219	2,376	14	,032	,62500	,26305

Спорадично, око ткива око имплантираних узорака била је присутна и хијалинизација капсуле, као и страни дебрис и појединачни пигментофаг.

На табели 15 приказане су средње вредности (M), стандардне грешке (SE) и стандардне девијације (SD) за посматране показатеље инфламације у контролним и експерименталним групама у три временска интервала.

Табела 15- Приказ средњих вредности, стандардне грешке и стандардне девијације за појединачне показатеље инфламације у сва три имплантациона периода.

Посматрани параметри инфламације	Средње вредности параметара за 10 дана					
	Еп			Кп		
	М	SE	SD	М	SE	SD
Лимфоцити	,7143	,18443	,48795	,7143,	,26082	,69007
Макрофаги	,7143	,18443	,48795	1,0000	,21822	,57735
Циновске ћелије	,8571	,14286	,37796	,8571	,18443	,48795
Неоваскуларизација	1,0000	,00000	,00000	1,0000	,20203	,53452
Капсула	1,7143	,18443	,48795	1,2857	,00000	,00000
Страни дебрис	,4286	,20203	,53452	,1429	,14286	,37796
Маст ћелије	1,0000	,21822	,57735	,2857	,14286	,37796
Еозинофили	,5714	,20203	,53452	,2857	,18443	,48795
Пигмент	,0000	,00000	,00000	,1429	,00000	,00000
Хијалинизација	,0000	,00000	,00000	,1429	,00000	,00000
Посматрани параметри инфламације	Средње вредности параметара за 30 дана					
	Еп			Кп		
	М	SE	SD	М	SE	SD
Лимфоцити	,2500	,16366	,46291	,8571	,26082	,69007
Макрофаги	,3750	,18298	,51755	1,0000	,21822	,57735
Циновске ћелије	,3750	,18298	,51755	,7143	,18443	,48795
Неоваскуларизација	,5000	,18898	,53452	,5714	,20203	,53452
Капсула	1,3750	,18298	,51755	1,0000	,00000	,00000
Страни дебрис	,1250	,12500	,35355	,1429	,14286	,37796
Маст ћелије	1,2500	,25000	,70711	,1429	,14286	,37796
Еозинофили	,2500	,16366	,46291	,2857	,18443	,48795
Пигмент	,0000	,00000	,00000	,0000	,00000	,00000
Хијалинизација	,1250	,12500	,35355	,0000	,00000	,00000
Посматрани параметри инфламације	Средње вредности параметара за 90 дана					
	Еп			Кп		
	М	SE	SD	М	SE	SD
Лимфоцити	,6667	,07785	,52223	,7500	,16366	,46291
Макрофаги	,6889	,08301	,55687	,7500	,16366	,46291
Циновске ћелије	,6667	,07785	,52223	,7500	,16366	,46291
Неоваскуларизација	,6889	,08301	,55687	,6250	,18298	,51755
Капсула	1,2667	,07385	,49543	1,1250	,12500	,35355
Страни дебрис	,1778	,05764	,38665	,2500	,16366	,46291
Маст ћелије	,6889	,09961	,66818	,3750	,18298	,51755
Еозинофили	,3333	,07107	,47673	,1250	,12500	,35355
Пигмент	,0444	,03107	,20841	,0000	,00000	,00000
Хијалинизација	,0444	,03107	,20841	,0000	,00000	,00000

#### 4.4.2 Показатељи инфламације између испитиваних група

На табели 16 приказано је поређење група Еп10, Еп30 и Еп90 по појединачним параметрима инфламације (t тест).

Статистичка анализа је показала да постоје значајне разлике и међу групама Еп10 и Еп30 у изражености неоваскуларизације (мање је изражена у групи Еп30;  $p=0,02$ ), затим између Еп10 и Еп90 у дебљини капсуле (капсула је тања у групи Еп90;  $p=0,01$ ) и изражености неоваскуларизације (мање је изражена у Еп90;  $p=0,02$ ). Значајна разлика постоји и између група Еп30 и Еп90 у броју лимфоцита (већи број је присутан у групи Еп90;  $p=0,04$ ).

Статистичка ANOVA анализа и Post Hoc тест указују на статистичку значајност разлика међу овим групама.

ANOVA анализом утврђено је постојање значајне разлике у броју мастоцита међу групама Кп10 и Еп30 ( $p=0,01$ ), Еп30 и Кп30 ( $p=0,04$ ), Еп30 и Кп90 ( $p=0,03$ ), и Кп30 и Еп90 ( $p=0,05$ ).

Табела 17 приказује поређење група Кп10, Кп30 и Кп90 по појединачним параметрима инфламације (t тест). Статистичком анализом није утврђено да постоје значајне разлике међу посматраним групама.

Табела 16 - Разлика у посматраним параметрима инфламације у биопсијама група Еп10, Еп30 и Еп90.

Посматрани параметри инфламације		Лимфоцити	Макрофаги	Циновске ћелије	Капсула	Неоваскуларизација	Еозинофили	Страни дебрис	Пигмент	Хијалиниза ција	Мастоцити
Еп10	t	1,890	1,300	2,032	1,300	2,436	1,249	1,314	/	-0,931	-0,743
Еп30	p	0,81	0,216	0,063	0,216	0,029	0,234	0,211	/	0,369	0,471
Еп10	t	-1,45	1,300	-1,472	2,705	2,463	0,258	2,280	-,931	/	0,000
Еп90	p	0,81	0,216	0,165	0,018	0,029	0,800	0,040	,369	/	1,000
Еп30	t	2,160	0,000	-0,475	1,128	0,000	-1,000	1,000	-1,000	1,000	0,798
Еп90	p	0,049	1,000	0,642	0,278	1,000	0,334	0,334	0,334	0,334	0,438

Табела 17 – Разлике у посматраним параметрима инфламације у биопсијама група Кп10, Кп30 и Кп90.

Посматрани параметри инфламације		Лимфоцити	Макрофаги	Циновске ћелије	Капсула	Неоваскуларизација	Еозинофили	Страни дебрис	Пигмент	Хијалинизација	Мастоцити
Кп10	t	-,447	,000	,447	1,000	1,162	,000	,000	1,000	1,000	,612
Кп30	p	,663	1,000	,663	,337	,268	1,000	1,000	,337	,337	,552
Кп10	t	-,145	,931	,358	,540	1,078	,738	-,486	1,075	1,075	-,342
Кп90	p	,887	,369	,726	,599	,301	,474	,635	,302	,302	,738
Кп30	t	,358	,931	-,145	-,931	-,197	,738	-,486	/	/	-,978
Кп90	p	,726	,369	,887	,369	,847	,474	,635	/	/	,346

#### 4.4.3 Корелација параметара инфламације у испитиваним групама

Међусобна повезаност показатеља инфламације изражена је Пирсоновим-овим (Pearson) коефицијентом корелације (Табела 18).

Табела 18- Корелација свих показатеља инфламације изражена Пирсоновим коефицијентом.

Корелација свих параметара		Макрофаги	Џиновске ћелије	Капсула	Неоваскуларизација	Еозинофили	Страни дебрис	Пигмент	Хијалинизација	Мастоцити
Лимфоцити	Pearson Correlation	,573**	,583**	,000	,182	,000	,188	-,070	-,070	-,174
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	1,000	,231	1,000	,217	,650	,650	,254
Макрофаги	Pearson Correlation		,808**	-,187	,487**	-,200	,157	-,074	-,074	-,266
	Sig. (2-tailed)		,000	,219	,001	,188	,303	,629	,629	,077
Џиновске ћелије	Pearson Correlation			-,088	,417**	-,274	,300*	-,070	-,070	-,109
	Sig. (2-tailed)			,566	,004	,069	,045	,650	,650	,478
Капсула	Pearson Correlation				,225	,096	,103	,323*	,543**	,394**
	Sig. (2-tailed)				,137	,529	,501	,031	,000	,007
Неоваскуларизација	Pearson Correlation					-,200	-,054	-,074	,122	-,022
	Sig. (2-tailed)					,188	,725	,629	,425	,887
Еозинофили	Pearson Correlation						-,082	,076	-,152	,119
	Sig. (2-tailed)						,591	,619	,317	,437
Страни дебрис	Pearson Correlation							-,100	-,100	-,045
	Sig. (2-tailed)							,512	,512	,769
Пигмент	Pearson Correlation								,477**	,102
	Sig. (2-tailed)								,001	,507
Хијалинизација	Pearson Correlation									,265
	Sig. (2-tailed)									,079

Следећи показатељи су **међусобно јако** повезани:

- макрофаги и циновске ћелије-  $r=0,808$ ,  $p=(0,00)$ .

Следећи параметри су **међусобно умерено** повезани:

- лимфоцити и макрофаги-  $r=0,573$ , ( $p=0,00$ );
- лимфоцити и циновске ћелије-  $r=0,583$ ,  $p=(0,00)$ ;
- макрофаги и неоваскуларизација-  $r=0,487$ ,  $p=(0,001)$ ;
- циновске ћелије и неоваскуларизација-  $r=0,417$ ,  $p=(0,04)$ ;
- циновске ћелије и страни дебрис-  $r=0,300$ ,  $p=(0,04)$ ;
- дебљина капсуле и мастоцити-  $r=0,394$ ,  $p=(0,001)$ ;
- дебљина капсуле и присуство пигмента-  $r=0,323$ ,  $p=(0,03)$
- дебљина капсуле и хијалинизација-  $r=0,543$ ,  $p=(0,00)$ .

