



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ  
МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

ЕРВИН Е. ТАСО

**УТИЦАЈ МАТЕРИЈАЛА ЗА ДЕНТАЛНЕ  
ИСПУНЕ АПРОКСИМАЛНИХ  
ПРЕПАРАЦИЈА НА ПАРАМЕТРЕ  
ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У  
ГИНГИВАЛНОЈ СУЛКУСНОЈ ТЕЧНОСТИ**

докторска дисертација

Крагујевац, 2020



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

ERVIN E. TASO

**INFLUENCE OF DENTAL MATERIALS FOR  
FILLINGS OF PROXIMAL PREPARATIONS  
ON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN  
GINGIVAL CREVICULAR FLUID**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2020

<b>Аутор</b>
Име и презиме: Ервин Тасо
Датум и место рођења: 05.06.1974. Панчево
Садашње запослење: Специјалиста оралне хирургије и специјалиста стоматолошке протетике, Клиника за стоматологију, Одељење за имплантологију ВМА, Београд
<b>Докторска дисертација</b>
Наслов: Утицај материјала за денталне испуне апроксималних препарата на параметре оксидативног стреса у гингивалној сулкусној течности
Број страница: 67
Број слика: 27
Број библиографских података: 111
Установа и место где је рад израђен: Клиника за стоматологију ВМА и Институт за научна истраживања ВМА, Црнотравска 17, Београд
Научна област (УДК): Орална медицина
Ментор: Проф Др, Татјана Кањевац, Ванредни професор за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија, Факултет Медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
<b>Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве теме: 17.09.2019.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-209/8 од 11.03.2020.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Проф др Марија Миловановић, Ванредни професор за ужу научну област Микробиологија и имунологија, Факултет Медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу</li> <li>2. Проф др Иванка Зелен, Ванредни професор за ужу научну област Биохемија, Факултет Медицинских наука, , Универзитет у Крагујевцу</li> <li>3. Проф др Данило Војводић, Редовни професор за ужу научну област Имунологија, Институт за медицинска истраживања Војномедицинска академија, Црнотравска 17, Београд</li> </ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
<ol style="list-style-type: none"> <li>4. Проф др Марија Миловановић, Ванредни професор за ужу научну област Микробиологија и имунологија, Факултет Медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу</li> <li>5. Проф др Иванка Зелен, Ванредни професор за ужу научну област Биохемија, Факултет Медицинских наука, , Универзитет у Крагујевцу</li> <li>6. Проф др Данило Војводић, Редовни професор за ужу научну област Имунологија, Институт за медицинска истраживања Војномедицинска академија, Црнотравска 17, Београд.</li> </ol>
Датум одбране дисертације:

## **ЗАХВАЛНИЦА**

# УТИЦАЈ МАТЕРИЈАЛА ЗА ДЕНТАЛНЕ ИСПУНЕ АПРОКСИМАЛНИХ ПРЕПАРАЦИЈА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ГИНГИВАЛНОЈ СУЛКУСНОЈ ТЕЧНОСТИ

## Скраћенице

Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	алуминијум триоксид
Amg	амалгам
BADPE-4OH	бис-(2, 3-дихидроксипропил)
BAGDA	бифенол-А-глицидил-диакрилат
BF	Beautiful
BisDMA	бифенол-А-диметакрилат
BisGMA	бифенол-А-диглицидил-диметакрилат
Cu/Zn-SOD	цитосолни SOD
DNA	дезоксирибонуклеинска киселина
DRCs	нано-хибридни композити
DRMs	дентални ресторативни материјали
DTNB	5,5-дитиобис-2-нитробензоична киселина
EDTA	етилендиаминтетраацетатна киселина
FRs	слободни радикали
GCF	гингивална цервикална течност
GIC	гласјономер цемент
GSH	глутатион
GSSG	оксидисани глутатион (дисулфидна форма)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	водоник пероксид
HEMA	2-хидроксиетилметакрилат
Hg <sup>0</sup>	жива
Hg <sup>1+</sup>	јони живе
Hg <sup>2+</sup>	јони живе
HO•	хидрокси радикал
LPO	липидна перокси оксидација
MAPK	митогени активациони протеин киназе
MDA	малонилалдехид
Mn-SOD	митохондријални SOD
NAD(P)H	никотинамид аденин динуклеотид фосфат
NF-κB	нуклеарни фактор капа Б
NO	азот оксид
NS	нитрозативни стрес
O <sub>2</sub> •-	супероксид анјон радикал

ONOO <sup>-</sup>	пероксинитратни ањон
OS	оксидативни стрес
8-OHdG	8-хидрокси-2'-деоксигуанозин
PI 3-K	фосфатидилинозитол 3- киназа
RNS	реактивне азотне врсте
ROS	реактивне кисеоничне врсте
-SH	сулфхидрилна група
SOD	супероксид дисмутаза
TBA	тиобарбитурна киселина
TBARS	произведене реактивне супстанце тиобарбитурне киселине
TEC	Tetric EvoCeram
TEGDMA	триетилен-гликол-диметакрилат
tGSH	укупан GSH
TNB	5 тиа-2-нитробензоична киселина
tSOD	укупни SOD
UEDMA	уретан-ди мета акрилат
UFA	незасићене масне киселине
ZPhC	цинк фосфатни цемент
ZPoC	цинк поликарбоксилатни цемент
BAEDM	бифенол-А-етоксилат-диметакрилат

## Сажетак

**Увод:** Биокомпатибилност денталних материјала (DRMs) може се проценити испитивањем статуса оксидативног стреса (OS) гингивалне цревикуларне течности (GCF).

Циљ ове студије био је да се утврди утицај степена денталног каријеса, позиције зуба, типа и количине примењеног ресторативног материјала (DRMs) на OS профил у GCF. У ту сврху испитивано је шест ресторативних материјала DRMs који су коришћени у третману: амалгам (Amg), композити: TetricEvoCeram (TEC) и Beautifil (BF), фосфатни цемент - цинк-фосфат (ZPhC) и поликарбоксилатни цементи - цинк поликарбоксилатни цементи (ZpoC) и глас-јономер цемент (GIC).

**Материјал и методе** Студијом је обухваћено 88 испитаника. Осим на почетку (0-ти дан), испитаници су контролисани 7-ог и 30-тог дана. Параметри оксидативног стреса нивои малондиалдехида (MDA) и глутатиона (GSH) и укупна активност супероксид дисмутазе (tSOD) су мерени пре (0-ти дан) и после третмана (7 и 30-тог дана) у GCF.

Контролни здрави зуби су позиционирани као одраз у огледалу.

**Резултати:** Дентални каријес иницира незнатан пораст OS у GCF. Примена различитих ресторативних материјала довела је до следећих ефеката (ефекти се смањују по наведеном редоследу): пораст GSH у GCF: ZpoC>BF>GIC>Amg, пораст активности tSOD: ZpoC>BF>Amg; и смањење MDA: ZpoC>ZPhC>Amg >TEC. ZpoC и ZPhC су показали највећи антиоксидативни ефекат, насупрот GIC.

**Закључак:** Рестаурације са материјалима који имају антиоксидативна својства могу да редукују болести десни инициране каријесном лезијом, што је од битне клиничке важности у стоматологији.

**Кључне речи:** каријес; параметри оксидативног стреса; гингивална сулкусна течност; дентални испун; глутатион; липидне пероксидације; супероксид дисмутаза

## **Abstract**

*Introduction:* Biocompatibility of dental materials (DMs) can be evaluated by gingival crevicular fluid (GCF) and oxidative stress (OS) status. The goal of the study was to ascertain influence of dental caries degree, teeth position and type and amount of applied DM on GCF OS profile. For this purpose we tested six DRMs that were used in one session: amalgam (Amg), composites: TetricEvoCeram (TEC) and Beautifil (BF), phosphate cement - zinc phosphate (ZPhC) and polycarboxylate cements - zinc polycarboxylate cements (ZPoC) and glass ionomer cement (GIC).

*Material and Methods:* The study included 88 dental outpatients. Follow up was scheduled on the 7th and 30th day. Oxidative stress parameters [malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels and total superoxide dismutase (tSOD)] activity were measured before (day zero) and after the treatment (7th and 30th day) in GCF. Healthy control teeth were positioned as reflection in the mirror.

*Results:* Dental caries provokes insignificant rise of OS in GCF. The DMs accomplished following effects (listed in descending order): increase of GSH in GCF: ZPoC>BF>GIC>Amg; tSOD activity increase: ZPoC>BF>Amg; and MDA decrease: ZPoC>ZPhC>Amg>TEC. ZPoC and ZPhC showed the highest antioxidant effect, contrary to GIC.

*Conclusion:* Restorations with antioxidant properties may reduce gum diseases initiated by caries lesion, which is of great clinical relevance in dentistry

**Key words:** *caries; oxidative stress parameters; oxidative stress; dental restorations; gingival crevicular fluid; glutathione; lipid peroxidation; superoxide dismutase*



# Садржај

1. УВОД .....	1
1.1 ДЕНТАЛНИ КАРИЈЕС .....	1
1.1.1 Историјат- Настанак каријеса .....	2
1.1.2 Класификација каријеса .....	2
1.2 МАТЕРИЈАЛИ ЗА ДЕНТАЛНЕ ИСПУНЕ .....	6
1.2.1 Цинк фосфатни цемент .....	6
1.2.2 Поликарбоксилатни цементи .....	7
1.2.3 Глас јономер цементи .....	7
1.2.4 Амалгам .....	8
1.2.5 Композитни испуни .....	9
1.3 ОКСИДАТИВНИ СТРЕС .....	11
1.3.1 Реактивне хемијске врсте .....	11
1.3.2 Систем антиоксидативне заштите .....	14
1.3.3 Улога оксидативног стреса у патогенези оралних обољења .....	17
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ .....	19
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....	20
3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ .....	20
3.2. ИСПИТАНИЦИ .....	20
3.3. УЗОРКОВАЊЕ ГИНГИВАЛНЕ ЦЕРВИКАЛНЕ ТЕЧНОСТИ (GCF) .....	21
3.4. ДЕНТАЛНИ РЕСТОРАТИВНИ МАТЕРИЈАЛИ-КОМПОЗИТИ .....	22
3.5. МЕРЕЊЕ МАРКЕРА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА .....	23
3.5.1. Реагенси .....	23
3.6. КЛИНИЧКИ ПАРАМЕТРИ .....	24
<i>Плак индекс (Silness-Lou)</i> .....	25
<i>Гингивални индекс</i> .....	25
<i>Индекс крварења гингиве</i> .....	25
<i>Гингивални сулкус</i> .....	25
3.7. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА .....	25
3.8. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА .....	25
4. РЕЗУЛТАТИ .....	26
4.1. РАСПОДЕЛА ИСПИТАНИКА ПРЕМА BLACK'S И DRMs КРИТЕРИЈУМИМА	
26	
4.2. УТИЦАЈ СТЕПЕНА КАРИЈЕСА НА ПАРАМЕТРЕ ОС У GCF .....	29

4.3. УТИЦАЈ ДЕНТАЛНИХ МАТЕРИЈАЛА НА ПАРАМЕТРЕ OS У GCF .....	34
5. ДИСКУСИЈА .....	46
5.1. КАРИЈЕС И OS .....	47
5.2. КАРИЈЕС И SOD, O <sub>2</sub> • <sup>-</sup> , LPO .....	48
5.3. КАРИЈЕС И GSH .....	49
5.4. ДЕНТАЛНИ МАТЕРИЈАЛИ .....	50
5.5. ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И ДЕНТАЛНИ МАТЕРИЈАЛИ .....	50
5.6. ТОКСИЧНОСТ DRCS И ОКСИДАТИВНИ СТРЕС .....	51
5.7. ЕФЕКАТ ДЕНТАЛНИХ МАТЕРИЈАЛА НА GSH .....	53
5.8. ЕФЕКАТ ДЕНТАЛНИХ МАТЕРИЈАЛА НА SOD .....	53
5.9. ЕФЕКАТ ДЕНТАЛНИХ МАТЕРИЈАЛА НА LPO .....	54
6. ЗАКЉУЧЦИ .....	56
7. ЛИТЕРАТУРА .....	58

# 1. УВОД

## 1.1 ДЕНТАЛНИ КАРИЈЕС

Дентални каријес је бактеријско обољење тврдих ткива зуба које се манифестује као локални имунски одговор ткива зуба на инвазију патогена. Настаје као последица метаболичке активности оралних микроорганизама денталног плака (1). Значајан је и утицај међусобног деловања каузалних и предиспонирајућих фактора.

За настанак денталног каријеса, као мултикаузалног обољења, описани су различити фактори који се у основи могу поделити на опште и локалне. Општи фактори који се најчешће наводе као узрочници каријеса су:

1. исхрана богата угљеним хидратима

2. наследни фактори

3. одређена обољења која доводе до пада одбрамбених снага организма

Каријес је резултат интеракције кариогене флоре усне дупље, ферментабилних угљених хидрата као и специфичних и неспецифичних фактора одбране (2). Одређена обољења која доводе до пада одбрамбених снага организма умногоме утичу на развој каријеса. Исхрана богата угљеним хидратима доводи до њихове ферментације при чему настају киселински продукти, превасходно млечна и пропионска киселина које деминерализују глеђ и отварају пут ширења каријесног процеса. Намирнице дефицитарне минералима као што су калцијум и фосфор неповољно утичу и доводе до слабије минерализације чврстих зубних ткива (3).