Корелације посматраних параметара инфламације по појединим групама су утврђене за:

- посматрано у Еп10 и Кп10:
  - ✓ густина макрофага и циновских ћелија-  $r= 0,731^{**}$ ,  $p=0,03$ ;
  - ✓ дебљина капсуле и присуство пигмента-  $r= 0,664^{**}$ ,  $p=0,010$ ;
  - ✓ дебљина капсуле и хијалинизација-  $r=0,664^{**}$ ,  $p=0,010$ ;
  - ✓ дебљина капсуле и густина мастоцита-  $r=0,654$ ,  $p=0,011$ ;
  - ✓ присуство пигмента и хијалинизација-  $r=1,000^{**}$ ,  $p=0,000$ ;
- посматрано у Еп30 и Кп30:
  - ✓ густина лимфоцита и макрофага-  $r=0,844^{**}$ ,  $p=,000$ ;
  - ✓ густина лимфоцита и циновских ћелија-  $r=0,807^{**}$ ,  $p=0,000$ ;
  - ✓ густина лимфоцита и еозинофила-  $r=0,520^{*}$ ,  $p=0,047$ ;
  - ✓ густина макрофага и циновских ћелија-  $r=0,822^{**}$ ,  $p=0,000$ ;
  - ✓ густина макрофага и дебљина капсуле-  $r= 0,559^{*}$ ,  $p=0,030$ ;
  - ✓ густина циновских ћелија и дебљина капсуле-  $r=0,535$ ,  $p=0,040$ ;
  - ✓ густина циновских ћелија и еозинофила-  $r=0,645^{*}$ ,  $p=0,009$ ;



- ✓ дебљина капсуле и хијалинизација-  $r=0,535^*$ ,  $p=0,040$ ;
- ✓ дебљина капсуле и густина мастоцита-  $r=0,605^*$ ,  $p=0,017$ ;
- посматрано у Еп90 и Кп90:
  - ✓ густина лимфоцита и циновских ћелија-  $r= 0,745^{**}$ ,  $p=0,001$ ;
  - ✓ густина лимфоцита и неоваскуларизација  $r=0,655^{**}$ ,  $p=0,006$ ;
  - ✓ густина макрофага и циновских ћелија  $r= 0,878^{**}$ ,  $p=0,000$ ;

Корелације посматраних параметара инфламације посматрано интрагрупно су утврђене за:

- посматрано у Еп10 и Еп30:
  - ✓ густина макрофага и циновских ћелија  $r= 0,873^{**}$ ,  $p=0,000$ ;
- посматрано у Еп30 и Еп90:
  - ✓ густина лимфоцита и макрофага  $r= 0,516^*$ ,  $p=0,041$ ;
  - ✓ густина лимфоцита и циновских ћелија  $r= 0,630^{**}$ ,  $p=0,009$ ;
  - ✓ густина макрофага и циновских ћелија  $r= 0,878^{**}$ ,  $p=0,000$ ;
  - ✓ дебљина капсуле и густина циновских ћелија  $r= 0,509^*$ ,  $p=0,044$ ;
  - ✓ густина еозинофила и неоваскуларизација  $r= 0,516^*$ ,  $p=0,041$ ;
- посматрано у Еп10 и Еп90:
  - ✓ густина макрофага и циновских ћелија  $r= 0,756^{**}$ ,  $p=0,001$ ;
  - ✓ густина макрофага и неоваскуларизација  $r= 0,533^*$ ,  $p=0,041$ ;
- посматрано у Кп10 и Кп30:
  - ✓ густина лимфоцита и циновских ћелија  $r= 0,541^*$ ,  $p=0,046$ ;
  - ✓ густина макрофага и циновских ћелија  $r= 0,719^{**}$ ,  $p=0,004$ ;
  - ✓ густина макрофага и неоваскуларизација  $r= 0,595^*$ ,  $p=0,025$ ;
  - ✓ густина макрофага и густина еозинофила  $r= 0,592^*$ ,  $p=0,026$ ;
  - ✓ густина циновских ћелија и густина еозинофила  $r= 0,607^*$ ,  $p=0,021$ ;
  - ✓ дебљина капсуле и присуство пигмента  $r= 1,000^*$ ,  $p=0,000$ ;

- ✓ дебљина капсуле и хијалинизација  $r= 1,000^*$ ,  $p=0,000$ ;
- ✓ присуство пигмента и хијалинизација  $r= 1,000^*$ ,  $p=0,000$ ;
  
- посматрано у Кп30 и Кп90:
  - ✓ густина лимфоцита и макрофага  $r= 0,888^{**}$ ,  $p=0,000$ ;
  - ✓ густина лимфоцита и циновских ћелија  $r= 0,891^{**}$ ,  $p=0,000$ ;
  - ✓ густина макрофага и циновских ћелија  $r= 0,745^{**}$ ,  $p=0,001$ ;
  - ✓ густина макрофага и неоваскуларизација  $r= 0,600^*$ ,  $p=0,018$ ;
  - ✓ дебљина капсуле и присуство страног дебриса  $r= 0,535^*$ ,  $p=0,040$ ;
  
- посматрано у Кп10 и Кп90:
  - ✓ густина лимфоцита и циновских ћелија  $r= 0,612^*$ ,  $p=0,015$ ;
  - ✓ густина макрофага и циновских ћелија  $r= 0,888^{**}$ ,  $p=0,000$ ;
  - ✓ густина макрофага и неоваскуларизација  $r= 0,736^{**}$ ,  $p=0,002$ ;
  - ✓ дебљина капсуле и присуство пигмента  $r= 0,888^{**}$ ,  $p=0,000$ ;
  - ✓ дебљина капсуле и хијалинизација  $r= 0,888^{**}$ ,  $p=0,000$ ;
  - ✓ дебљина капсуле и густина мастоцита  $r= 0,522^*$ ,  $p=0,046$ ;

## 5. Дискусија

Скорашња достигнућа у технологији омогућила су тачније и прецизније постављање зубног импланта (98). Рачунарски 3D системи данас, поред детаљне преоперативне дијагностике омогућавају и постављање детаљног терапијског плана као и израду различитих анатомских модела и хируршких вођица (99). Хируршке вођице направљене на основу података добијених помоћу СВСТ-а (cone beam computed tomography- енгл. прим. аут.) омогућавају брже, сигурније и тачније постављање импланта и посебно су индиковане код пацијената код којих је орофацијална анатомија таква да су извесне компликације приликом оваквих оралнохируршких интервенција (100). СВСТ представља тачан и једноставан систем помоћу кога се прикупљају оригинални 3D пресеци анатомских структура (101, 99). Подаци добијени из СВСТ снимака се софтверски трансформишу у формат компатибилан са стереолитографским апаратима – 3D штампачима (101).

Хируршке вођице се користе како би се имплант поставио на тачно планирану локацију и под планираном ангулацијом (101, 100). Употреба рачунарских система у препарацији лежишта за имплант резултирала је у просечној тачности која се креће у распону од 1mm што се тиче локализације импланта, и 5 ° девијације у инклинацији импланта (102, 99). Предности тачног постављања зубног импланта укључују, бољу ретенцију импланта уопште, сигурније естетске и функционалне резултате, као и побољшану ретенцију током ортодонтског оптерећивања мини импланта, бољу контролу вектора силе и сигурније интеррадикуларно постављање импланта (101).

Материјал Accura® ClearVue™ се већ користи у изради објеката стереолитографијом. Прозирност овог материјала чини га идеалним за израду фарова, сочива, транспарентних и комплексних склопова, медицинских модела и уређаја, прозора, флаша, као и било ког продукта коме желите да видите унутрашњи садржај (103). Објекти направљени од Accura® ClearVue™ материјала могу се брусити, бојити, полирати, или се може користити као узорак за уретанско ливење (103). Колико је аутору познато, на основу прегледа доступне литературе, Accura®

ClearVue™ епокси смола се није користила за израду хируршких вођица нити било ког медицинског средства које се доводи у контакт са кожом или слукожом пацијента.

Accura® ClearVue™ је епокси смола која очвршћава полимеризацијом. Епокси смоле су познате по добрим биокомпатибилним особинама. Она је довољно чврста, издржљива, стабилна у влажној средини и транспарентна и као таква представља идеалан материјал за израду хируршких вођица (103).

Подаци о особинама материјала, о њиховом саставу, механичким карактеристикама и биокомпатибилности, који потичу од произвођача, су важан извор информација. Оне су полазна основа за научна истраживања, која дају детаљније и тачније резултате, док се финални одговор добија на основу клиничких студија.

## 5.1 In vitro испитивање цитотоксичности материјала

Тестови за испитивање цитотоксичности сматрају се примарним, иницијалним тестовима у испитивању биокомпатибилности материјала. И поред низа недостатака који се односе на ограничену могућност тумачења резултата, сматрају се сензитивнијим тестовима од *in vivo* система (33). На основу резултата тестова цитотоксичности спроводе се даља испитивања и специфичнији тестови (17).

Када је у питању осмишљавање *in vitro* тестова, ради добијања резултата који се могу адекватно тумачити, важно је симулирати услове *in vivo* (45). Потребно је услове експеримента што више приближити условима који владају у усној дупљи. У оралном окружењу ћелије долазе у контакт са компонентама материјала директно (нпр. орална мукоза и база протезе, орална мукоза или периост и хируршка вођица) и индиректно (орална слузница која долази у контакт са супстанцама ослобођеним у пљувачку). С обзиром на претходно наведено, као и на то да врста контакта материјала и ћелијске културе значајно утиче на степен цитотоксичности, пожељно је цитотоксичност материјала испитати комбинацијом више различитих *in vitro* тестова (45, 104). ISO стандардом се препоручује да се не

тестирају само финални продукти и материјали, већ и њихови екстракти (45). Директни контакт материјала и ћелија подразумева и одређени ризик од механичког оштећења ћелија, а такође се повећава и ризик од бактеријске контаминације културе. На тај начин се може смањити вијабилност ћелија и самим тим утицати на релевантност резултата (45, 104). У презентованом истраживању урађен је МТТ тест (*Mosmann-ov колориметријски тест*) у коме је материјал у контакту са ћелијама посредством елуата (екстракта) као и тест агар дифузије у коме су узорци у директном контакту са ћелијама, обзиром да мономери и остале компоненте дифундују кроз танак слој агара. Агар дифузиони тест, који је мање сензитиван у односу на МТТ тест, показао је потпуно негативан резултат у виду одсуства деколоризоване зоне. МТТ тест је показао опадање броја ћелија са повећањем дужине екстракције у односу на контролну групу. Разлика у добијеним резултатима је настала првенствено због различите сензитивности ова два теста.

Фибробласти миша припадају перманентним културама ћелија, као и хумани фибробласти. Ове културе се могу, на неки начин, сматрати аналозима ћелија оралне слузокоже (105). Мишији фибробласти су често коришћени у различитим испитивањима стоматолошких материјала (77, 78, 104). Перманентне ћелијске линије су једноставнији системи и без специфичног метаболичког потенцијала као циљне ћелије (таргет ћелије *in vivo*). Међутим, поједина истраживања наводе да су ове ћелије сензитивније у различитим испитивањима у односу на примарне културе (104). Фибробласти ћелијске линије МRC-5 су у презентованом истраживању коришћени ради добијања резултата на хуманој ћелијској линији и провере да ли постоји разлика између мишијих и хуманих фибробласта у смислу ћелијског одговора. На тај начин добијени резултати се могу тумачити на клинички релевантнији начин.

Поређењем вијабилности ћелија две различите културе у презентованом истраживању, може се приметити да су већу стопу преживљавања показали мишији у односу на хумане фибробласте. Изузетак је седми дан када су вијабилније биле ћелије МRC-5 културе. Ове разлике се могу повезати са разликама у ћелијским линијама- хумане и мишије, као и са разликама у њиховом периоду удвостручавања.

Испитивањем цитотоксичности полимера на бази епокси смоле МТТ тестом доказана је блага цитотоксичност на културама ћелија MRC-5 и L929 ( $K\% = 60-90\%$ ) (46). Нецитотоксичним, материјал се показао једино у првом екстракционом периоду у оба теста на обе ћелијске културе. Оглед вршен на ћелијској култури MRC-5 показао је да материјал има задовољавајући степен биокомпатибилности, који ни у једном екстракционом периоду није износио мање од 77.603% и више од 94.096% вијабилности ћелија. Најмања забележена вијабилност износила је 77.603% и представља вијабилност MRC-5 културе у контакту са елуатима из 21.-ог дана. Вијабилност гингивалних фибробласта мерена МТТ тестом, најнижа је била код најконцентрованијих елуата.

Вијабилност ћелија се у овом истраживању, смањивала током екстракционих периода, да би најмања била 21. дана. Дозно зависна цитотоксичност доказана је и код мишијих фибробласта- вијабилност ћелија смањивала се са дужим екстракционим периодом.

Агар дифузиони тест показује да је материјал нецитотоксичан с обзиром да деколоризација око узорака није била видљива.

Слична испитивања спроведена су на акрилатним материјалима и показују благу до умерену цитотоксичност (46, 106-115). Отпуштање токсичних супстанци из акрилата је најизраженије током прва 24h након полимеризације (4). Истраживања показују да се и код композитних смола највећа цитотоксичност може очекивати у прва 24h по полимеризацији и да је након тога отпуштање мономера минимално, за разлику од презентованог истраживања где је цитотоксичност најмања у прва 24h, а расте са дужом екстракцијом (21).

Као последица садејства пљувачке, оралних микроорганизама и мастикаторних сила долази до деградације полимера која представља промену њихових хемијских, физичких и механичких особина (4). Деградација полимера која се догађа у усној дупљи је важан процес јер доводи до модификације ланца полимера и ослобађања споредних продуката- потенцијално токсичних компоненти (4). Сматра се да се биолошке реакције углавном базирају на интеракцији супстанце која је елуат из материјала са биолошким системима (111). Пример за то јесте токсичан или запаљенски одговор ткива на цурење реактивних

једињења из стоматолошких композита као што су невезани мономерни (111). Поједини аутори сматрају да токсичност полимерних материјала зависи од хемијског састава и чистоће материјала, степена конверзије мономера у полимер и количине преосталог невезаног мономера, а има схватања да зависи и од начина, времена и температуре полимеризације (4, 77, 82).

Супстанце као што су ММА (метил метакрилат), формалдехид, бензоична киселина, метакрилна киселина, дибутил фталат, фенил бензоат, фенил салицилат и дициклонхексил фталат, које су саставне хемијске компоненте акрилата, имају патолошки ефекат на ткива изазивајући различите клиничке симптоме као што су еритем, ерозија, сензибилизација, бол, улцерације, алергијске реакције и др. (4, 77, 82).

Хемијски састав савремених композитних смола се углавном базира на диметакрилатном мономеру, па су тако главни мономерни у саставу денталних композита су триетилен гликол диметакрилат (ТЕГДМА), бисфенол А глицеролат диметакрилат (Бис-ГМА) и уретан диметакрилат (УДМА) (21, 78). Метакрилатни и диметакрилатни мономерни, уобичајено коришћени у технологији полимера могу утицати на регрутацију леукоцита до поља инфламације смањењем експресије молекула-1 интерцелуларне адхезије (САМ-1) стимулисаном цитокином TNF- $\alpha$  (111). Такође, мономерни смола супримирају митохондријалну активност макрофага и мењају нормалне макрофагима индуковане инфламаторне одговоре (111). Бисфенол А се у појединим студијама спомиње и као супстанца са естрогеним дејством (78, 112). Сматра се да би код одређених епокси смола могли превазићи ове недостатке, јер важе за хемијски стабилније материјале (78). Assura® ClearVue™, епокси смола, може се сматрати погодном за израду хируршких вођица разматрајући резултате тестова цитотоксичности. У поређењу са материјалима који су већ у употреби у стоматологији показује једнаку ако не и мању цитотоксичност у *in vitro* тестовима.

Поред хемијског састава материјала, начин полимеризације је један од одлучујућих фактора што се цитотоксичности акрилатних смола тиче (4, 105). Продужење времена полимеризације може смањити токсичност смоле (4). Материјал Assura® ClearVue™ се континуирано полимеризује приликом израде

објеката, ласерском светлошћу слој по слој (7). Може се претпоставити да овај метод полимеризације доприноси смањењу количине резидуалних мономера и самим тим бољој биокомпатибилности овог материјала.

## 5.2 Тест иритације оралне мукозе

Оцена биокомпатибилности тестираног материјала вршена је на основу урађеног теста иритације оралне мукозе на моделу букалне кесице хрчка, што је дефинисано стандардом ISO 10993-10:2010 (87). Спровођење ових тестова и интерпретација резултата требали би бити у складу са будућом клиничком употребом материјала, па би тест иритације оралне мукозе требали разматрати само за материјале који су предвиђени да буду у контакту са оралним ткивима (87). Тест је специфично осмишљен како би се открио сензитизирајући и иритирајући потенцијал материјала кроз макро и микроскопску анализу слузокоже букалне кесице хрчка (87).

Претече данашњих експеримената на хрчковима су подрзумевале употребу парцијалних плочастих протеза или фиксних надокнада на малим животињама што је њихово извођење чинило скупим и дуготрајним (56). Неки пређашњи експерименти су подразумевали и сутурирање букалних кесица, што додатно трауматизује ткива. У овом истраживању су, употребом пластичне огрлице, такви недостаци превазиђени и није било ометања нормалне исхране хрчака. Узорци материјала, пошто су били малог дијаметра, додатно су причвршћени за смотуљке од газе ради лакшег руковања. У претходним истраживањима чија је методологија била без коришћења огрлице, 14-одневна ретенција је била 6.7%, а 48% уз коришћење огрлице (89). Упркос релативно лошој ретенцији у овим истраживањима, букална кесица се и даље сматрала логичним местом за тестирање материјала предвиђених за контакт са оралним ткивима (56). 1987. године спроведено је истраживање са поново осмишљеним и унапређеним тестом иритације оралне слузокоже за истраживање полимера у стоматологији. Ретенција је износила 10/10 за 14 дана и 7/10 за 35 дана без употребе огрлице (56). Ретенција



у презентованом истраживању које је трајало 21 дан била је већа од 90% за оба материјала.