Локални фактори који доводе до каријеса могу бити:

1. састав и квалитет сливе

2. врста микроорганизама усне дупље и њихова заступљеност

3. лоша хигијена или неправилна техника одржавања зуба

4. јатрогени фактори

Смањена продукција и лучење сливе утичу негативно на њену протективну улогу и ефекат физиолошког самочишћења зуба. У тим околностима се повећава вискозност сливе која постаје густа и лепљива, рН вредност јој се смањује, што ствара повољне услове за развој каријеса. Кариогене бактерије из денталног плака ферментују угљене хидрате из хране и стварају органске киселине млечну и пропионску (4). Познато је да лоша хигијена или неправилно примењена техника одржавања зуба олакшава и убрзава акумулацију денталног плака, што такође доприноси развоју каријеса.

Показано је да концентрације појединих цитокина и/или реактивних азотних једињења (енгл. *Reactive nitrogen species*, RNS), првенствено азотних оксида (NOx), прецизно одражавају интензитет локалног запаљења (5).

### 1.1.1 Историјат- Настанак каријеса

Постоје различите теорије о настанку каријеса у којима се за узрок настанка каријеса разматрају дефекти у зубном ткиву, док други узрок виде у предиспонирајућим локалним факторима средине. Различито се тумаче и места одговорна за настанак каријеса, па по једном схватању каријес започиње у органском матриксу глеђи, а по другом у неорганском делу.

Теорије настанка каријеса се деле на егзогене и ендогене (6).

*Егзогене* теорије настанка каријеса базирају се на егзогеним факторима: микроорганизмима и њиховим ензимима, на исхрани богатој угљеним хидратима (Ацидогена теорија- Fosdick Nutshinson и Miler, Теорија хелата и Паразитарна алкална теорија).

*Ендогене* теорије настанка каријеса базирају се на ендогеним факторима: дисбалансу ћелија одонтобласта и трофичних промена у њима, оштећењу глеђи и дентина, акумулацији гликогена у денталном ткиву, утицају биофизичких фактора, разградњи колагена (Неуротрофична теорија, Хипотеза фосфата, Теорија гликогена, Органотропна теорија, Биофизичка теорија, Трофобактеријска теорија).

### Каријес предилекциона места

На основу клиничког искуства запажа се да су неке позиције на зубу више захваћене каријесом од других и оне се називају каријес предилекционим местима. Односе се на:

- фисуре и јамице на гризним површинама преткутњака и кутњака- у њима долази до ретенције хране и лучење ензима бактерија које доводе до деструкције глеђи и дентина
- букалне површине доњих и горњих кутњака које су изложене притисцима мастикаторних сила као и на њихове лингвалне површине
- апроксималне површине круничног дела зуба које су због отежаног чишћења подложније акумулацији бактерија
- гингивална трећина вестибуларне површине круничног дела зуба, које се још назива и врат зуба због експонираности површина у усној дупљи.

### 1.1.2 Класификација каријеса

С обзиром да је каријес једно од рано проучаваних и најраспрострањенијих обољења у људској популацији, разумљиво је што постоје његове бројне класификације (7), према:

- локализацији самог каријеса
- начину ширења
- удаљености каријеса од зубне пулпе (зубног нерва)
- времену настанка каријеса (да ли се јавља први пут или се поновио)
- локацији каријеса у односу на структуре које сачињавају зуб.

### ***Подела према локацији каријесне лезије***

Black је поставио критеријуме где је поделио каријес на пет класа у односу на саму локацију захваћеног ткива и кавитет који је настао уклањањем те каријесне лезије да би се дошло до здравог ткива (7). Black-ове класе каријеса су:

1. каријеси на гризним површинама кутњака и преткутњака, букалним усецима и јамицама доњих и горњих кутњака и унутрашњим (оралним) површинама горњих секутића и то најчешће латералних
2. каријеси мезијалних и дисталних (апроксималних) површина преткутњака и кутњака
3. каријеси апроксималних површина предњих зуба
4. каријеси апроксималних површина предњих зуба, као код претходне класе, са тим да је каријесом захваћен и инцизални угао. Овакво оштећење зуба може бити и последица трауме
5. каријеси на гинвалној трећини вестибуларне и оралне површине свих зуба у горњој и доњој вилици (8).

Оригиналној Black -овој класификацији, у скорије време је додата и шеста класа, која се односи на каријес на атипичним или каријес имуним местима као што су квржице инцизалне трећине секутића (7).

### ***Према брзини еволуције каријесне лезије***

Према брзини еволуције, каријес се дели на акутни и хронични.

### ***Према појавности каријесне лезије***

Према појавности, каријес се дели на примарни каријес (први пут се јавља), секундарн каријес (каријесна лезија се јавља на претходно санираном зубу око испуна) и рецидивни каријес (настаје због непопуног одстрањивања каријесне лезије током претходне стоматолошке интервенције).

### ***Према начину ширења каријесне лезије***

Према начину ширења, каријес се дели на онај који напредује у ширину, брзо угрожава пулпу и подминира глеђне призме – подминирајући и на пенетрирајући каријес који брзо напредује у дубину према зубној пулпи.

### ***Према близини каријесног процеса зубној пулпи***

Према близини каријесног процеса зубној пулпи, разликујемо површни каријес или каријес суперфицијалис (лат. *caries superficialis*), који захвата само површни део зуба, односно глеђ; каријес медија (лат. *caries mediae*), који је захвата и део дентина; и најтежи

облик каријес профунда или дубоки каријес (лат. *caries profunda*), када је каријесна лезија уз зубну пулпу.

Према Rebel-у, каријес профунда се даље разврстава на каријес профунда симплекс (лат. *caries profunda simplex*) - где се лезија сасвим приближила пулпи али још постоји чврсти слој здравог дентин и каријес профунда компликата (лат. *caries profunda complicata*) где се за разлику од *caries profunda simplex* уочава размекшали слој дентина који је остао да штити пулпу од отварања и чијим би уклањањем пулпа била експонирана (9)..

### **Према локализацији каријеса у односу на структурне елементе зуба**

Разликујемо каријес глеђи, каријес дентина и каријес цемента.

**Глеђ** је ткиво које је у целом људском организму највише минерализовано и сачињено је од око: 85 % минералних материја, 12 % воде и 3 % органског матрикса (9). Чине је глеђне призме између којих је интерпризматична супстанца. Има велику транспаренцију и у потпуности покрива дентин зуба са варијацијама у правцу пружања и броју глеђних призми. Дебљина глеђи варира и најдебља је на квржицама кутњака и на сечивној ивици секутића, а најтања у вратном делу зуба где се њене призме протежу до глеђно дентинске границе. Неорганску компоненту глеђних призми чини хидроксиапатит и трикалцијум хидрокси фосфат У малим количинама се детектују и магнезијум карбонат, хлориди, флуориди и сулфити. Површински део глеђних призми садржи у великој мери кератин. Органски део глеђи богат је гликопротеинима и протеогликанима.

Сам почетак каријеса се запажа као беличасто замућење глеђи услед промена у структури кристала хидроксиапатита. Оптички феномен се објашњава чињеницом да тада долази до преламања светлосних зракова другачије него што је то код здраве, интактне глеђи. У овој фази се може и зауставити даље напредовање лезије ако пацијент побољша одржавање оралне хигијене, локално добија препарате флуора или уноси храну која минимално утиче на стварање каријеса, придржавајући се хигијенско-дијететског режима. Такође у овој фази, минерали из плака и саливе дифундују кроз глеђ и утичу на поновну реминерализацију деминерализованих глеђних призми. Уколико се поремети хомеостазни механизам постојећа деминерализација превлада над започетом реминерализацијом и долази до прогресије каријесне лезије.

Gustafson је класификовао зоне каријесног процеса, идући од дентина према површном слоју глеђи при чему испод последње зоне дегенерације постоји здрав дентин.

**Дентин** даје зубу чврстину и еластичност који му помажу да се одупре jakim силама које генеришу мастикаторни мишићи и траумама код непредвидљивих утицаја разноврсних сила које се могу стећи у овом подручју.

Каријес најчешће почиње у глеђи а у дентину врло ретко и то у случајевима када дође до његовог експонирања после абразије зуба или код урођених дефеката глеђи. Дентинска структура садржи више минералних материја од цемента и кости а мање од глеђи. Тако, 70% чини неорганска компонента, 18% органска са око 12% воде. Неорганску компоненту чине кристали хидроксиапатита, карбонати, калцијум фосфати и у траговима се детектују F<sup>-</sup> (флуориди), Cu (бакар), Zn (цинк), Fe (гвожђе)(10). Колагени, минерализовани матрикс и целуларни део који је смештен у дентинским каналићима чине органске компоненте дентина. У међусобно паралелним дентинским каналићима

налазе се *Tomes*-ова влакна, која су цитоплазматични продужеци одонтобласта. Одонтобласти су мултифункционалне ћелије чија је основна функција стварање и одржавање дентина, али активно учествују у одбрани организма. Код надражаја, рецептори одонтобласта активирају имунски систем и долази до појачане секреције проинфламаторних цитокина и хемокина. Одонтобласти ослобађају антимикробне пептиде који делују на грам (+) и грам (-) бактерије.

На хистолошком пресеку дентина уочава се интертубуларни дентин, спољашњи хипоминаерализовани слој перитубуларног дентина, унутрашњи хипоминаерализовани слој и цитоплазматски наставци одонтобласта. Надражаји који делују на експонирани дентин преносе се преко великог броја влакана до пулпе. Кретање материје кроз дентинске тубуле у виду честица и макромолекула може да се одиграва и у супротном смеру, од пулпе према спољној средини. Флуиди из пулпе могу да уђу у тубуле носећи са собом протеине плазме који могу имати антимикробна својства (11).

**Цемент** покрива анатомски корен зуба и са око 50% минералних материја представља најслабије минерализовано тврдо зубно ткиво. Врло је мале дебљине у пределу врата зуба и његов однос према глеђи може бити тројак: покривање глеђи, додир са глеђи и без контакта са глеђи.

Цементогенеза, процес продукције цементног ткива, траје током целог живота. У односу на састав и генезу, цемент је подељен на примарни, секундарни и терцијарни. Примарни или ацелуларни цемент садржи бројна колагена влакна, а продукован је од стране цементабласта током формирања корена зуба.

Секундарни цемент се назива још и остеоцемент због сличности са костима. Његова локација је у апексној трећини корена.

Терцијарни цемент није физиолошки термин већ се његов настанак везује за хроничне надражаје или цементогена зарастања после стоматолошких интервенција као што је ресекција корена зуба.

Код каријесне лезије цемента долази до деминерализације његове неорганске компоненте, а у органском делу долази до протеолизе.

Пулподентински комплекс чини пулпа заједно са градивним чиниоцима зуба (глеђ, дентин и цемент) и он је тако анатомски формиран да заштити зуб од микроорганизама и њихових продуката. Дентин садржи тубуле који имају и улогу филтра и има значајну улогу код имунског одговора пулпе. Најчешћа два механизма су:

1. Управљање периферним током дентинског флуида
2. Апсорпција бактерија и њихових макромолекула на унутрашње зидове дентинских каналића.

Овим механизмима дентин регулише продор штетних елемената ка пулпи омогућавајући јој да припреми адекватан имунски одговор. Ћелије које започињу имунски одговор су одонтобласти, имунске ћелије (макрофаги, Т лимфоцити), нерви и крвни судови.

Постоје две врсте антиген презентујућих ћелија (АПС, енгл. *Antigen presenting cells*), дендритске и ћелије моноцитно-макрофагне лозе. Обе имају молекуле класе МНС-II (енгл. *Major Histocompatibility Complex, type II*) које имају способност стварања антигена и стимулишу активност Т-ћелија, како локално, тако и у регионалним лимфним жлездама.

Дендритске ћелије су локализоване на ободу пулпе где преко сопствених цитоплазматичних продужетака комуницирају са одонтобластима (ћелије имунског пулпног одговора) и тако их обавештавају о присуству патогена. Одонтобласти су у незрелом стању без претходног контакта са патогеном и сазревају након контакта са антигеном (патогеном) и тада активирају Т-ћелије, које до тада нису биле експонирани одређеном антигену. Након матурације одонтобласти мигрирају у регионалне лимфне чворове.

Макрофаги се налазе у ткиву пулпе и формирају мрежни систем са дендритским ћелијама пулпе. Они могу реаговати са локалним антигенима. Макрофаги које немају МНС-II су лоцирани периваскуларно и главна улога им је фагоцитоза.

## 1.2 МАТЕРИЈАЛИ ЗА ДЕНТАЛНЕ ИСПУНЕ

Примена денталних материјала је неопходна у анатомској, функционалној и естетској рестаурацији денталних површина захваћених каријесом. Избор материјала за денталне испуне је важан корак за процес рестаурације зуба. Тако је својство глас јономер цемента који има способност отпуштања јона флуорида што је важно због спречавања формирања секундарног каријеса. допринело честој употреби GJC у рестаурацијама као и за подлогу испод композитних испуна, нарочито на бочним зубима.

Истраживањима је показано да отпуштање флуорида из глас јономер цемената може имати и цитотоксични ефекат на пулпу (12,13). За директне рестауративне процедуре користе се бројни дентални материјали, разноврсни по физичко-хемијским, биолошким и естетским карактеристикама (10).

### 1.2.1 Цинк фосфатни цемент

Ово је један од најстаријих материјала који се користи у стоматологији. Двокомпонентан је и састоји се од праха и течности. Главна компонента праха је цинк-оксид ( $ZnO$ ) 90%, магнезијум оксид ( $MgO$ ) чини преосталих 9% (повећава чврстоћу на притисак и учествује у процесу хидратације за време везивања цемента), а око 1% чине оксиди, као што су силицијум диоксид ( $SiO_2$ ), калцијум оксид ( $CaO$ ), бизмут триоксид ( $Bi_2O_3$ ), алуминијум триоксид ( $Al_2O_3$ ), а понекад се додају и  $F^-$ -једињења. Течну компоненту цинк фосфатног цемента чини водени раствор 30-40% ортофосфорне киселине ( $H_3PO_4$ ), са додацима алуминијум фосфата ( $AlPO_4$ ) и цинк фосфата [ $Zn_3(PO_4)_2$ ], који представљају пуферску компоненту. Реакцијом везивања ствара се растворљиви примарни цинк фосфат, затим секундарни и на крају терцијарни нерастворљиви цинк фосфатни цемент. Треба напоменути да је процес егзотерман и да долази и до контракције цемента. Приликом везивања са зубним ткивима ови цементи могу остваривати чисто механичку везу или се површина зуба може третирати растворима натријум флуорида ( $NaF$ ) или суспензијом калцијум хидроксида [ $Ca(OH)_2$ ]. Такође се може користити флуоридни раствор [који садржи и флуорид калаја ( $SnF_2$ ) који са денталним каријесом ствара  $Sn_3F_3PO_4$ , калцијум флуорид ( $CaF$ ) и флуороапатит.

Минимална чврстоћа на притисак цинк фосфатног цемента након 24 часа износи око 70



MPa, док се половина ове вредности постиже након 1-1,5 часа. Тврдоћа ових цемената је мала.

### ***Биолошке особине цинк фосфатних цемената***

Ова кисела једињења имају веома низак рН, што се приписује остацима слободне фосфорне киселине након мешања праха и течности. Испитивањима је показано да се испод свеже апликованог цемента у дентинским каналићима, након 24 часа могу појавити једра одонтобласта и еритроцити. У пулпи тада настаје хиперемичка и крварење. Ако не дође до даље прогресије ових симптома, након 2-4 месеца запажамо терцијарни дентин (11).

### **1.2.2 Поликарбоксилатни цемент**

То су једнокомпонентни материјали (прах) који се мешају са водом или двокомпонентни цемент (у облику праха и течности).

Код једнокомпонентних поликарбоксилатних цемената вода се меша са прашкастом делом коју чини замрзнута и осушена полиакрилна киселина и ZnO.

Код двокомпонентних система, друга група ових материјала, прах чине ZnO, MgO и могу да садрже мање количине SnF<sub>2</sub> (има улогу пуниоца) и Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (испољава антикариогени ефекат), а раствор полиакрилне киселине чини течну компоненту (40%), и она има способност хелатације односно везивања јона метала. Приликом мешања две компоненте прво долази до везивања полиакрилне киселине са ZnO реакцијом неутрализације при чему преостали јони цинка (Zn<sup>2+</sup>) улазе у другу фазу везивања за слободне карбоксилне групе [(CO<sub>3</sub>)<sup>2-</sup>] што представља процес хелатизације. Чврстоћа на притисак је као код цинк фосфатних цемената, те се користи за привремене испуне. Адхезија за зубну структуру је хемијска и остварује се због афинитета (CO<sub>3</sub>)<sup>2-</sup> полиакрилних ланаца да формирају водоничне (H<sup>+</sup>) везе са супстратом. Касније, ове везе се замењују јонским везама између јона калцијума (Ca<sup>2+</sup>) и (CO<sub>3</sub>)<sup>2-</sup> полиакрилних ланаца полиакрилне киселине (10).

### ***Биолошке особине***

То су биокомпатибилни материјали и на пулпу делују биолошки, не изазивајући реакције, услед тога што полиакрилна киселина реагује са протеинима и споро дифундује кроз дентинске каналиће, због велике молекулске масе и дугих ланаца.

### **1.2.3 Глас јономер цемент**

Глас јономерни цемент (GJC) су двокомпонентни системи где се прах меша са одговарајућом течносту или са водом.

Праш се састоји од честица флуоралумосиликатног стакла који у воденом раствору киселине ослобађа јоне калцијума (Ca<sup>2+</sup>), алуминијума (Al<sup>3+</sup>), стронцијума (Sr<sup>2+</sup>), лантана (La<sup>3+</sup>) или цинка (Zn<sup>2+</sup>). Течну компоненту чини полиакрилна киселина која садржи

полимер и кополимер акрилне, малеичне, итаконске и винилфосфоноичне киселине. Код глас јономера где се прах меша са водом, прах чини смрзнута, осушена поликиселина која се меша са дестилованом водом.

Почетак реакције је разградња флуоралумосиликатног стакла уз ослобађање јона  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$  и  $\text{Al}^{3+}$  који реагују са полианјонима киселина и граде гел матрикс. У првих неколико часова  $\text{Ca}^{2+}$  се везују за поликарбоксилатне ланце, док се у секундарном стадијуму у реакцију укључују  $\text{Al}^{3+}$ . Нерастворљиве соли формирају  $(\text{PO}_4)^{3-}$  и  $\text{F}^-$ , а јони натријума ( $\text{Na}^+$ ) граде силицујомов гел. Новонастало једињење има структуру комплексног композита. Чврстоћа GJC је велика и повећава се са временом (до годину дана). Адхезија за зубну структуру је хемијска и одвија се везивањем полиакрилата са глеђним хидриоксиапатитом уместо површинских  $(\text{PO}_4)^{3-}$ , и измењује се са  $\text{Ca}^{2+}$  који напуштају ћелију, путем јонске измене (10).

### **Биолошке особине**

Осим што су биокампаибилни, GJC могу деловати бактеростатски а и бактерицидно, ослобађајући NaF. Објашњења овог деловања је да GJC отежава адхезију плака на глеђ и да чак може мењати метаболизам угљених хидрата а тиме и структуру самог бактеријског плака. Ослобађање NaF који не улази у састав цементног матрикса не утиче на механичка својства GJC(12). Приликом апликације може се јавити осетљивост зубне пулпе на надражаје што се објашњава ниским почетним рН при иницијалном везивању. У условима нормалне влажности GJC имају блажу контракцију након везивања од осталих претходно наведених денталних цемената, тако да се могу користити и као условно трајни испуни (нарочито код деце у млечној дентицији).

### **1.2.4 Амалгам**

Амалгам је по дефиницији легура живе (Hg), јединог метала који се налази у течном стању, са једним или више метала. У стоматологији амалгами се односе на среброкалајну легуру са ниским садржајем бакра (Cu), мешану легуру или једноставну легуру које имају висок садржај Cu. Процес стварања легуре је вишефазни процес (од три фазе: алфа, бета и гама). Алфа и бета фазе су чврсти раствори Sn и Ag у различитим односима док је трећа гама фаза, интерметално једињење  $\text{Ag}_3\text{Sn}$ . Удеои однос елмената легуре у алфа фази није оштро разграничен за разлику од треће фазе где је састав следећи: 73% Ag и 27% Sn. Легуру сачињавају сребро (Ag), калај (Sn), бакар (Cu), цинк (Zn) и жива (Hg) (10).

#### **- сребро калај легуре-**

Сребро је основни елемент гама фазе и има улогу да поспешује реакцију са Hg и омогућава већу чврстоћу легуре. Калај контролише брзину реакције између Ag и Hg, како би експанзија била оптимална. Бакар такође доводи до бољих механичких особина. Цинк има улогу антиоксиданса (састојак је неких антиоксидантних металоензима, попут супероксидине дизмутазе). У процесу преамалгације врло мала количине живе се додаје у виду облоге легури да би се олакшало везивање са већом количином живе.

### **- мешане амалгамске легуре-**

Настаје мешањем Ag-Sn легуре са дисперзијом Ag-Cu легуре, а тако добијени дентални амалгами су јачи од претходне групе.

### **-једноставне амагамске легуре-**

Састоје се од хомогеног праха који у себи садржи Ag, Sn и Cu.

#### ***Особине амалгама:***

Чврстоћа амалгама је велика и износи 60 МПа. Највећу чврстоћу достиже после седам дана. Код амалгама долази до заравњења испуна после неколико година услед константне силе која делује на њега, а тај феномен се одређује такозваним степеном пузања. Такође, услед дејства фактора оралне средине и распаднутих продуката хране током година може доћи до корозије амалгама и тамњења површине амалгамске легуре (услед стварања тамних сулфида Ag (AgS) и Hg (HgS) (10).

#### ***Биолошке особине***

Као и остали материјали за денталне испуне, амалгами су изложени различитим реакцијама под дејством хемијских, биолошких и механичких фактора у оралној средини. Услед ових реакција дентални амалгамски испуни мењају облик и својства. Корозија услед хемијских и електрохемијских реакција оштећује површински и слој испод површине испуна тако да испун постаје подложнији трошењу.

Електролизом Sn<sub>8</sub>Hg ослобађају се јони живе која реагује са честицама гама фазе (Ag<sub>3</sub>Sn) и ствара нову гама фазу, док се калај спаја са кисеоником и хлоридним јонима и ствара корозивна једињења. Преостала жива доводи до меркуроскопске експанзије испуна. Овај прогресивни постепени процес изазива микрупукотине у облику латиничног слова V, што ствара повољне услове за депоновање плака и настајање секундарног каријеса а касније и пулпитиса. Често се ствара и ивична пукотина која је чешћа код конвенционалних него код *non-gama 2* амалгама, који у себи садрже изванредан проценат цинка који спречава корозију. Ретроспективно истраживање успеха рестаурације амалгамом је показало да се централне пукотине јављају код 4,3% испуна, а маргиналне код 1,3% (13).

### **1.2.5 Композитни испуни**

Композити су материјали који су у данашње време нашли примену у разним индустријским делатностима. Дентални композити су комбинација полимера и керамике. Матрикс (органички део) чини полимер који је мекан и подложен пластичној деформацији, а пунило (керамика-неорганички део) има велику чврстоћу и кртост.

### **1.2.5.1 Матрикс**

Полимер садржи модификони акрилат-метаакрилат у облику мономера од којих је најзаступљенији Bis-GMA (бис-фенол глицидил метаакрилат). Такође садржи бензеново језгро које Bis-GMA даје тврдоћу и отпорност на савијање, чиме се композитном материјалу побољшавају механичка својства. Секундарне хидроксилне групе ( $\text{CH}(\text{OH})\text{C}\equiv$ ) код композита омогућавају стварање интермолекуларних водоничних веза са ОН групама глеђног хидроксиапатита, што значајно појачава адхезивност.

### **1.2.5.2 Пунило-керамика**

Пунило побољшава механичке особине матрикса и естетски ефекат. Може да садржи кварц, силикате, керамички прах, хидроксиапатит и стакло. Композити су једнокомпонентни системи који садрже мономер, комономер, пунило, средство за везивање и иницијатор који се активира помоћу ултраљубичасте светлости.

Према особинама пунила (пунилаца) је и извршена подела на:

- композите са макропунилом (крупније честице пунила)
- савремени композите са мањим честицама (микропунилом) – чине структуру хомогенијом и мање храпавом
- хибридне композите са макропунилом (75%) – обезбеђују одличне механичке особине и микропунилом (7%) и омогућавају глатку површину која се може и полирати.

Полимеризација композита подразумева фотохемијску реакцију, где је активатор реакције UV (ултраљубичаста) светлост емитована из посебне лампе. Недостаци полимеризације су разни а најпроблематичнија је мала дубина продирања UV зрака и ретракција композита која настаје у процесу полимеризације.

Пре него што се полимеризују, мономери су повезани слабиим водоничним везама. Процес полимеризације композитних материјала је заправо активирање фотоиницијатора када се стварају слободни радикали и долази до повезивања мономера у ланце кополимера и полимера. Постоје две врсте за полимеризацију светлосно активирајућег материјала: светлосни извори који продукују белу светлост која се затим специјалним филтерима трансформише у светлост плаве боје. Извори ове светлости су халогене лампе. Другу групу чине аргонски ласери и диоде који стварају плаву светлост видљивог дела спектра.

Механичке особине денталних композита зависе од врсте и заступљености пунила, способности повезивања са матриксом и порозности очврслог материјала.

### **Биокомпатибилност композита**

Композити су биокомпатибилни материјали који су нерастворљиви у оралној средини. Не изазивају инфламацију пулпе, али се препоручује да се пре њих апликује слој (цемента, најчешће GIC) који пружа како хемијску, тако и термичку заштиту.

Адхезија композита за зубну површину је микромеханичка и доста је слаба, тако да се површина зуба треба припремити. Ради се нагризање зубне површине (кондиционирање)

благом ортофосфорном киселином, потом се испира водом и суши, онда се наноси силан (лепак) и на крају се полимеризује. Овај поступак нагризања се препоручује за глеђ али не увек и за дентин, због потенцијалног угрожавања интегритета зубне пулпе. Таквим поступком добијамо оптималну површину ради ретенције композитног испуна који ће одолевати мастикаторним силама.

### 1.3 ОКСИДАТИВНИ СТРЕС

Оксидативни стрес (енгл. *Oxidative Stress*, OS) је дефинисао Helmut Sies као физиолошки поремећај у коме превагу имају реактивне хемијске кисеоничне врсте (енгл. *Reactive Oxygen Species*, ROS) над антиоксидантном системом, услед чега долази до оксидативног оштећења битних ћелијских макромолекула (протеина, липида, угљених хидрата и хроматинског материјала), утршка редукционих еквивалената, измењене ћелијске сигнализације, утршка енергије и на крају смрти ћелије апоптозом (14).

Реакције реактивних хемијских слободно-радикалских или нерадикалских врста са различитим биомолекулима представљају функционално и временски условљене патогенетске процесе који доводе до оксидативног стреса ћелије/ткива/органа, сложеног каскадног процеса који је удружен са бројним патолошким стањима (15,16).