Из разлога што чврсти стоматолошки материјали ретко остављају видљиво оштећење оралних ткива, након завршетка експеримента, ексцидиране су и прегледане комплетне букалне кесице.

„Swiss roll“ је метода посматрања великог исечка мукозе, и прво је описана као техника прегледа интестиналне мукозе. Аутори Reilly и Kirsner су 1965. године представили „Swiss roll“ препарацију- уролану интестиналну мукозу по дужини. „Swiss roll“ техника је представљена као метода која омогућава преглед великог сегмента интестиналне мукозе (88). Ова техника је већ коришћена у хистолошкој обради оралне слузокоже у истраживањима повезаним са изазивањем оралних карцинома појединим хемијским супстанцама (90, 113).

У презентованом истраживању биокомпатибилност предложеног материјала као и контроле оцењена је у односу на присуство оштећења епитела, инфламаторних ћелија, едема и васкуларне конгестије (56). Промене епитела које би се могле догодити укључују: улцерације, хиперкератозу, дискератозу, дисплазију, акантозу, формирање везикула и микроапсцеса, промене у пигментацији, алтерације базалне мембране, атипичну ћелију епитела, хиперплазију, метаплазију и неоплазију. Исподлежеће ткиво може показати хиперимију, вазодилатацију, едем, инфилтрацију инфламаторним ћелијама, фиброзу, хеморагију, реакцију типа око страног тела или формирање кератинске цисте (89).

Резултати указују на то да је контакт слузокоже букалне кесице хрчака и узорака резултирао минималним епителним променама. Епител је био очуваног интегритета у обе групе. То се може довести у везу са отпорношћу епитела слузокоже букалне кесице који је и морфолошки и функционално прилагођен механичким надражајима. Поједини аутори чак сматрају да због тако добро прилагођеног и отпорног епитела и густе ламине проприје слузокожа букалне кесице није толико прикладна за тестирање различитих материјала и супстанци. Такође, постоје тврдње да овом епителу поред тога што недостају дендритске ћелије и аднексалне структуре у броју у коме се налазе у епителу гингиве, непца и језика, недостају и лимфатци у адвентицији (114). На овај начин ламина проприја

представља непробојну анатомску и хистолошку баријеру коју тешко насељавају инфламаторне ћелије. Оваква морфологија може спречити буђење имуног одговора на различите антигене (61, 114).

На препаратима слузнице која је била у контакту са експерименталним материјалом, друге ћелије, осим малог броја лимфоцита, нису биле видљиве између снопова колагених влакана и око финих капиларних простора.

Тефлон (политетрафлуороетилен) је инертан материјал, и присуство инфламације може бити повезано са реакцијом на страном телу с обзиром да локална иритација може узроковати инфламацију (16). На препаратима слузнице која је била у контакту са тефлоном, видљив је био благ едем. Такође у два препарата који су били у контакту са тефлоном била је примећена и појачана кератинизација епителног слоја. То се може довести у везу са тим да је храпавији тефлон је већи иританс него гладак материјал.

### **5.3 Тест субкутане имплантације**

Имплантација узорака је рађена у леђно поткожно ткиво пацова, јер ткиво ове локализације лако реагује на разне хемијске супстанце. Такође ова техника има широку примену већ преко 30 година и даје објективну слику реакције ткива на имплантирани материјал у одређеном опсервационом периоду (31, 62).

Експериментални материјал се сматрао биокомпатибилним уколико је интензитет инфламаторне реакције везивног ткива опадао са временом. Последишно, како би се сматрао биокомпатибилним, 90-тог дана након имплантације око импланта мора постојати танка фиброзна капсула као и одсуство инфламаторне реакције и/или циновских ћелија. Са друге стране, материјал је сматран небиокомпатибилним, уколико је постојала перзистирајућа инфламаторна реакција удружена са макрофагима и циновским ћелијама као и дебелим фиброзном капсулом чак и 90-тог дана након имплантације.

### 5.3.1 Реакција ткива на имплантацију

Након имплантације материјала, у ткиву отпочиње низ реакција чија је сврха да спрече даље оштећење ткива, да изолују и униште страног тело и активирају процесе обнављања ткива. Ове реакције заправо представљају акутну фазу инфламаторног одговора, која може да уништи имплантни систем, да прогредира до хроничног инфламаторног одговора и/или до настанка гранулома (31, 115).

Имплантација материјала у ткиво се може сматрати његовом својеврсном повредом која даље изазива реакцију у виду акутне инфламације (115). Приликом контакта ткива са имплантираним материјалом долази до промена у нивоима неколико серумских протеина као и у бројчаним односима крвних ћелија. Серумски протеини се сматрају заправо протеинима акутне фазе запаљења и у се крви налазе у малим концентрацијама (10% плазматских протеина). Као одговор на повреду ткива, нивои протеина (серумски амилоид А, Ц реактивни протеин, фибриноген, хаптоглобин, церулоплазмин и алфа-1- антитрисин) као и нивои глобулина ( $\alpha_1$  и  $\alpha_2$ ) расту (појачану синтезу стимулишу IL-1 и IL-6). Због повећаног хидростатског притиска, повећане пропустљивости крвних судова и изласка течности у интерстицијум, ниво албумина, трансферина као и  $\beta_1$  глобулина опада. Прва течност - трансудат - која излази из крвних судова садржи малу концентрацију протеина, а након дуже вазодилатације излази ексудат-течност богата серумским протеинима (31, 115). За разлику од акутног запаљења, хроничну инфламацију карактеришу углавном непромењени нивои албумина, незнатно увећани  $\alpha$  глобулини и повећани  $\gamma$  глобулини (31, 115).

Крвни протеини (имуноглобулини, компоненте комплемента, антитромбин III, трансферин, фибронектин, ламинин, албумин, фактори раста...) у току следећих неколико сати прекривају имплантирани материјал, формирајући слој чврсто адсорбованих нативних, делимично или потпуно денатурираних протеина. Истовремено, у ексудату се налазе неутрофили, еозинофили, базофили, моноцити, лимфоцити, плазма ћелије и тромбоцити који инфилтришу интерстицијум. У ком бројчаном односу ће се наћи ове ћелије зависи првенствено од природе повреде, а затим и од типа запаљења које изазива.

У акутној фази инфламације, неутрофили су најзаступљеније ћелије, обзиром на њихову бројност и брзу мобилизацију. Међутим, неутрофили нису били приутни у ткиву око узорака у презентованом истраживању, пошто су такође и краткоживећи (24-48h од напуштања крвног суда). Њих замењују дугоживећи моноцити који се у ткиву трансформишу у макрофаге. Макрофаги, привучени цитокинима ткива око импланта, имају важну улогу да уклоне страна тела из повређеног ткива. (31, 115).

Макрофаги уз циновске ћелије се акумулирају, окружују имплант и шаљу сигнале да је страна тело ограђено. Стимулишу и фибробласте да синтетишу колаген и протеогликане у циљу инкапсулације импланта у фиброзну капсулу. Важно је приметити да формирање капсуле не подразумева некомпатибилно стање и може се сматрати нормалним процесом. Тело реагује на приближно све стране материјале, између осталог и на оне који се сматрају биокомпатибилним, и ограђује их формирањем колагене капсуле. Колагена капсула заправо представља баријеру која спречава да супстанце ослобођене из инкапсулираног материјала дифундују у околно ткиво, као и за кисеоник и нутруитијенте да хране инкапсулиране ћелије, те је дебљина капсуле од велике важности. Постоји корелација између дебљине створене капсуле и степена биокомпатибилности материјала- што је материјал биокомпатибилнији то ће капсула бити тања и обрнуто. Чак и у случају биокомпатибилног материјала, идеална ситуација репарације- реституција нормалне ткивне структуре се обично не примећује након имплантације и зарастање ране није уобичајено. Ако имплант перзистира као перманентни стимулус, на пример због веома споре деградације, то може резултирати формирањем гранулома (када је у питању интензивна хронична инфламација, акумулација активираних макрофага и лимфоцита) са бројним вишеједарним ћелијама, отоком и болом. Ако је биоматеријал токсичан за макрофаге, они не могу разградити ограђено, умиру и ослобађају ензиме у околно ткиво, доводећи тако до ткивног оштећења. Последњи стадијум је ћелијска смрт која води до некрозе (115).

Крвне судове, услед повећане пропустљивости, напуштају и лимфоцити, а у реакцијама преосетљивости и еозинофилни гранулоцити. Ово окупљање

инфламаторних ћелија на месту запаљења сматра се главним хистолошким показатељем инфламације.