У нормалним условима постоји хомеостаза између антиоксиданаса и (про) оксиданса, док је у патофизиолошким условима овај динамички баланс нарушен у корист реактивних врста (14).

Као што повећана продукција ROS (нпр. у инфламаторним реакцијама) или њихово неадекватно неутралисање (уклањање метаболичким реакцијама катализованих антиоксидантним ензимима или у директним реакцијама са антиоксидансима, тј. редукционим агенсима) доводе до оксидативног стреса, тако аналогно томе, превага реактивних азотових хемијских врста (енгл. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) доводи до нитрозативног стреса (енгл. *Nitrosative Stress*, NS).

Најчешће се паралелно одвијају ова два патофизиолошка процеса, те се говори о оксидационо-нитрозативном стресу (енгл. *Oxidative-Nitrosative Stress*, ONS) (17).

#### 1.3.1 Реактивне хемијске врсте

Поремећај прооксидационо-антиоксидационе равнотеже представља озбиљно нарушен баланс између продукције реактивних врста кисеоника ROS, азота RNS и хлора RCS са једне стране и антиоксидативне заштите са друге стране.

Реактивне врсте кисеоника (слободни радикали) настају при редукцији молекулског кисеоника мањим бројем електрона и они су токсични међупроизводи. Реагују са основним ћелијским молекулима и биоструктурама (18) и уколико преовладају у организму долази до оксидативног стреса.

Реактивне хемијске врсте су једињења органског или неорганског порекла које обухватају све класе једињења електрофилног карактера високе реактивности. У зависности од активног центра деле се на реактивне врсте са кисеоником ROS (*reactive oxygen species*), реактивне врсте азота RNS (*reactive nitrogen species*), реактивне врсте

хлора RCS (reactive chlorine species), реактивне врсте брома RBS и реактивне врсте сумпора RSS (14,19). Реактивност слободних радикала директно је везана за њихову стабилност, што су нестабилнији краћи им је је циклус и обрнуто. Тежећи да спаре неспарене електроне, отпочињу ланац радикалских реакција где се развија оксидативни или нитрозативни стрес (14).

Познато је да су ROS производи нормалног метаболизма ћелије и ћелијског дисања које се одвија у митохондријама. Продукција кисеоничних радикала у организму одвија се у низу катаболичких и анаболичких процеса: у респираторном ланцу, оксидацијом ћелијских биомолекула, дејством ензима, дејством двовалентних металних јона.

У сваком организму, регулаторни биохемијски процеси подразумевају реакције оксидације које су важне за многобројне биолошке процесе. У нормалним условима, ROS бивају неутралисане антиоксидатним системом, али у неконтролисаним (патолошко-физиолошким) условима, услед повећане продукције или недовољне ефикасности система антиоксидативне заштите развија се OS (20).

У условима ниских концентрација, ROS регулишу сигналне путеве унутар ћелије и између ћелија. Поред сигналне трансдукције, слободни радикали могу да мењају експресију гена и тиме доприносе развоју патолошких стања организма (17).

У повишеној концентрацији слободни радикали оксидативно модификују ћелијске и екстраћелијске биомолекуле као што су протеини, угљени хидрати, DNA, липиди (21). Најзначајнији слободно-радикалски представници ROS су  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$ , пероксил радикал ( $ROO^{\cdot}$ ), алкоксил радикал ( $RO^{\cdot}$ ), хидропероксил радикал ( $HOO^{\cdot}$ ), а од нерадикалских врста  $H_2O_2$ , хипохлорна киселина ( $HClO_4$ ), озон ( $O_3$ ). Настанак слободних радикала у ћелијама је везан за различите процесе у спољашњој средини (UV, јонизујуће и топлотно зрачење) као и за процесе у самој ћелији: оксидативна фосфорилација (у митохондријама), оксидативна хидроксилација (у микрозомима), фагоцитоза, каталитичке реакције неких ензима (оксидаза), процесе липидне пероксидације и др. Они оштећују ћелијске структуре а оштећење генетског материјала може довести и до малигних трансформација (18).

### 1.3.1.1 Стварање слободних кисеоничних радикала

Најзначајнији извор стварања ROS је процес ћелијског дисања, оксидативне фосфорилације у митохондријама. Међутим, ROS могу настати и под дејством спољашњих утицаја загађења ваздуха, дуванског дима, радијације али и као последица метаболизма бројних лекова, пестицида (19).

Током митохондријалног ћелијског дисања одвија се четвороелектронска редукција молекуларног кисеоника ( $O_2$ ) до воде ( $H_2O$ ), а ослобођена енергија се користи за синтезу аденозин трифосфата (ATP). У организму, 90%  $O_2$  доспева у митохондрије, а од тога 2% не подлеже потпуној редукцији до  $H_2O$ , учествујући у стварању ROS (15).

Супероксид анјон радикал се ствара и у реакцији фагоцита током инфламације. Хипероксигенација ткива доводи до повећаног стварања реактивних кисеоничних врста, нарочито  $HO^{\cdot}$ .

Водоник пероксид је најстабилнији интермедијарни продукт редукције  $O_2$ , али његовом хемолитичком разградњом настају два  $HO^{\cdot}$ , који су уједно и кључни носиоци његове

токсичности. Водоник пероксид настаје и током аутоокидације  $O_2^{\cdot-}$  посредством антиоксидативног ензима супероксид дизмутазе. Ћелијске органеле пероксизоми су главно место стварања  $H_2O_2$  у ћелији.

Каталаза, антиоксидативни ензим, разлаже  $H_2O_2$  до  $H_2O$  и  $O_2$  и на тај начин смањује његову токсичност.  $H_2O_2$  оксидише сулфидрилне група протеина, али нема потенцијал да отпочне процес оксидативног оштећења липида, тзв. липидну пероксидацију, као што не може ни  $O_2^{\cdot-}$ , за разлику од  $HO^{\cdot}$  и протоноване форме  $O_2^{\cdot-}$  ( $HO_2^{\cdot-}$ ). У *Fenton* реакцији,  $H_2O_2$  са јонима прелазних метала (оних који имају више оксидационих нивоа валентиних стања) нижих валентних стања, производи  $HO^{\cdot}$ , који је уједно најпотентнији слободни кисеонични радикал. У ситуацијама када дође до оштећења пероксизома, велики део  $H_2O_2$  се ослобађа у цитоплазму, индукујући стање OS у ћелији (21).

Пероксил радикали су секундарни ROS, настали процесом липидне пероксидације у живим системима.

### 1.3.1.2 Стварање азотних слободних радикала

Реактивне врсте азота су медијатори NS (22). У физиолошким условима азот моноксид (NO) контролише различите ћелијске процесе: регулише тонус крвних судова, тонус глатких и попречно пругастих мишића, смањује адхезију и агрегацију тромбоцита, регулише неуроендокрину регулацију; бол, сан, глад (23). Као неуротрансмитер у имунском систему модулира цитотоксичност макрофага. С обзиром да NO постоји у неколико хемијских форми има широк спектар дејства и биолошких функција.

Под одређеним условима може учествовати и у патофизиолошким процесима.

Азот моноксид може да изазове али и да спречи апоптозу у зависности од типа ћелија, нивоа стреса, редокс стања и хемијске форме самог NO као и од способности ћелије да неутралише створене слободне радикале (24). У спонтаној реакцији између  $O_2^{\cdot-}$  и NO радикала ( $NO^{\cdot}$ ) гради се веома реактивни пероксинитритни анјон и/или радикал ( $HNOO^{\cdot}$   $HNOO^{\cdot}$ ), за који је установљено да доприноси атерокслеротичним променама крвних судова (25).

### 1.3.1.3 Физиолошка улога слободних радикала

Слободни кисеонични радикали су важни за одбрану од инфективних агенаса. Њихово повећано стварање у фагоцитним ћелијама процесом „оксидационог сагоревања“, када се око 90%  $O_2$  трансформише у  $O_2^{\cdot-}$  је карактеристично за инфламаторни одговор (14). Током процеса фагоцитозе у активираним полиморфонуклеарима (PMN) и макрофагима, одмах по уношењу страног тела (патогена) у фагоцит, отпочиње „оксидациона експлозија“, а настали  $O_2^{\cdot-}$  уништава фагоцитоване честице путем деструкције мембранских липида која је праћена лизом фагоцитованих бактеријских ћелија посредством протеаза до потпуног уништавања бактерија.

Слободни радикали модификују сигналну трансдукцију интра- и интер- целуларно тако што иницијални сигнал претварају у биохемијски одговор ћелије.

Оксиданти у својству секундарних гласника остварују своје физиолошко дејство модификацијом преноса сигнала, превођењем секундарних у терцијарне гласнике или

учествовањем у покретању или финализовању процеса сигналне трансдукције (26). Тако нпр. ROS су идеални унутарћелијски гласници јер су мали молекули који брзо дифундују и врло су реактивни, док је  $H_2O_2$  прави секундарни гласник током физиолошких процеса. Слободни радикали учествују у процесу програмиране ћелијске смрти, апоптозе, без покретања запаљенског одговора. Апоптоза може бити активирана преко рецептора, али OS и NS доводе до дисфункције митохондрија и ослобађања фактора који доприносе апоптози.

### 1.3.2 Систем антиоксидативне заштите

Антиоксидативни систем (*engl. Antioxidant System, AOS*) организма еволутивно је развијен ради одбране од потенцијално штетног деловања слободних радикала. Две основне гране AOS чине антиоксиданси и антиоксидативни ензими.

Антиоксиданси су супстанце које у организму лакше подлежу оксидацији (у основи је редукциони агенс) од околних биомолекула, иако присутни у мањој концентрацији. То су неензимске структуре (глутатион, витамини А, С и Е, албумини, трансферин, билирубин и др) које могу бити ендогеног и егзогеног порекла (уносе се храном као на пример витамин С). Иначе антиоксиданси су присутни у цитоплазми, ћелијској мембрани и екстраћелијском простору. Природа растворљивости антиоксиданаса одређује простор у организму у коме они могу да остваре своју антиоксидантну улогу. Тако, липофилни антиоксиданси, као што је витамин Е, делују на нивоу плазма мембрана (штите фосфолипиде од оксидације), док хидрофилни антиоксиданси штите супстанце водених интра- и екстра- целуларних простора од оксидације/нитровања од стране ROS или RNS. Оксидација вишеструко незасићених масних киселина садржаних у ћелијским мембранама посредством слободних радикала доводи до анатомско морфолошке измене самих фосфолипида, а тиме и саме плазма мембране (мења се пермеабилност и функција). Овај процес је познат као липидна пероксидација. Крајњи производ липидне пероксидације је малонилалдехид (MDA) који служи као биохемијски маркер степена оксидативног оштећења ћелијских мембрана (27).

Антиоксидантни ензими (супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион редуктаза, глутатион-S-трансфераза и др) су најчешће метало-ензими који катализују метаболичке реакције неутралисања реактивних хемијских врста, доприносећи тако њиховој хемијској структурној измени. Настали производи ових реакција су најчешће супстрати следећег у низу ланчано повезаног антиоксидативног ензима (27, 28).

Штетни ефекти слободних радикала се не испољавају све док постоји баланс између продукције слободних радикала и антиоксидативне заштите ћелије. Стварање слободних радикала изнад физиолошког нивоа или неадекватна антиоксидативна заштита, доводи до оксидативно-нитрозативног стреса.



### 1.3.2.1 Начини деловања антиоксидативног система

Основни начин деловања AOS је:

1. Превенција стварања слободних радикала, спречавање настанка ROS
2. Неутрализација слободних радикала пре него што оштете биомолекуле
3. Поправке и *de novo* синтеза оксидисаних молекула, уклањање штетних молекула и успостављање функције

Главна функција антиоксиданаса је заштита организма од штетног дејства и неконтролисаног стварања кисеоничних радикала у метаболичким процесима. И у малим концентрацијама антиоксиданси имају способност да одложе или инхибирају оксидацију других материја. Електрофилни слободни радикал узима електрон (како би попунио сопствену последњу орбиталу) или и водоников јон. Током ове оксидо-редукционе реакције антиоксиданс прелази у нерадикалску-стабилну форму (по правилу је значајно неактивнија од слободних радикала). У одсуству антиоксиданса, присутни слободни радикали оксидишу биомолекуле и тако, оксидативно измењени биомолекули се називају секундарни радикали (нпр. код липидне пероксидације липид се оксидише у ланац секундарних радикала). Ови радикали настављају пропагирање ONS.

Прва линија одбране од дејства слободних радикала огледа се у превенцији њиховог стварања. У том смислу истичу се SH-протеини који хелирају метале и тиме онемогућавају или умањују могућност *Фентон* реакције. Пошто је SH-група изузетан нуклеофил, тј. редукциони агенс, тиме је и донор редукционих еквивалената (протон и електрон), а то значи да су тиолна једињења значајни антиоксиданси. Свакако треба поменути и значај транспортних-депо протеина, као што су трансферин, феритин и целулоплазмин који конкретно везују гвожђе и бакар, онемогућавајући да они у слободној форми учествују у *Фентон* реакцији и тако допринесу продукцији слободних радикала (24).

У уклањању слободних радикала најважнију улогу имају ензимски антиоксиданси:

1. Супероксид дисмутаза (SOD)
2. Каталаза (CAT)
3. Глутатион пероксидаза (GSH Px)
4. Глутатион редуктаза (GR)
5. Глутатион S трансфераза (GST)

У реакцијама које каталишу, наведени антиоксидативни ензими троше доноре редукционих еквивалената као што су глутатион (GSH) или никотин амид аденин динуклеотид фосфат (NADPH), они су уједно кофактори ових реакција.