У ткиву око материјала десет дана након имплантације, у презентованом истраживању, у обе групе (експериментална и контролна) примећена је слична хистолошка слика. Ова сличност у реакцији ткива на тефлон и испитивани полимер може се протумачити као одговор ткива на хируршку трауму и не мора се нужно повезивати са одговором на специфични материјал. У претходним испитивањима биокомпатибилности денталних материјала, иницијални одговор ткива на уградњу узорака је такође био јачи након првих у односу на касније имплантационе периоде, и опадао је са временом (116, 34). У презентованом истраживању је око свих узорака била формирана фина фиброзна капсула дебљине око 100-150nm, без знакова хијалинизације. Примећено је и присуство циновских ћелија типична гигантоцелуларна реакција типа око страног тела, као и присуство појединачних лимфоцита, мастоцита и еозинофила. Једино је број мастоцита био значајно већи око узорака од експерименталног материјала у односу на тефлон. Након десет дана и у биопсијама са узорцима од тефлона биле су присутне формиране капсуле у чијем зиду су се одвијале гигантоцелуларне реакције. Појединачни лимфоцити и страно тело присутни су били у појединим биопсијама. У биопсијама је примећено благо повећање броја макрофага и циновских ћелија у близини имплантираног материјала. Овај одговор је карактерисан и присуством бројних малих конгестираних и дилатираних крвних судова.

Акутна фаза инфламације је у реакцијама организма на иритације слабог интензитета од стране неког инертног материјала заправо кратка, слабо изражена и замаскирана пролиферативном компонентом. Оваква запаљења се називају и примарно хронична запаљења, а карактерисана су пролиферацијом фибробласта и макрофага. Макрофаги који нису окружили материјал могу се сјединити и формирати вишеједарну циновску ћелију типа око страног тела (37). Овај тип запаљења преовладавао је и у презентованом истраживању.

Тридесет дана након имплантације око узорака је примећено опадање интензитета инфламаторне реакције. Око узорака од експерименталног материјала

могла се приметити уједначена капсула саграђена од фиброцита, делимично хијалинизована, без присутних лимфоцита и плазма ћелија. У појединим биопсијама могао се приметити страни материјал и циновске ћелије. Око узорака од тefлона у истом имплантационом периоду била је примећена танка капсула (50-100  $\mu\text{m}$ ) са појединачним лимфоцитима и присутним циновским ћелијама, док је код узорака са експерименталним материјалом и даље била умерене дебљине. Блага инфламаторна реакција је примећена у овој групи. Код узорака који су показивали умерену запаљенску реакцију посредовану моноклеаним ћелијама, примећена је дебља капсула са неколико малих крвних судова. У другом имплантационом периоду број лимфоцита, макрофага, циновских ћелија и еозинофила је у Еп30 био је мањи у односу на Кп30. Број мастоцита је био већи у Еп30, као и дебљина капсуле.

Након деведесет дана од имплантације, око тefлона као контролног материјала била је присутна добро формирана капсула, састављена од чисто хипоцелуларног везивног ткива без инфламаторних ћелија. Примећен је уобичајен број крвних судова, без циновских ћелија, са појединачним мастоцитима. Око експерименталног материјала може се приметити капсула дебљине 20-100 $\mu\text{m}$ . У околини су присутни појединачни мастоцити, са мало еозинофила и макрофага.

На основу присуства и броја неутрофилних гранулоцита, макрофага, лимфоцита, плазма ћелија, циновских ћелија типа око страног тела, као и деградације материјала, дебљине новостворене фиброзне капсуле око материјала и присуства младог гранулационог ткива процењен је тип и интензитет инфламаторне реакције (26, 27). Резултати показују да су оба материјала имплантирана у дорзално субкутано ткиво пацова узроковала благу инфламаторну реакцију која се смиривала временом. Траума током хируршког имплантирања материјала у субкутано ткиво може узроковати иницијалну реакцију у краткорочној евалуацији што је у овом истраживању вероватно и био случај (92, 116). Мастоцити, кључне ћелије неспецифичног имуног система, су у сва три временска интервала били бројнији око узорака од експерименталног материјала. Мастоцити („антене имуног одговора“), поседују бројне рецепторе на својој мембрани и откривају промене у свом окружењу и комуницирају са суседним

ћелијама стимулишући их на одговор (35). За разлику од тестова цитотоксичности, у експериментима на животињама можемо разматрати: интеракцију различитих ћелија међусобно и са имплантима, утицај ендокриних и паракриних фактора, интеракције са ћелијама, протеинима и молекулима које преноси крв. Фактори који утичу на реакцију ткива на имплант су: мртви простор који ствара сам имплант, растворљиве и нерастворљиве супстанце које испушта имплант, хемијске интеракције које настају контактом биолошких молекула и имплантата, промене у самом распореду ткива због нееластичности или кретања импланта ка суседном ткиву због недостатка механичке везе (31).

### 5.3.2 Полимери у стоматологији

Ниједан полимер није потпуно стабилан и потпуно отпоран на хемијске и механичке процесе у телу. Ћелије и ткива различито реагују и на хемијски састав и на механичке силе којим имплант (страни материјал усађен у ткиво) делује (31). Након имплантације, на површини импланта се догађа како адсорпција протеина, тако и апсорпција растворљивих компоненти у унутрашњост материјала. Такође, долази до испуштања компоненти полимера у околно ткиво. Временом може доћи до промене особина материјала- могу постати растворљиви, трошни, гумасти или прекрути.

У презентованом истраживању посебно је важна храпавост површине материјала. Студија Хенсона (Hansson) показује да се храпава површина показала супериорнијом у односу на глатку и полирану, јер поспешује регенерацију и апозицију коштаног ткива на површину имплантата. Ипак, непожељна је и претерана храпавост, јер провоцира одговор макрофага, а умерена површинска храпавост од 1.5-5  $\mu\text{m}$  има позитиван ефекат на процес зарастања и примарну стабилност (117). Храпавији узорак је већи механички иританс, па се очекује да изазове јачу реакцију ткива са којим долази у контакт. Тефлон, иако хемијски инертан материјал, је у презентованом истраживању ипак био већи механички иританс с обзиром на већу храпавост његове површине. У неравнинама храпавих површина остају заробљене честице ваздуха које повећавају угао квашења, повећавају активирање компоненти комплемента и утичу на слику реакције ткива

(31). Квашење је мера афинитета површине материјала према течности (степен квашења зависи од интермолекулског привлачења површине материјала и течности). Квалитет квашења одређује се преко ширења капљице по површини материјала, и зависи од храпавости/исполираности површине као и од напона материјала и течности. Ако је угао квашења  $\Theta < 90^\circ$ , квашење материјала је добро, док је код угла  $\Theta > 90^\circ$  квашење слабо. У случају високе површинске енергије материјала (метали, керамика) и ниске енергије течности, квашење је добро. Са друге стране, због ниске површинске енергије полимера, квашење по њиховој површини је слабо. Слабо квашење доводи до слабије интеракције материјала са околином.

Поткожна ткива се често бирају за процену биокомпатибилности уграђених материјала. Пре него што се имплант угради у тело, требало би га оставити у воденом раствору, јер на адсорпцију протеина утиче влажност површине полимера. Након имплантације узорака, адсорпција протеина ће променити својства површине материјала. Већина потенцијално интересантних материјала за употребу у медицини и стоматологији изазива реакцију типа око страног тела. Ћелије које долазе у контакт са адсорбованим протеинима на површини имплантираног материјала, ступају у интеракцију са њима и иницирају даље хемијске реакције. Структура биоматеријала утиче на будуће понашање ћелија, укључујући адхезију, површину ширења, пролиферацију, оријентацију ћелија, биохемијску активност (31). Макрофаги су доминантне ћелије реакције типа око страног тела, и они врше фагоцитозу материјала. Фагоцитоза није увек једнако успешна јер се често поједини материјали не могу разградити у потпуности. Макрофаги такође луче и цитокине који стимулишу запаљење и стварање везивног ткива. У јачој реакцији на страно тело преовлађиваће циновске вишеједарне ћелије. Уколико се материјал троши, па га ћелије не могу обложити, или су му честице крупне па се не могу ни фагоцитовати, онда долази до лучења цитокина, ензима и других медијатора и долази до оштећења околног ткива (31). У презентованом истраживању одговор ткива на имплантацију материјала иде у прилог доказивању добре биокомпатибилности полимера на бази епокси смоле, Accura® ClearVue™. Другим речима, била је присутна блага реакција типа око



страног тела, што је нормална реакција ткива које је оградило страно тело без јаке инфламације и оштећења ткива.

Што се тиче отпуштања компоненти из стоматолошких материјала, постоје студије које указују на могућност замене токсичних супстанци сигурнијим и супстанцама које мање дифундују (33). Студије које су изучавале цитотоксичност денталних епоксидних смола показале су да би додавање спироортокарбоната и полиола у њихов састав могло смањити растворљивост и цитотоксичност (33). Прототип оксиран-полиол, SuraSure™ смола, показује не само добру полимеризацију већ и прихватљиву биокомпатибилност у тестовима цитотоксичности (86, 118). И нови мономер под називом силоран (епоксид базиран на силикону са функционалношћу оксирана) показује боље механичке и физичке карактеристике од конвенционалних метакрилатних полимера (првенствено ниско цурење, мања сорпција воде, нерастворљивост у води и различитим воденим растворима, добра биокомпатибилност са малим мутагеним потенцијалом) (118-121). Мања маргинална контракција епоксидних смола у односу на метакрилате доводи се у везу са отварањем прстена током конверзије (86). Смоле на бази епоксида су и у ранијим истраживањима показале да имају пожељније особине у односу на BISGMA (бис-фенол-глицидил-матакрилат): боља полимеризација, мања маргинална контракција, већа чврстоћа, тврдоћа. Полимери из групе епоксида су оцењени као материјали са добрим биокомпатибилним карактеристикама и као мање цитотоксични од типичног метакрилатног мономера и BISGMA (118-120).