Значајну групу антиоксидативних ензима чине репарациони ензими, који коригују настала оксидативна оштећења липида, протеина, угљених хидрата и нуклеинских киселина. У ову групу спадају фосфолипид зависна глутатион пероксидаза, различити протеолитички ензими, ендо и егзонуклеазе, фосфолипаза A2, DNA лигазе и DNA полимеразе (14).

### 1.3.2.2 Ензимски механизми антиоксидативне заштите усне дупље

Са аспекта денталне медицине, треба нагласити да се у највећем броју истраживања антиоксидативног стреса оралне средине користи слалива која обилује бројним ензимима, укључујући и антиоксидативне (супероксид дисмутаза, орална пероксидаза, каталаза и глутатион пероксидаза), али и неензимске антиоксиданте саливе (мокраћна киселина, албумин, витамин С и GSH).

Група истраживача је показала да слободни радикали и OS могу имати важну улогу у патогенези не само системских већ и обољења локализованих у оралној средини (периодонталне болести и орални карцином). У случају дисбаланса између продукције слободних радикала или способности саливарног AOS да их неутралишу, развија се OS, који може бити биохемијска основа за настанак оралних обољења (29).

#### **Супероксид дисмутаза (SOD)**

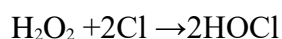
Показано је да је повећана активност SOD код пацијената са рекурентним афтозним стоматитисом у односу на контролну групу (30). Објашњење лежи у повећаној продукцији  $O_2^{\cdot-}$  и уједно леукоцита, те се повећана активност овог антиоксидативног ензима тумачи као механизам адаптације домаћина на неповољне услове средине.

#### **Орална пероксидаза (OP)**

Орална пероксидаза је важан антиоксидативни ензим саливе кога луче пљувачне жлезде. Сачињавају је ензими: саливарна пероксидаза (80%) и мијелопероксидаза (20%). Кључна улога саливарне пероксидазе је редукција водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) који настаје као продукт метаболизма оралних бактерија. Ова реакција се одвија у присуству јона тиоцијаната ( $SCN^-$ ) који као донори електрона имају антиоксидациони потенцијал. Резултат ове реакције су хипотиоцијанатна киселина и хипотиоцијанати, који испољавају антибактеријско дејство.

Важност оралне пероксидазе огледа се и у ефикасном уклањању  $H_2O_2$  из оралне средине чиме се спречава настанак *Фентон* реакције (31).

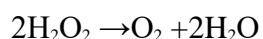
**Мијелопероксидаза (MPO)** је хем-зависан ензим кога садрже леукоцити. У присуству  $H_2O_2$  формира се комплекс ензим-субстрат који има способност да оксидише јодиде и хлориде стварајући токсичне производе. Оксидацијом хлора овим комплексом добија се хипохлорна киселина (HOCl) која има јака антиоксидативна својства и тиме учествује у разградњи токсина.



Активност мијелопероксидазе је повећан у саливи у случају инфламације у устима, што се објашњава повећаном продукцијом леукоцита и ROS током фагоцитозе и елиминације патогена (32).

#### **Каталаза (CAT)**

Каталаза је ензим присутан у пероксизомима који катализује разградњу  $H_2O_2$  до молекулског кисеоника и воде.



Активност CAT се повећава при повећаној продукцији  $H_2O_2$  који је уједно њен субстрат (33).

### 1.3.2.3 Антиоксидативна заштита-неензимски механизми

#### Глутатион (GSH)

Глутатион (трипептид: глицин-цистеин-глутамат) је главни ендогени неензимски антиоксиданс мале молекулске масе. Главна функција му је заштита ћелија и митохондрија од оксидативног и пероксидативног оштећења. Он је најмоћнији антиоксидант нашег тела. Антиоксидативни потенцијал GSH односи се на нуклеофилну цистеин сулфхидрилну (SH) –групу која може давати редукционе еквиваленте ( $H^+$  и  $e^-$ ), тј. када се оксидише у дисулфидни облик (GSSG). Такође, утрошак GSH настаје током: тиолизације липида (тада је повећана активност GSH-S-трансферазе); нитролизације када настаје нитрозил-глутатион (GSNO); протеина ( дисулфидни мостови се граде) и током хелатне активности прелазних метала (33,34).

### 1.3.3 Улога оксидативног стреса у патогенези оралних обољења

Данашња сазнања о активности антиоксидативних ензима са пародонталним обољењима се односе на активност пероксидазе у сливи. Будући да је пропадање зуба повезано са бактеријском инфекцијом претпоставка је интензивно стварање супероксида анион радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) од стране фагоцитних ћелија, током елиминације патогена (оксидативни прасак) и његово ослобађање у околну окружење (35).

Поред тога неки ксенобиотици, укључујући денталне ресторативне материјале (енгл. *Dental Restorative Materials*, DRMs) могу довести до поремећаја редокс метаболизма, доприносећи повећаном стварању  $O_2^{\bullet-}$ , као што смо и ми установили у нашој студији. Аутооксидацијом (дисмутацијом)  $O_2^{\bullet-}$ , посредством SOD (EC 1.15.1.1) настаје  $H_2O_2$ . Нестабилан је, те тиме и врло реактиван. Може се хемолитички цепати на два молекула хидроксил радикала ( $HO^{\bullet}$ ), или учествовати (са прелазним металима) у *Фентон* реакцијама и опет произвести  $HO^{\bullet}$  (у обе варијанте). За разлику од  $O_2^{\bullet-}$ ,  $HO^{\bullet}$  је довољно потентан да покрене реакције радикалских ланаца, укључујући липидну пероксидацију, мада је може покренути и  $O_2^{\bullet-}$  у протонованој форми, као хидропероксил радикал (енгл. *Hydroperoxyl radical*,  $HO_2^{\bullet}$ ).

*Липидна пероксидација* (LPO) је процес оксидативног оштећења липида. Ћелијска мембрана и мембране субћелијских органела представљају главно место за отпочињање LPO. Оксидативна оштећења липида настају реакцијама једно-електрон-радикалског типа реакције између FRs и полинезасићених масних киселина (енгл. *Polyunsaturated fatty acids*, PUFA) манифестујући промену морфологије и функције (суб) ћелијских мембрана (36). Липидна пероксидација се завршава интрацикличним реакцијама липидних секундарних радикала и потом њиховом деградацијом до нерадикалних форми, алдехида, алкохола и кетона. Липофилни антиоксиданси могу ублажити или прекинути LPO.

Малонилалдехид (MDA) је продукт разградње секундарно формираних липидних радикала и обично се користи као биомаркер LPO (15, 35, 36). Мерење MDA као продукта LPO најчешће се користи као показатељ интензитета овог процеса. У одбрани оралних ткива од штетног деловања FRs значајну улогу имају гингивална течност и слива са својим антиоксидантима правећи баланс између продукције FRs и њиховог уклањања. Висока концентрација FRs услед њихове прекомерне продукције или неадекватног

„уклањања“ посредством AOS, неминовно води ка ONS, што је окидач бројних обољења оралне средине.

Полиморфонуклеарни леукоцити (PMN) имају важну одбрамбену улогу у пародонталним болестима. Интеракцијом PMN и бактерија покрећу се одбрамбени, биохемијски и физиолошки процеси домаћина усмерени на уништавање патогена, али и долази и до оксидативне модификације различитих биомолекула и оштећења локалног ткива. За процесе уништавања патогена, PMN повећано троше  $O_2$  и од тога се готово 90% претвара у  $O_2^{\bullet-}$ , за тзв. „оксидацино сагоревање“ при чему долази до „убијања“ патогена. Све већи значај FRs и OS се придаје и у патогенези оралног карцинома. Дувански дим садржи FRs, као и супстанце које узрокују појачану продукцију FRs, и смањује антиоксидативни капацитет саливе. С обзиром да се пушење доводи у блиску везу са настанком оралног карцинома, објашњење би било да прекомерно присутни FRs могу оксидовати DNA, што директно води ка малигној алтерацији (29,37).

### 1.3.3.1 Оксидативни стрес и каријес

Последњих деценија појавило се много доказа који указују на ONS са патогенезом обољења зуба (пародонтопатија, рак усне дупље) (38-42). Познато је да је каријес обољење тврдых зубних ткива које доводи до деструкције зуба, манифестује се као локални имунски одговор ткива зуба на инвазију патогена (1, 43).

Новијим студијама указује се на повезаност OS са бактеријски индукованим имунским одговором (45-48). У већини спроведених студија о редокс статусу у оралној средини коришћена је салива. Анализирање саливе са аспекта зубног каријеса није значајно у дијагностици, као што је случај са пародонтопатијом и другим оралним обољењима. На основу физичко-хемијских особина саливе (запремина излучене саливе, пуферски капацитет), као и праћењем микробиолошког састава овог секрета (степен колонизације оралне средине кариогеним врстама бактерија) могуће је детектовати повећан ризик од настанка каријеса.

Салива је веома комплексан матрикс где утицај хране на статус оксидативног статуса оралне средине интерферира са утицајима каријеса или примењених денталних материјала. У нашим истраживањима смо из тих разлога користили гингивалну течност (GCF) за испитивање утицаја денталног каријеса и примењених DRMs на оксидативни статус околног ткива, непосредне оралне средине.

Гингивална течност је трансудат крвне плазме смештен у гингивалном сулкусу који јасно одражава физиолошке и патолошке процесе у пародонталном ткиву и денталним испуницама (49). У физиолошким условима GCF је трансудат гингиводенталних крвних судова. У патолошким условима, током запаљења пародонцијума, проток GCF расте до тридесет пута и представља инфламаторни ексудат који садржи различите медијаторе, ензиме, неуроухормоне, продукте кисеоничног метаболизма и цитокине.

Истраживањима је показано да концентрација појединих цитокина и/или NO прецизно одражава интензитет локалног запаљења (33, 50).

Што се тиче процене редокс статуса у GCF фокус је био на мерењу исцрпљености GSH, активности SOD и MDA (маркер LPO).

## 2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

### Хипотезе које смо тестирали:

- вредности параметара оксидативног стреса у GCF зуба са каријесом разликују се у односу на вредности контролних здравих зуба
- степен захваћености ткива каријесом значајно утиче на вредности параметара ОС у GCF
- у узорцима GCF испитаника са пулпитисом (К3) значајно су повећане вредности про-оксидативних параметара у односу на вредности лечених зуба (К5),
- DRMs за привремену и трајну рестаурацију различито утичу на статус ОС.

### Циљеви студије били су да се код свих испитаника:

- одреди степен захваћености ткива каријесом заједно са вредностима индекса крварења (ИК), плак индекса (PI, према *Silness-Lou*), гингивалног индекса (GI) и дубине гингивалног цепа (DGS)
- установи статус ОС у GCF зуба захваћених каријесом
- прати статус ОС у GCF у односу на примењен DRMs
- прати статус ОС у GCF у односу на скор клиничких параметара (ИК, PI, GI, DGS).

У овој студији праћења, проучавана је узрочно-последична веза између опсега проксималног каријеса *per se* односно DRMs и статуса ОС у GCF зуба са каријесом класификованог у четири категорије према Black's Classification Criteria (1900) код испитаника (51,52).

Од параметара ОС мерени су следећи маркери: tGSH, tSOD и MDA, током 30 дана третмана.

Испитивани DRMs су се односили на:

- а) трајне зубне испуне [амалгам и две врсте комерцијалних нано-хибридних композита, *TetricEvoCeram* (TEC) и *Beautiful* (BF)]
- б) привремене зубне испуне [*Zinc phosphate cement* (ZPhC) и *Zinc polycarboxylate cement* (ZPoC) ]
- в) самосталан рестауратив или база за композите (BF и TEC) [*Glass ionomer cement* (GIC)].

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ

Спроведена је проспективна клиничка опсервациона студија пресека (подржана од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја републике Србије и заведена под бројем III 41018). Трајала је 30 дана и спроведена је у амбуланти Клинике за стоматологију Војномедијске академије (ВМА) у Београду.

Етички комитет ВМА, Министарства одбране Србије је одобрио овај клиничко-студијски протокол (No. 12092014/2) који је спроведен у складу са Међународним етичким смерницама и Хелсиншком декларацијом (1964/1975).

Испитаници/пацијенти су били упознати са суштином студије и планираним процедурама, попунили су упитник који се односио на опште и орално здравље и дали су писмену сагласност за учествовање у студији.

#### 3.2. ИСПИТАНИЦИ

Испитивање је урађено на 88 пацијената старости 18-70 година. Критеријуми за укључивање у студију приказани су у табели (Табела 1).

Табела 1. Критеријуми за одабир испитаника

<b>Критеријуми за укључивање испитаника у студију</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>● Критеријум за процену стања зуба</li><li>● Присуство проксималног каријеса на предњим и задњим зубима</li><li>● Присуство антагонистичких зуба (ефекат огледала) коришћених за контроле</li><li>● Одсуство свежих постекстракционих или трауматичних рана у подручју рестаурираних површина</li><li>● Одсуство инфекције у подручју рестауриране површине</li></ul>
	<b>Остали критеријуми који утичу</b> <ul style="list-style-type: none"><li>● Нетретирани и пацијенти без болести везаних за коштани систем</li><li>● Задовољавајућа орална хигијена</li><li>● Поуздани и кооперативни пацијенти</li></ul>
<b>Критеријуми који искључују испитанике из студије</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>● Критеријум који се односи на стање зуба</li><li>● Ендодонтске и/или пародонталне инфекције у области пуњења</li><li>● Пародонтопатија</li><li>● Проминентни пародонтални џепови</li><li>● Субгингивални каријес</li><li>● Неприкладно попуњени испуни</li></ul>
	<b>Остали критеријуми који утичу</b> <ul style="list-style-type: none"><li>● Пацијенти на зрачној имуносупресивној терапији</li><li>● Пацијенти са малигним обољењима и остеопорозом</li><li>● Пацијенти зависници од дроге/алкохола/цигарета (&gt; 20 цигарета по дану)</li><li>● Лоша орална хигијена</li><li>● Непоуздани и некооперативни пацијенти</li></ul>

Испитаници са каријесом, класификовани су на два начина:

А) Према Блековом класификационом критеријуму подељени су у 4 К групе:

К2- испитаници са денталним каријесом

К3- испитаници са денталним каријесом спојени лезијом са зубним нервом

К4- испитаници са денталном некрозом

К5- испитаници са ендодонтски третираним зубима- претходно пуњени зубни канали.