Метод полимеризације се у појединим студијама наводи као одлучујући фактор који утиче на цитотоксичност акрилатних смола (117). С обзиром на начин производње објеката адитивним технологијама и полимеризацију слој по слој, може се претпоставити да ће количина невезаног мономера у полимеризованом стању Accura® ClearVue™ бити сведена на минимум (17). Узимајући у обзир и хемијски састав материјала Accura® ClearVue™, као и претходна истраживања на тему биокомпатибилности полимера на бази епокси смоле, може се рећи да материјал има велики потенцијал за употребу у стоматологији.

## 6. Закључак

1. Агар дифузионим тестом утврђено је да материјал Accura® ClearVue™ не показује цитотоксичан ефекат.
2. Резултати МТТ теста на културама ћелија L929 и MRC-5 су показали да Accura® ClearVue™ има благо цитотоксичан ефекат, који не ограничава употребу материјала у стоматологији. Цитотоксичност материјала Accura® ClearVue™ се повећава са дужином екстракције узорака.
3. Материјал Accura® ClearVue™ не узрокује механичку иритацију на анималном моделу сиријског хрчка у тесту иритације оралне мукозе.
4. Материјал Accura® ClearVue™ на анималном моделу пацова изазива благу хроничну реакцију, која се трајањем експозиције смањује.
5. Крајњи резултат хроничне реакције након имплантације материјала је ограничавање страног материјала, при чему су описане реакције нижег интензитета у односу на контролни стандардни материјал – тефлон.
6. Испитивањем биокompatibilности материјала Accura® ClearVue™ утврђено је да се може употребљавати у стоматологији за израду хируршких вођица адитивном технологијом.

## 7. Литература

1. Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M. In vivo study of the pulp reaction to Fuji IX, a glass ionomer cement. *J Dent.* 2000; 28(6) 413-22.
2. Jerolimov V. Osnove stomatoloških materijala. 1<sup>st</sup>ed.: Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet. Zagreb (2005.).
3. Bhola R, Bhola M. S, Liang H, Mishra B. Biocompatible Denture Polymers. *Trends Biomater Artif Organs.* 2010; 23(3) 129-136.
4. Ivković N, Božović Đ, Ristić S, Mirjanić V, Janković O. The Residual Monomer in Dental Acrylic Resin and its Adverse Effects. *Contemporary materials.* 2013; 4(1) 84-91.
5. Bettencourt AF, Neves CB, de Almeida MS, Pinheiro LM, Oliveira SA, Lopes LP, Castro MF. Biodegradation of acrylic based resins: A review. *Dent Mater.* 2010; 26(5) 171-180.
6. Van Noort R. The future of dental devices is digital. *Dent Mater.* 2012; 28(1) 3-12.
7. Bens TA, Tille C, Bermes G, Emons M, Seitz H. Novel, biocompatible polyether(meth)acrylate-based formulations for stereolithography. *e-Polymers.* 2005; 5( 1) 377–386.
8. Krunić S, Perinić M, Maričić S. Načini brze izrade predserijskih proizvoda rapid prototyping application. *Eng Rev.* 2010; 30(2) 91-100.
9. Kianoosh Torabi, Ehsan Farjood, Shahram Hamedani. Rapid Prototyping Technologies and their Applications in Prosthodontics, a Review of Literature. *J Dent Shiraz Univ Med Sci.* 2015; 16(1) 1-9.
10. Šljivić M, Stanojević M, Grujović N, Radonjić R. Optimization of rapid prototyping technology for advanced medical applications. *Contemporary materials.* 2011; 2(1) 76-83.

11. Stanojević M, Šljivić M, Plančak M, Đurđević D. Advanced investigation on rapid prototyping techniques in maxillofacial surgery and implanting preparation. *Journal for Technology of Plasticity*. 2014; 39(1)11-20.
12. Sabati Z, Bernik A, Prprović N. Metode rada i odabir materijala za 3D ispis. In: Vilko Žiljak, editor. Proceedings of the International Conference Tiskarstvo 2011. Akademija tehničkih znanosti Hrvatske - Centar za grafičko inženjerstvo; 2011: Stubičke toplice, Hrvatska: FS, FotoSoft, ADAM-KAJ; 2011. p. 43-50.
13. Azari Abbas, Nikzad Sakineh. The Evolution of the Rapid Prototyping in dentistry: a review. *Rapid Prototyping Journal*. 2009; 15(3) 216-225.
14. Germani M, Raffaelli R. A method for performance evaluation of RE/RP systems in dentistry. *Rapid Prototyping Journal*. 2010; 16(5) 345-355.
15. Bibb R, Eggbeer D, Evans P, Bocca A, Sugar A. Rapid manufacture of custom-fitting surgical guides. *Rapid Prototyping Journal*. 2009; 15(5) 346-354.
16. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. Biocompatibility of dental materials. 1<sup>st</sup> ed. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag GmbH; 2009.
17. Watacha CJ. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dental Materials*. 2012; 28(1) 23-40.
18. Zafalon EJ, Versiani MA, Souza CJ, Moura CC, 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 Endodontics*. 2007; 103(5):88-94.
19. Bächle M, Mahi MA, Kohal RJ. On-line analysis of CAL72 cells on two different titanium surfaces in a perfusion micro-bioreactor. *Dental Materials*. 2005; 21(7) 633-640.
20. Karadžić B, Bojović S, Dražić R. Ispitivanje biokompatibilnosti materijala na bazi polimetil metakrilata implantiranih u koštano tkivo. *Serbian Dental Journal*. 2004; 51(4)183-187.
21. Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook I. M., Scutt A. M. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dental Materials*. 2007; 23(1) 40-44.

22. 3D Systems, Inc. Material Safety Data Sheet, Material Name: Accura® ClearVue™.  
[http://www.3dsystems.com/sites/www.3dsystems.com/files/DS\\_Accura\\_Clearvue\\_US.pdf](http://www.3dsystems.com/sites/www.3dsystems.com/files/DS_Accura_Clearvue_US.pdf) [15.12.2013.].
23. Cassetta M, Giansanti M, Di Mambro A, Calasso S, Barbato E. Accuracy of two stereolithographic surgical templates: a retrospective study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013 Jun; 15(3):448-59.
24. Nickenig HJ, Eitner S. Reliability of implant placement after virtual planning of implant positions using cone beam CT data and surgical (guide) templates. *J Craniomaxillofac Surg.* 2007 Jun-Jul; 35(4-5):207-11. Epub 2007 Jun 18.
25. Bae MJ, Kim JY, Park JT, Cha JY, Kim HJ, Yu HS, Hwang CJ. Accuracy of miniscrew surgical guides assessed from cone-beam computed tomography and digital models. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013 Jun;143(6):893-901. doi: 10.1016/j.ajodo.2013.02.018.
26. Kim SH, Choi YS, Hwang EH, Chung KR, Kook YA, Nelson G. Surgical positioning of orthodontic mini-implants with guides fabricated on models replicated with cone-beam computed tomography. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007 Apr;131(4 Suppl):S82-9.
27. Nickenig HJ, Wichmann M, Hamel J, Schlegel KA, Eitner S. Evaluation of the difference in accuracy between implant placement by virtual planning data and surgical guide templates versus the conventional free-hand method - a combined in vivo - in vitro technique using cone-beam CT (Part II). *J Craniomaxillofac Surg.* 2010 Oct;38(7):488-93. doi: 10.1016/j.jcms.2009.10.023. Epub 2009 Nov 24.
28. Qing Yang, Xiudi Li, Lei Shi, Xiaoping Yang, Gang Sui. The thermal characteristics of epoxy resin: Design and predict by using a molecular simulation model. *Polymer.* 2013; 54(3): 6447-6454.
29. Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, Scheers H, Godderis L, Hoet P, Van Meerbeek B. How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dental Materials.* 2011; 27(8): 723-747.

30. Marković D, Radovanović A, Kovačević-Filipović M, Francuski J, Todorović V. Histološke karakteristike mekih tkiva posle implantacije biokeramičkih materijala I procena biokompatibilnosti. *Vet Glasnik*. 2012; 66 (3-4) 285 - 297.
31. Balać I, Bugarski B, Ćosić I, Dramićanin M, Đorđević D, Filipović N, et al. Biomaterijali, 1<sup>st</sup>ed. Beograd: Institut tehničkih nauka srpske akademije nauka I umetnosti; 2010.
32. Schmalz G, Gröppel F, Hiller KA, Galler MK. Three-Dimensional Human Cell Cultures for Cytotoxicity Testing of Dental Filling Materials. *Acta Stomatologica Croatica*. 2014; 48(2) 99-108.
33. Moharamzadeh K, Brook MI, Van Noort R. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials*. 2009; 2(2) 514-548.
34. Koçak S, Erten H, Baris E, Türk S, Alaçam T. Evaluation of the biocompatibility of experimentally manufactured portland cement: An animal study. *J Clin Exp Dent*. 2014; 6(1) 17-21.
35. Kostić M, Krunić N, Najman S. Savremeni aspekt ispitivanja biokompatibilnosti materijala u stomatologiji. *Acta Stomatologica Naissi*. 2010; 26(62) 1007 – 1016.
36. Imai Y, Watanabe A, Chang PI, Masuhara E. Evaluation of the biologic effects of dental materials using a new cell culture technique. *J Dent Res*. 1981; 61(8) 1024-1027.
37. Budakov P, Cvejin B, Eri Ž, Klem I, Knežević-Ušaj S. Patologija za studente stomatologije, 3<sup>rd</sup>ed. Novi Sad: Medicinski fakultet Novi Sad; 2006.
38. Atanacković M, Bačetić D, Basta-Jovanović G, Begić-Janeva A, Boričić I, et al. Patologija, 3<sup>rd</sup>ed. Beograd: Medicinski Fakultet univerziteta u Beogradu, Katedra za patologiju; 2009.
39. International Standards Organization (1994) ISO10993. *Biological evaluation of medical devices*. Geneva, Switzerland.
40. Čolić M. Testovi za ispitivanje biokompatibilnosti stomatoloških materijala. U: Stamenković D. i sar. Gradivni stomatološki materijali (dostignuća i perspektive): Stomatološki fakultet Beograd 2007; 37-62.
41. Dee KC, Puleo DA, Bizios R. Biocompatibility. In: An introduction to tissue-biomaterial interactions. Wiley-Liss. 2002; 173-183.

42. Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, PavarinaAC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylicresins evaluated in culture of L929 cells, Effect of polymerization cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology*. 2007; 24:52-57.
43. Dahl JE, F rangou-Ployzois MJ, Polyzois GL. In vitro biocompatibility of denture relining materials. *Gerodontology*. 2006; 23: 17-22.
44. Polyzois GL. In vitro evaluation of dental materials.*Clinical Materials*. 1994; 16: 21-60.
45. Tang ATH, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Citotoxicity tests of in situ polymerized resins: Methodological comparisons and introduction of tissue culture insert as a testing device. *Int Biomed Mater Res*. 1999; 45: 214-222.
46. Kostić M, Krunić N, Najman S, Kocić J, Veselinović M. Promene na HeLa ćelijskoj kulturi uprিসustvu akrilata za bazu proteze. *Acta Stomatol Naissi*. 2008; 58: 793-800.
47. L' efebvre CA, Knoernschild KL, Schuster G S. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. *J Prosthet Dent*. 1994; 72: 644-650.
48. Bakopoulou A, Mourelatos D, Tsifsoglou AS, Giassin NP, Mioglou E, Garefis P. Genotoxic and cytotoxic effects of different types of dental cement on normal cultured human lymphocytes. *Mutation Research*. 2009; 672: 103-112.
49. Kostoryz LE, Tong YP, Chappelow CC, Eick DJ, Glaros GA, Yourtee MD. In vitro cytotoxicity of solid epoxy-based dental resins and their components. *Dental Materials*. 1999; 15(5): 363-73.
50. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Invest*. 1997; 1: 154-162.
51. Krunić N, Nikolić Lj, Kostić M, Najman S, Nikolić V, Najdanović J. In vitro ispitivanje potencijalne toksičnosti oralno tkivnih kondicionera. *Hem Ind*. 2011; 65(6): 697-706.
52. International Standards Organization (1994) ISO/DIS 7405. *Dentistry: preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry: test methods (revision of ISO/TR 7405)*, Geneva, Switzerland.

53. International Standards Organization (1994) ISO10993. *Biological evaluation of medical devices*, Geneva, Switzerland.
54. Browne MR. Animal Tests for Biocompatibility of Dental Materials- Relevance, Advantages, and Limitations. *Journal of Dentistry*. 1994; 22 suppl 2: 21-24.
55. Harsanyi BB, Foong WC, Howell RE, Hidi P, Jones DW. Hamster cheek-pouch testing of dental soft polymers. *J Dent Res*. 1991; 70(6): 991-996.
56. Loury D, Embree JR, Steinberg DA, Sonis ST, Fiddes JC. Effect of local application of the antimicrobial peptide IB-367 on the incidence and severity of oral mucositis in hamsters. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999; 87(5): 544-51.
57. França CM, França CM, Núñez SC, Prates RA, Noborikawa E, Faria MR, Ribeiro MS. Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters. *J Photochem Photobiol B*. 2009; 94(1): 25-31.
58. Afifi MM, El Sheikh SM, Abdelsalam MM, Ramadan H, Omar TA, El Tantawi M, Abdel-Razek KM, Mohamed M. Therapeutic efficacy of plasmonic photothermal nanoparticles in hamster buccal pouch carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013; 115(6): 743-51
59. Silvan S, Manoharan S. Apigenin prevents deregulation in the expression pattern of cell-proliferative, apoptotic, inflammatory and angiogenic markers during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Arch Oral Biol*. 2013; 58(1): 94-101.
60. Grasso P, Mann AH. Smokeless tobacco and oral cancer: an assessment of evidence derived from laboratory animals. *Food Chem Toxicol*. 1998; 36(11): 1015-29.
61. Ghoshal NG, Bal HS. Histomorphology of the hamster cheek pouch. *Laboratory Animals*. 1990; 24(3): 228-233.
62. Vujašković M., Bačetić D. Reakcija tkiva na materijale za trajno punjenje kanala korena zuba. *Serbian Dental Journal*. 2004; 51(3): 136-141.
63. Robert A, Freitas Jr, Nanomedicine, Volume IIA: Biocompatibility Landes Bioscience, Georgetown, TX, 2003.
64. Aurer A, Jorgić-Srdjak K. Membranes for Periodontal Regeneration. *Acta Stomatol Croat*. 2005; 39(1): 95-112.



65. Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater.* 2014; 30(7): 769-84.
66. Paepegaey AM, Barker ML, Bartlett DW, Mistry M, West NX, Hellin N, Brown LJ, Bellamy PG. Measuring enamel erosion: a comparative study of contact profilometry, non-contact profilometry and confocal laser scanning microscopy. *Dental Mater.* 2013; 29(12): 1265-1272.
67. Rodriguez JM, Curtis RV, Bartlett DW. Surface roughness of impression materials and dental stones scanned by non-contacting laser profilometry. *Dent Mater.* 2009; 25(4): 500-5.
68. Pavlović Ž. Karakterizacija površinske structure neštampajućih elemenata CTP termalne štamparske forme za ofset štampu. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Fakultet tehničkih nauka: Departman za grafičko inženjerstvo i dizajn, 2012.
69. Mendes AP, Barceleiro Mde O, dos Reis RS; Bonato LL; Dias KR. Changes in surface roughness and color stability of two composites caused by different bleaching agents. *Braz Dent J.* 2012; 23(6): 659-66.
70. Ghinea R, Ugarte-Alvan L, Yebra A, Pecho EO, Paravina D R, Mar Perez M. Influence of surface roughness on the color of dental-resin composites. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2011; 12(7): 552–562.
71. Ergücü Z, Türkün LS. Surface Roughness of Novel Resin Composites Polished with One-step Systems. *Operative Dentistry.* 2007; 32(2): 185-192.
72. Jevremović PD, Ajduković RZ, Stanković DS, Radosavljević DR. Profilometric and SEM analyses of composite surfaces after cement excess removal. *Hem Ind.* 2012; 66(1): 59–66.
73. Heurich E, Beyer M, Jandt KD, Reichert J, Herold V, Schnabelrauch M, Sigusch BW. Quantification of dental erosion--a comparison of stylus profilometry and confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Dent Mater.* 2010; 26(4): 326-36.
74. Bagis B, Tüzüner T, Turgut S, Mehmet Korkmaz F, Baygın Ö, Bağış YH. Effects of Protective Resin Coating on the Surface Roughness and Color Stability of Resin-

- Based Restorative Materials. *The Scientific World Journal*. 2014; Article ID 832947, 7 pages, 2014. doi:10.1155/2014/832947
75. Camacho GB, Vinha D, Panzeri H, Nonaka T, Goncalves M. Surface Roughness of a Dental Ceramic After Polishing with Different Vehicles and Diamond Pastes. *Braz Dent J*. 2006; 17(3): 191-194.
  76. Brackett MG, Lockwood PE, Messer RL, Lewis JB, Bouillaguet S, Wataha JC. In vitro cytotoxic response to lithium disilicate dental ceramics. *Dental Materials*. 2008; 24(4): 450-456.
  77. Vojdani M, Sattari M, Khajehoseini Sh, Farzin M. Cytotoxicity of Resin-Based Cleansers: An In Vitro Study. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2010; 12(215): 158-162.
  78. Kostoryz LE, Tong YP, Chappelow CC, Eick DJ, Glaros GA, Yourtee MD. In vitro cytotoxicity of solid epoxy-based dental resins and their components. *Dental Materials*. 1999; 15(5): 363-73.
  79. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dental Materials*. 2002; 18(4): 318-323.
  80. Eick JD, Kostoryz EL, Rozzi SM, Jacobs DW, Oxman JD, Chappelow CC, Glaros AG, Yourtee DM. In vitro biocompatibility of oxirane/polyol dental composites with promising physical properties. *Dental Materials*. 2002; 18(5): 413-421.
  81. 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. *Arch Oncol*. 1994; 2: 181-184.
  82. Chaves CA, Machado AL, Carlos IZ, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Cytotoxicity of monomers, plasticizer and degradation by-products released from dental hard chairside reline resins. *Dental Materials*. 2010; 26(10): 1017-1023.
  83. Mosmann T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*. 1983; 65(1-2): 55-63.
  84. Krunić N, Nikolić Lj, Kostić M, Najman S, Nikolić V, Najdanović J. In vitro ispitivanje potencijalne toksičnosti oralno tkivnih kondicionera. *Hem Ind*. 2011; 65(6): 697-706.