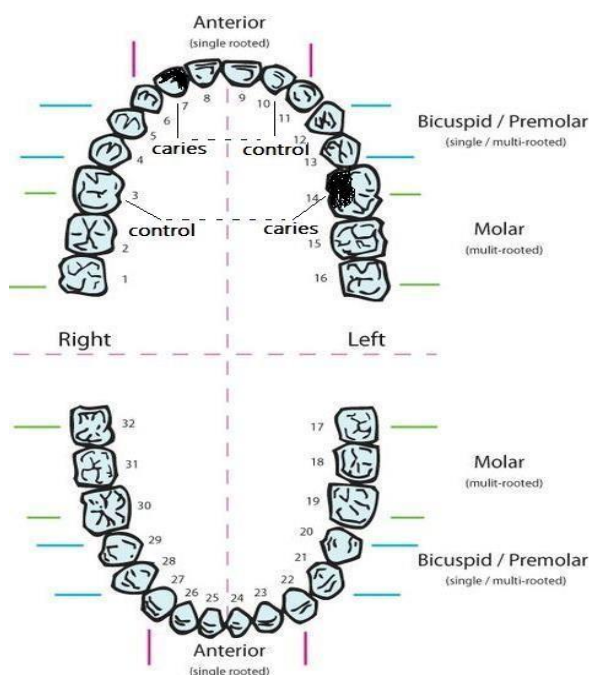
Б) Класификација у шест група у односу на тип примењеног материјала (Amg, ТЕС, ВF, ZPhC, ZPoC и GIC) (51,52).

### **3.3. УЗОРКОВАЊЕ ГИНГИВАЛНЕ ЦЕРВИКАЛНЕ ТЕЧНОСТИ (GCF)**

Узимање узорака је обављано помоћу филтер папирних поена. Након уклањања супрагингивалног филма стерилним ватеролнама, место узимања узорака је изоловано ватеролнама и нежно просушено током 1 минута пре узорковања, како би се елиминисала потенцијална контаминација саливом. Папирни поен стандардне дужине и тежине (Periopaper, Pro Flow, Amityville, NY, USA) је убачен у гингивални/пародонтални сулкус до благог отпора и остављен 30 секунди (53). Папирни поени који су визуелно били контаминирани крвљу или пљувачком су били одбачени. Поступак елуирања анализата (параметри OS) са папирних поена регуларано узорковане GCF је урађен урађањем папирног поена у пластичне епрувете са 500 $\mu$ l стерилног физиолошког раствора, вортексирањем 10 секунди и потом центрифугирањем 5 минута на 3000 g, како би се уклонили (исталожили) плак и ћелијски елементи од елуата. Папирни поени су уклоњени, а супернатанти (елуати) су пребачени у епендорфице и чувани на -70 °C до анализе маркера OS.

Узимани су GCF узорци у близини зуба са каријесом и здравих антагонистички лоцираних зуба (позиционирани као одраз у огледалу, здрави зуби насупрот третираних), који су служили као контроле.

## Шема 1. Дијаграм зуба



Легенда: Шема преузета са <https://www.pinterest.com/pin/290763719669177256/> је модификована илустрацијом зуба са каријесом и са одговарајућим контролама.

Узорци GCF су узимани једном за контролне зубе (0-ти дан) и у три термина за третиране зубе (0-ог, 7-ог и 30-тог дана).

У истраживању је узет у обзир положај зуба (према Шеми 1: горњи/доњи и леви/десни, од зуба 11-18 горе десно и од 21-28 горе лево).

Испитивали смо да ли су фронтални зуби (горњи/доњи и леви/десни од 11 до 13 горе десно и од 21-23 горе лево 31-33 доњи леви сегмент и 41-43 доњи десни сегмент) и бочни зуби (горњи/доњи и леви/десни од 14-18 горе десно и 24-28 горе лево и у доњој вилици 34-38 доле лево и 44-48 доле десно) повезани са редокс статусом у GCF, пре и током периода лечења. Поред тога размотрили смо утицај повећања волумена на тестиране OS параметре. Маса смештених DRMs<sup>9</sup> кретала се од 0.01g до 2.72 g.

### 3.4. ДЕНТАЛНИ РЕСТОРАТИВНИ МАТЕРИЈАЛИ-КОМПОЗИТИ

Коришћени привремени ресторативни материјали су се односили на ZPhC (Cegal NV, Galenika) и ZPoC (Harvard), док су трајни ресторативни материјали обухватали Amg (Extracarp D caps, Galenika) и два нанохибридна композита (којима је за везивање потребна UV светлост):

BF (смеша: бифенол-А-диглицидил-диметилакрилат (BisGMA 15-25%, триетиленгликолдиметилакрилат (TEGDMA) 12-14%, алуминофлуороборосиликатно стакло 50-60%, алуминијум триоксид ( $Al_2O_3$ ) 1-2% и DL Camphorquinone) (Shofu, Japan)) и ТЕС (смеша: 2.5-10% BisGMA и 2.5-10% уретандиметилакрилата (UEDMA) и неопасних додатака) (Ivoclar Vivadent).



Такође су коришћени GIC (GC Fuji PLUS®, Green Circle, USA) за обе поставке, као појединачне рестаурације или као базе за композите (BF и ТЕС).

Попуњавање дефеката денталним испунама рађено је у интервалу од 10 дана од узимања узорака GCF, како би се избегле последице каријеса, као што су пулпитис, некроза или након завршетка ендодонтског лечења.

### **3.5. МЕРЕЊЕ МАРКЕРА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА**

#### **3.5.1. Реагенси**

Све хемикалије коришћене за мерење OS маркера су аналитичке класе: етилен диамино тетра сирћетна киселина (EDTA), нитроблу тетразолијум (NBT), епинефрин [Sigma Aldrich (St. Louis, USA)]; 5,5-дитиобис-2-нитробензоична киселина (DTNB), дисодијум хидроген фосфат ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), NADPH [Merck (Darmstadt, Germany)]; трихлорсирћетна киселина ТСА), метанол, GSH, GSSG, карбонатни пуфер (50 mM, pH 10.2) [Serva Feinbiochemica GmbH & Co. (Heidelberg, Germany)]; тиобарбитуратна киселина (ТВА) [ICN Biomedicals Inc.(Ohio,USA)]; ацетонитрил [Backer J.T. (Deventer, Netherlands)]; глутатион редуктаза (EC 1.6.4.2) из пекарског квасца (*S. cerevisiae*): 9001-48-3, Type III [Sigma Chemical Co (St Luis, MO, USA)] – високо рафинирана суспензија у 3.6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7.0; 2500U/1.6 mL (9.2 mg prot/mL – biuret) 170 U/mg протеина (напомена: 1 јединица смањује 1  $\mu\text{mol}$  GSSG/min, pH 7.6 на 25 °C); физиолошки раствор (0.9 % w/v) [Болничка аптека Војномедицинске академије Београд].

Дејонизована вода је припремљена помоћу Millipore Mili-Qза пречишћавање воде (Waters - Millipore, Milford, MA, USA).

Сви раствори лекова су припремљени *ex tempore*.

#### **3.5.2. МЕТОДЕ МЕРЕЊА МАРКЕРА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА**

##### **3.5.2.1. Мерење малонилалдехида**

Малондиалдехид (биомаркер LPO) је мерен спектрофотометријски применом методе Girotti и сар (1991) којом се мере супстанце које реагују с тиобарбитуратном киселином (тзв. TBARS метода) (54). Укратко MDA у реакцији с тиобарбитуратном киселином гради црвено обојено једињење (узорак за анализу се инкубира с ТВА реагенсом (15 % ТСА и 0.375 % ТВА, водени раствор, pH 3.5), на 95°C. Апсорбанца је мерена на 532 nm. Подаци су изражени као nmol MDA/mg протеина.

### 3.5.2.2. Мерење супероксид дисмутазе

Активност супероксид дисмутазе (EC 1.15.1.1.; SOD) је мерена спектрофотометријски, као инхибиција епинефринске оксидације у обојени производ аденохром (мерено на 480 nm) специфичним SOD субстратом O<sub>2</sub><sup>•</sup>. Кинетика активности SOD праћена је након додавања 10 mmol епинефрина узорцима припремљених у карбонатном пуферу (50 mmol, pH 10.2) који садржи 0.1 mmol EDTA (55). Резултати су изражени у јединицама SOD/mg протеина.

### 3.5.2.3. Мерење глутатиона

Укупни глутатион (GSH+1/2GSSG, у GSH еквивалентима) одређен је спектрофотометријски на 412 nm (56).

Принцип методе је ензимски (глутатион редуктаза) катализована реакција DTNB (36.9 mg DTNB у 10 ml метанола) и алифатичних тиолних једињења у TRIS-HCl пуферу (0.4 M, pH-8.9), при чему настаје 5-тио-2-нитробензоева киселина (TNB) жуте боје, која је пропорционална укупној концентрацији GSH.

Резултати су изражени као pmol TNB/mg протеина.

### 3.5.2.4. Мерење протеина

Концентрација протеина у супернатантима GCF узорака је мерена методом Lowry метода непосредно пре мерења маркера OS (57).

Садржај маркера OS је прерачунаван на mg протеина.

## 3.6. КЛИНИЧКИ ПАРАМЕТРИ

Степен оштећења зубног ткива изражавао се индиректно, тежином измереног материјала за испуне на лабораторијској ваги (*Sartorius Mechanotronics 1204MP*) непосредно пре уношења у кавитет.

Степен оштећења зубног ткива каријесом, изражен клиничким описом:

KII - захваћени глеђ и дентин

KIII - захваћени глеђ и дентин, са пулпом

KIV - захваћени глеђ и дентин, са некрозом пулпе

KV - захваћени глеђ и дентин, где је раније излечен коренски канал.

Стање потпорног апарата зуба, описан пародонталним индексом:

- индекс крварења (IK, скориран од 0-3)
- плак индексом (PI скориран по *Silness-Lou*, 0-3)
- гингивалним индексом (GI, скориран од 0-3)
- дубином гингивалног џепа (DGS, скориран од 0-3)

За процену нивоа оралне хигијене и стања пародонцијума уз помоћ градуисане пародонталне сонде одређени су клинички параметри: плак индекс (PI), индекс крварења (IK), гингивални индекс (GI) и дубина гингивалног сулкуса (DGS). Плак индекс је добар за процену стања гингиве, гингивални индекс је показатељ оралне хигијене и активности болести гингиве, док је индекс крварења гингиве најбољи индикатор степена инфламације.

### **Плак индекс (Silness-Lou)**

Плак индекс је показатељ постојања и дебљине денталног плака на гингивалним трећинама зуба.

### **Гингивални индекс**

Гингивални индекс се користи за процену стања гингиве, односно боје, отока и крварења гингиве. Помоћу њега се може утврдити корелација локалних етиолошких фактора и стања гингиве.

### **Индекс крварења гингиве**

Индекс крварења гингиве одређује присуство крварења гингиве приликом сондирања. У корелацији је са гингивалним индексом.

### **Гингивални сулкус**

Гингивални сулкус је плитак жлеб смештен између унутрашње површине слободне гингиве и врата зуба. Простире се од ивице гингиве до коронарног краја припојног епитела. Просечна дубина гингивалног сулкуса је око 1,5 mm.

## **3.7. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА**

Уз критеријуме да је очекивана снага ефекта 0,4 (око 40% разлике између испитиваних група), да је неопходна снага студије најмање 80%, а вероватноћа грешке првог типа 0,05 ( $\alpha = 0,05$ ), применом анализе варијансе за предвиђених 6 група је утврђено да је укупан број испитаника 90, што значи да у свакој од испитиваних група треба да буде минимално по 15 пацијената.

## **3.8. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА**

Нормалност променљивих процењена је тестом *Kolmogorov–Smirnov* тест (K-S test) на једном узорку. Разлике између нивоа OS параметара (tGSH, tSOD и TBARS) у GCF поред здравих зуба (контрола) и кариозних зуба (K2-K5) добијених у 0-ом дану анализирани су непараметријским *Wilcoxon Signed Ranks* тестом рангирања за два повезана узорка.

Разлике у параметрима OS према положају зуба анализирани су помоћу два независна T теста, док је утицај масе пуњења на OS параметар процењен непараметријском *Spearman's* анализом корелација. Повезаност између положаја зуба и масе за пуњење анализирана је *Pearson* дворедним корелационим тестом. Утицај шест примењених DRMs (Amg, TEC, BF, ZPoC, GIC и ZPhC) на редокс статус (tGSH, tSOD и TBARS) тестиран је коришћењем 2x2 анализе групе коваријанти између група (ANCOVA) и упоредних поређења (најмање значајна разлика LSD). Независне променљиве су степен каријеса (K групе) и/или врста примењених DRMs. Зависне променљиве су нивои параметара OS (tGSH, tSOD и TBARS) 7-ог и или 30-ог дана, док су нивои OS пре интервенције (0-ти дан) коришћени као контрола индивидуалних разлика у исходу терапије.