85. International Standard ISO 10993–5. *Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for in vitro Cytotoxicity*. Geneva: International Organisation for Standardisation, 1999.
86. 115 Eick JD, Smith RE, Pinzino CS, Kostoryz EL. Stability of silorane dental monomers in aqueous system. *Journal of Dentistry*. 2006; 34(6): 405-410.
87. International Standard ISO 10993-10. *Biological evaluation of medical devices, Part 10: Tests for irritation and skin sensitization*. Geneva: International Organisation for Standardisation, 2010.
88. Moolenbeek C, Ruitenbergh EJ. The "Swiss roll": a simple technique for histological studies of the rodent intestine. *Lab Anim*. 1981; 15(1): 57-59.
89. Roy M, Wishe HI. Establishment of an Improved Implantation Technique for Hamster Mucous Membrane Irritation Testing. *J Dent Res*. 1986; 65(11): 1365-1370.
90. Sun Z, Sood S, Li N, Ramji D, Yang P, Newman RA, Yang CS, Chen X. Involvement of the 5-lipoxygenase/leukotriene A4 hydrolase pathway in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamster cheek pouch, and inhibition of carcinogenesis by its inhibitors. *Carcinogenesis*. 2006; 27(9): 1902-1908.
91. Anagnostou M, Chatzigianni E, Doucoudakis S. Biocompatibility of resin composites subcutaneously implanted in rats with experimentally induced arthritis. *Dental Materials*. 2009; 25(7): 863-867.
92. Onay OE, Ungor M, Ozdemir HB. In vivo evaluation of the biocompatibility of a new resin-based obturation system. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2007; 104(3): 2909-2913.
93. Ikarashi Y, Tsuchiya T, Toyoda K, Kobayashi E, Doi H, Yoneyama T, Hamanaka H. Tissue reactions and sensitivity to iron-chromium alloys. *Materials Transactions*. 2002; 43(12): 3065-3071.
94. Marković D, Kojić Z, Marinković D, Danilović V, Radovanović A, Janačković Đ. Histological and immunohistochemical evaluations of rat soft tissue response to bioceramic implants. *Acta veterinaria*. 2009; 59(2-3): 243-253.

95. Bail M, Matos Brol Meister L, Bauml Campagnoli E, Habib Jorge J, Cassia Iglesias Ban M, Sanchez-Ayala A, Hellen Campanha N. Histopathological Changes by the Use of Soft Reline Materials: A Rat Model Study. *PLoS One*. 2014; 9(6): 100293.
96. Souza PC Pedro, Aranha MF Andreza, Hebling Josimeri, Giro MA Elisa, Souza Costa ACarlos. In Vitro Cytotoxicity and In Vivo Biocompatibility of Contemporary Resin-modified Glass-ionomer Cements. *Dental Materials*. 2006; 22(9): 838-844.
97. Zafalon EJ, Versiani MA, Souza CJ, Moura CC, 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 Endodontics*. 2007; 103(5): 88-94.
98. Cassetta M, Giansanti M, Di Mambro A, Calasso S, Barbato E. Accuracy of two stereolithographic surgical templates: a retrospective study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013 Jun;15(3): 448-59.
99. Nickenig HJ, Eitner S. Reliability of implant placement after virtual planning of implant positions using cone beam CT data and surgical (guide) templates. *J Craniomaxillofac Surg*. 2007 Jun-Jul;35(4-5): 207-11. Epub 2007 Jun 18.
100. Bae MJ, Kim JY, Park JT, Cha JY, Kim HJ, Yu HS, Hwang CJ. Accuracy of miniscrew surgical guides assessed from cone-beam computed tomography and digital models. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 143(6): 893-901. doi: 10.1016/j.ajodo.2013.02.018.
101. Kim SH, Choi YS, Hwang EH, Chung KR, Kook YA, Nelson G. Surgical positioning of orthodontic mini-implants with guides fabricated on models replicated with cone-beam computed tomography. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007 Apr;131(4 Suppl):S82-9.
102. Nickenig HJ, Wichmann M, Hamel J, Schlegel KA, Eitner S. Evaluation of the difference in accuracy between implant placement by virtual planning data and surgical guide templates versus the conventional free-hand method - a combined in vivo - in vitro technique using cone-beam CT (Part II). *J Craniomaxillofac Surg*. 2010 Oct;38(7):488-93. doi: 10.1016/j.jcms.2009.10.023. Epub 2009 Nov 24.

103. 3D Systems, Inc. Material Safety Data Sheet, Material Name: Accura® ClearVue™.  
[http://www.3dsystems.com/sites/www.3dsystems.com/files/DS\\_Accura\\_Clearvue\\_US.pdf](http://www.3dsystems.com/sites/www.3dsystems.com/files/DS_Accura_Clearvue_US.pdf) [15.12.2013.].
104. Thomas R, Yumei D, Yuelong H, Le Y, Moldenaers P, Weimin Y, Czigany T, Thomas S. Miscibility, morphology, thermal, and mechanical properties of a DEGBA based epoxy resin toughened with a liquid rubber. *Polymer*. 2008; 49(1): 278-294.
105. Kostoryz LE, Smith ER, Glaros GA, Chappelow CC, Eick DJ. In vitro mutagenicity and metabolism of the cycloaliphatic epoxy Cyracure™ UVR 6105. *Mutation Research*. 2004; 563(1): 25-34.
106. Bural C, Aktaş E, Deniz G, Ünlüçerçi Y, Kızılcın 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. *Dent Mater*. 2011; 27(11): 1135-43.
107. Lützen H, Bitomsky P, Rezwan K, Hartwig A. Partially crystalline polyols lead to morphology changes and improved mechanical properties of cationically polymerized epoxy resins. *European Polymer Journal*. 2013; 49(1): 167–176.
108. Dasa G, Kalita RD, Deka H, Buragohainb AK, Karaka N. Biodegradation, cytocompatibility and performance studies of vegetable oil based hyperbranched polyurethane modified biocompatible sulfonated epoxy resin/clay nanocomposites. *Progress in Organic Coatings*. 2013; 76(7-8): 1103– 1111.
109. Ranjana Rai, Marwa Tallawi, Alexandra Grigore, Aldo R. Boccaccini. Synthesis, properties and biomedical applications of poly(glycerol sebacate) (PGS): A review. *Progress in Polymer Science*. 2012; 37(8): 1051–1078.
110. Kostić M, Najman S, Najdanović J, Krunic N, Kostić I. Primena testa direktnog kontakta u ispitivanju citotoksičnosti stomatoprotetskih akrilata. *Acta medica Medianae*. 2012; 51(1): 66-72.
111. Wellner P, Mayer W, Hickel R, Reichl FX, Durner J. Cytokine release from human leukocytes exposed to silorane- and methacrylate- based dental materials. *Dental Materials*. 2012; 28(7): 743-748.

112. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials- advantages and limitations. *J. Dent.* 1994; 22Suppl. 2: S6-S11.
113. Sun Z, Sood S, Li N, Yang P, Newman RA, Yang CS, Chen X. Chemoprevention of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamster cheek pouch by topical application of a dual inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR) and ErbB2 tyrosine kinases. *Oral Oncol.* 2008; 44(7): 652-657.
114. Huang FM., Tai KW, Hu CC, Chang YC. Cytotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro. *Int J Prosthodont.* 2001; 14(5): 439-43.
115. Liu J, Wan L, Lu X, Li S, Zhang J, Cheng J. Visualizing living fibroblast on co-cultured denture base resin by green fluorescent protein marker introduced into the cell. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2004; 21(3): 355-8.
116. Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *Journal of Prosthetic Dentistry.* 1994; 71(6): 618.
117. Hansson, S. Surface roughness parameters as predictors of anchorage strength in bone: A critical analysis. *Journal of Biomechanics.* 2000; 33(10): 1297-1303.
118. Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, Matre R. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci.* 2000; 108(1): 59-69.
119. Chen L, Suh BI. Bisphenol A in Dental Materials: A Review. *JSM Dent.* 2013; 1: 1004.
120. Julia H. Riley. *Vet Pathol.* 2007; vol. 44, 6: pp. 963-964.
121. Fournier E, Passirani C, Montero-Menei CN, Benoit JP. Biocompatibility of Implantable Synthetic Polymeric Drug Carriers Focus on Brain Biocompatibility. *Biomaterials.* 2003; 24 (19): 3311-31.