Статистичка анализа извршена је коришћењем *SPSS 17.0 software*. Разлике података  $p \leq 0.05$  су сматране статистички значајним.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

Ово истраживање је урађено ради испитивања утицаја каријеса (4 К категорије) и DRMs (шест типова денталних испуна) на OS статус (tSOD, tGSH и TBARS) у GCF. Иницијално, поређење вредности 0-тог дана између К2 - К5 група и са контролама (здрави антагонисти који су као у огледалу позиционирани зуби) указују на ефекат степена каријеса *per se*, на GCF редокс статус (Графикони 6,7,8,9,10,11,12). Нису примећене разлике, осим за К4 групу, у којој је ниво активности tGSH и tSOD била нижа ( $p=0.043$ , у оба случаја) у поређењу са контролним зубима. (Графикон 12 а).

Утицај примењених DRMs, укључујући трајне (Amg и DRCs: TEC и BF), привремене испуне (ZPoC и ZPhC) и GIC на OS статус у GCF је процењивано током наредних 30 дана упоређивањем вредности 7-ог и 30-тог дана са 0-тим даном унутар К група (К2 - К5) да би се пратио тренд промена (Графикон 12 б).

Повећање активности tGSH и tSOD је остварено 30-тог дана привременог пуњења у К3 групи (примењени DMs: ZpoC 40%, ZPhC 40% and GIC 20%).

Најнижи ниво MDA је остварен у К4 групи 30-тог дана (Графикон 12 б).

### 4.1. РАСПОДЕЛА ИСПИТАНИКА ПРЕМА BLACK'S И DRMs КРИТЕРИЈУМИМА

Расподелом пацијената ( $n=88$ ) према Black's класификацији установљено је да је највише пацијената сврстано у К2 групу ( $n=58$ ), у којој доминира каријес задњих зуба ( $n=39$ ), готово душло у односу на каријес предњих зуба ( $n=19$ ). Најмање пацијената је било у К4 групи ( $n=6$ ), где су установљене каријесне лезије само код задњих зуба ( $n=6$ ), (Табела 2).

**Табела 2.** Дистрибуција испитаника према Black-овој класификацији, са дефинисаним положајем зуба и примењеним типом ресторативног материјала

Black-класификација испитаника	К2	К3	К4	К5
Број испитаника	58	10	6	14
Процент испитаника (%)	65.9	11,4	6,8	15,9
Позиција зуба с каријесом (P/A)	39/19	/	0/6	/

Истраживањем су обухваћене четири групе зубног каријеса рестаурираних са 6 типова денталних испуна и њихов утицај на оксидативни статус. Није потврђена корелација између количине испуна и параметара оксидативног стреса.

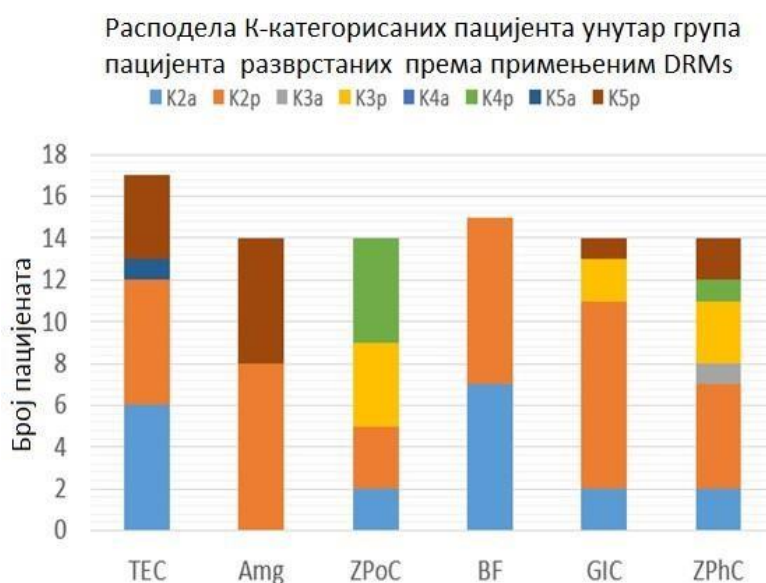
Потврђена је корелација између количине испуна и позиције зуба (*Pearson* корелација: 0,307,  $p=0,004$ ) (Табела 3).

**Табела 3.** Број испитаника који су третирани одговарајућим ресторативним материјалом

Врста испуне Број испитаника (P/A)	Постериор (P) Број испитаника	Антериор (A) Број испитаника
TEC (10/7)	0,15±1,59 n=10	0,03±0,023n=7
Amg (14/0)	1,32±0,71n=14	/
ZpoC (12/2)	0,23±0,167n=12	0,04±0,015n=2
BF (8/7)	0,06±0,042 n=8	0,03±0,014n=7
GIC (12/2)	0,17±0,153 n=12	0,04±0,015n=2
ZPhC (11/3)	0,24±0,145n=11	0,08±0,081n=3

Легенда: Amg-амалгам, ZpoC-цинк фосфатни цемент, BF-beautifill, TEC-TetricEvoCeram, GIC глас јономер цемент, ZPhC-цинк поликарбоксилатни цемент

На графикону 1 је приказана дистрибуција испитаника кроз групе које су издвојене на основу два критеријума K2-K5 групе и шест група са различитим испунима. Суфикси *a* и *p* у K групама су номенклатуре које одређују позицију зуба *a*-предњи сегмент, *p*-бочни сегмент вилице



**Графикон 1.** Заступљеност K-група испитаника на основу примењеног ресторативног материјала

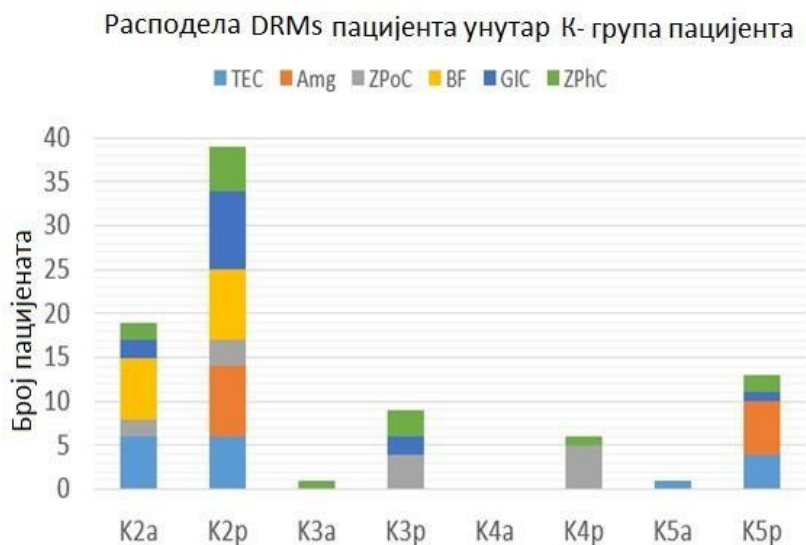
Легенда: Суфикси *a* и *p* номенклатуре у групи K указују на позицију зуба, предњих и задњих.

Број пацијената K група према примењеним денталним материјалима:

TEC (K2a=6, K2p=6, K5a=1, K5p=4); Amg (K2a=0 K2p=8, K5a=0 K5p=6), ZPoC (K2a=2, K2p=3, K3a=0, K3p=4, K4a=0, K4p=5)

BF K2a=7, K2p=8, GIC (K2a=2, K2p=9, K3a=0 K3p=2, K5a=0, K5p=1), ZPhC (K2a=2, K2p=5, K3a=1, K3b=3, K4a=0 K4p=1, K5a=0, K5p=2)

Дистрибуција испитаника третираних различитим DRMs унутар појединачних К-група у односу на позицију зуба је такође графички представљена (Графикон 2).



**Графикон 2.** Заступљеност DRMs у оквиру појединачних К-група испитаника

*Легенда: Суфикси а и р номенклатуре у групи К указују на позицију зуба, предњих и задњих. Број пацијената категорисаних према примењеним денталним материјалима унутар К-категорија пацијента, с разврстаном позициојом зуба: K2a (TEC=6, ZPoC=2, BF=7, GIC=2, ZPhC=2 Amg=0), K2p (TEC=6, ZPoC=3, BF=8, GIC=9, ZPhC=5 Amg=8), K3a (TEC=0, ZPoC=0, BF=0, GIC=0, ZPhC=1 Amg=0), K3p (TEC=0, ZPoC=4, BF=0, GIC=2, ZPhC=3 Amg=0), K4a (TEC=0, ZPoC=0, BF=0, GIC=0, ZPhC=0 Amg=0), K4p (TEC=0, ZPoC=5, BF=0, GIC=0, ZPhC=1 Amg=0), K5a (TEC=1, ZPoC=0, BF=0, GIC=0, ZPhC=0 Amg=0), K5p (TEC=4, ZPoC=0, BF=0, GIC=1, ZPhC=2 Amg=6).*

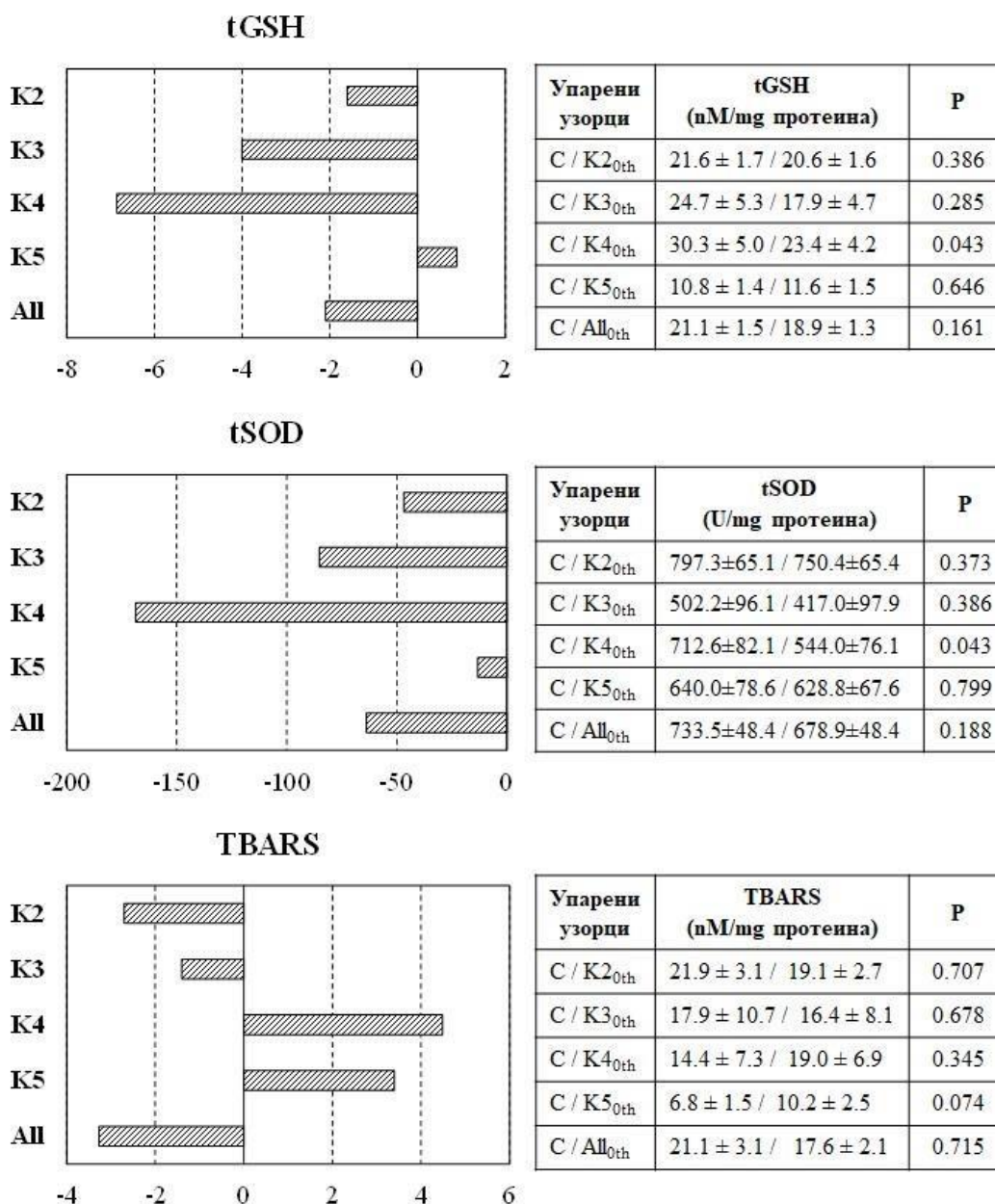
## 4.2. УТИЦАЈ СТЕПЕНА КАРИЈЕСА НА ПАРАМЕТРЕ ОС У GCF

Поређећи разлике у вредностима ОС маркера у групи здравих контролних зуба са вредностима зуба пре третмана (0-ти дан) није уочена статистички значајна разлика сем GSH и tSOD чије су активности биле ниже ( $p=0,043$ ) у оба случаја у оквиру K4 групе у поређењу са здравим контролним зубима. (графикон 3).

Резултати мерених параметара ОС седмог и тридесетог дана су приказани на графикону 3 и 4. Највеће вредности GSH и tSOD су измерене у K3 групи 30-ти дан (K3: ZPhC 40%, ZPoC 40%, GIC 20%).

GSH је био значајно виши у K3, а затим у K2 ( $p=0,001$ ) и K5 ( $p=0,001$ ) 30-тог дана (K2: BF 26%, TEC 21%, GIC 19%, Amg 14%, ZPhC 12% и ZPoC 8%; и K5: Amg 43%, TEC 36%, ZPhC 14% и GIC 7%).

Најнижи ниво MDA је добијен у K4 групи (K4: ZPoC 83%, ZPhC 17%) тридесети дан и то је знатно ниже поређећи са K2 ( $p=0.026$ ) тридесетог дана за MDA.

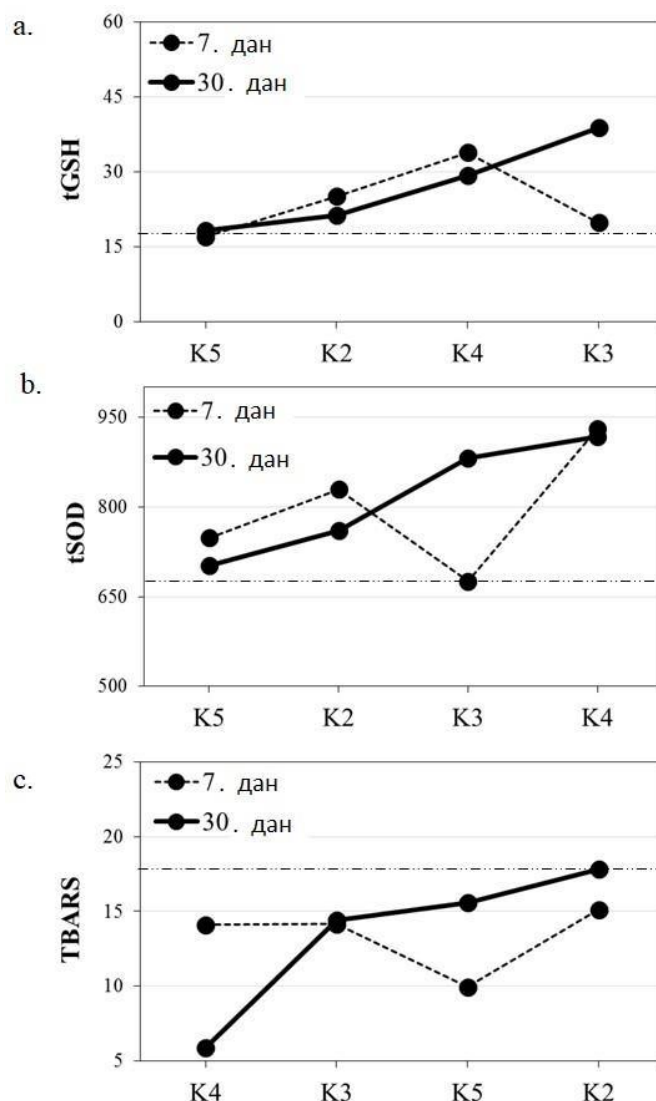


**Графикон 3:** Утицај степена каријеса на параметре ОС

Легенда: Разлике у ОС маркерима у GCF-у између контролних и нетретираних зуба са каријесом (0. дан) у односу на Блекову класификацију (K2-K5): GSH је изражен као  $\mu\text{mol TNB} / \text{mg}$  протеина; LPO преко TBARS/mg протеина и tSOD активност као U SOD/mg протеина. Нулта линија представља средњу вредност контрола.

Табеле десно показују средњу вредност ± стандардна девијација вредности ОС добијених у два повезана узорка и разлике између њих (p) код свих пацијената. Број пацијената унутар K-група (0 =-тог дана био је следећи: K2-58, K3-10, K4-6 и K5-14 (у Табели 2). Употребљен је непараметријски тест Wilcoxon Signed Ranks за два повезана узорка и вредност.  $p \leq 0.05$  је сматрана статистички значајн





**Графикон 4.** GCF редокс статус у периоду пре и после третмана унутар K2-K5 група

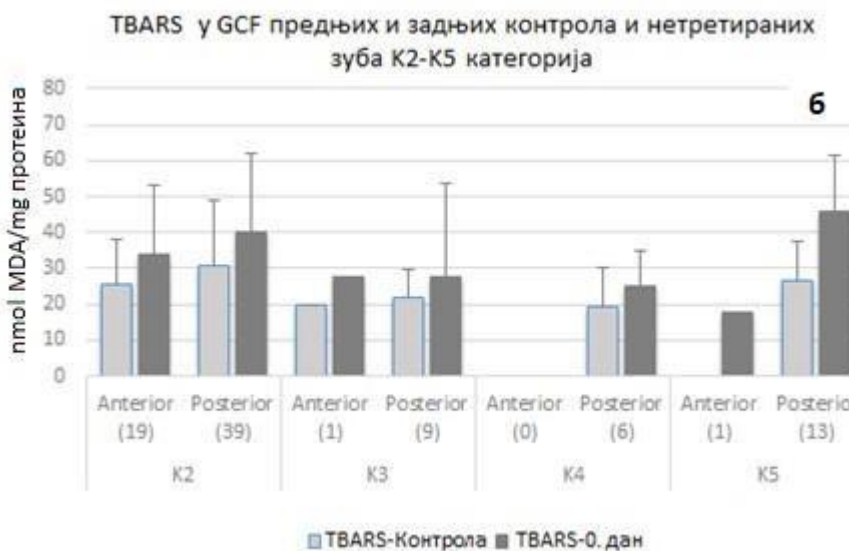
*Легенда:* Процењена маргинална средња вредност за OS параметре 7-ог и 30-тог дана је процењена у односу на нулти дан према Блековој класификацији (K2 – K5): а) GSH коваријанта у 0-том дану је била 18.4 nmol TNB /mg протеина; значајне разлике су нађене 30-тог дана између K2 – K3 ( $p=0.001$ ) и K3 – K5 ( $p=0.001$ ); б) tSOD коваријанта 0-тог дана је била 675.8 U SOD/mg протеина; в) TBARS коваријанта 0-тог дана је била 18.1 nmol/mg протеина; значајне разлике су нађене 30тог дана између K2 – K4 ( $p=0.026$ ). Дистрибуција пацијената у 4 K групе је дата у табели (Табела 2). 7-ми и 30-ти дан је представљен испрекиданом и пуном линијом. Коришћена је 2x2 анализа коваријансе (ANCOVA) и пост-хок поређења (најмање значајна разлика, LSD)  $p \leq 0.05$  је сматрана статистички значајном.

Графиконима 5 (а-с), представљен је GCF редокс статус на предњим и задњим контролама и претходно нетретираним зубима унутар категорија K2-K5, базирано на мерењима три параметра OS.



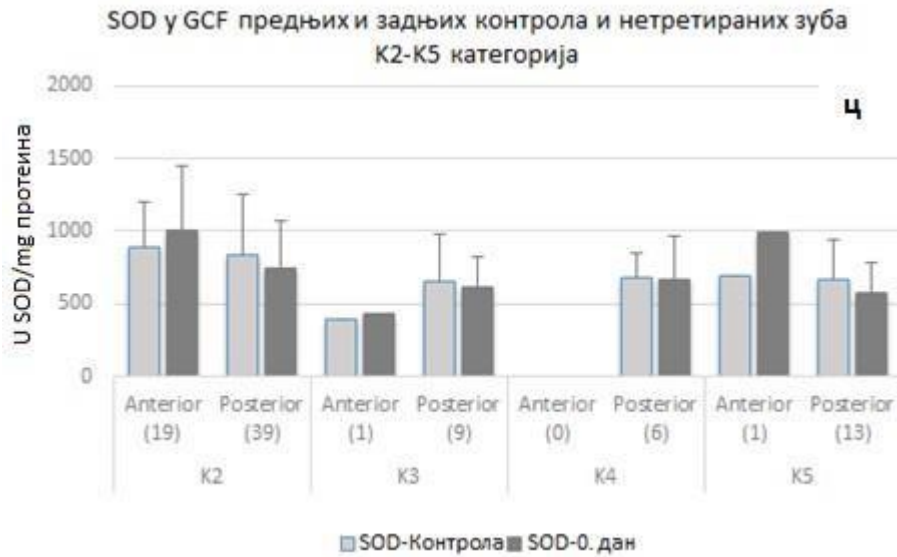
**Графикон 5 а.** Ниво GSH у GCF нетретираних зуба са каријесом

Легенда: Групе K2 – K подлежу Блекувој класификацији. Позиција зуба: одвојени предњи и задњи зуби. GSH је изражен као pmol TNB /mg протеина; LPO i.e. TBARS као pmol MDA/mg протеина и tSOD активност као U SOD/mg протеина. Контроле: одговарају “огледало”- позиционираним зубима; 0- ти дан:зуби са каријесом пре третмана.



**Графикон 5 б.** Липидна пероксидација у GCF нетретираних зуба са каријесом

Легенда:Погледати легенду Графикона 5а.



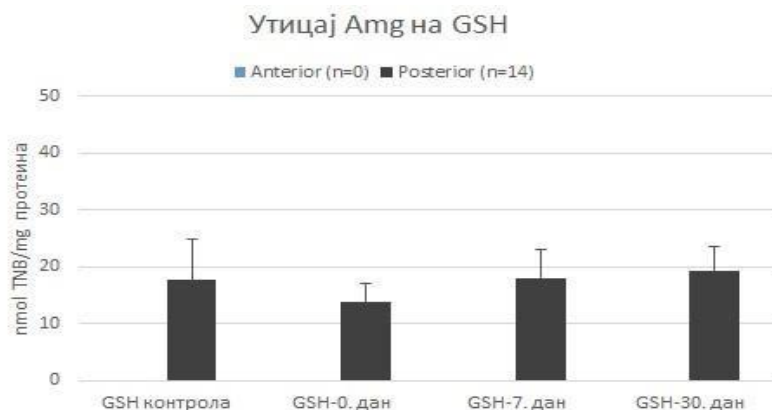
**Графикон 5с.** Активност SOD у GCF нетретираних зуба са каријесом

*Легенда: Погледати легенду Графикона 5а*

### 4.3. УТИЦАЈ ДЕНТАЛНИХ МАТЕРИЈАЛА НА ПАРАМЕТРЕ OS У GCF

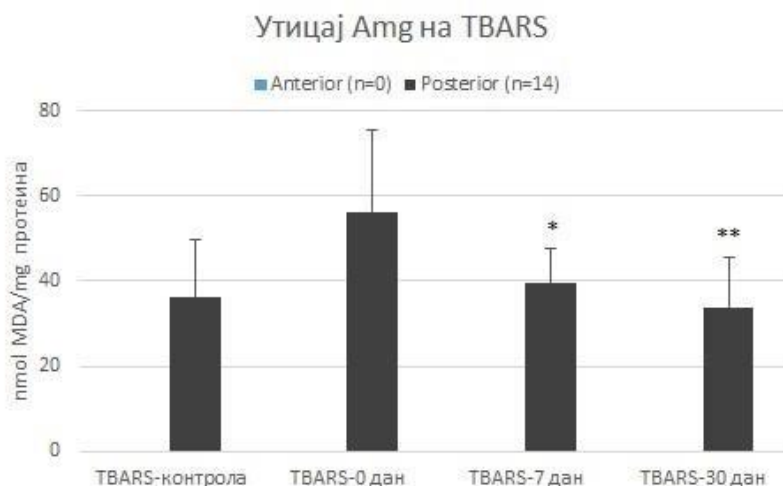
Параметри OS (GSH, липидна пероксидација (MDA, односно TBARS) и активност SOD у GCF представљени су у односу на позицију зуба (предњих и задњих) код испитаника са примењеним различитим денталним ресторативним материјалима. Утицај анализираних рестаурација на GCF редокс статус испитаника је представљен графиконима 6-12.

Утицај Amg на GCF редокс статус испитаника је представљен графиконом 6 (Графикон 6 а-с)



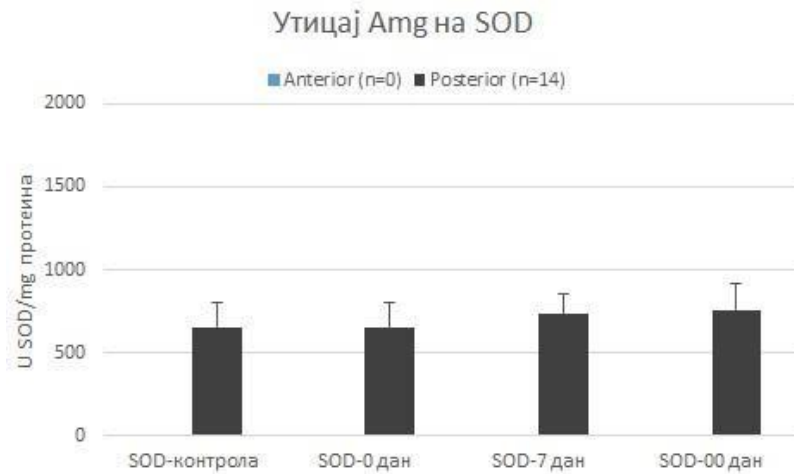
Графикон 6 а. Утицај Amg на ниво GSH у GCF испитаника

Легенда: Amg- група: Само испитаници са каријесом на задњим зубима су третирани (n=14): 8 су била из K2 и 6 из K5 групе. Количина апликованог Amg:  $1.318571 \pm 0.71267$  g. Садржај GSH је изражен као nmol TNB /mg протеина.



Графикон 6 б. Утицај Amg на ниво липидне пероксидације у GCF испитаника

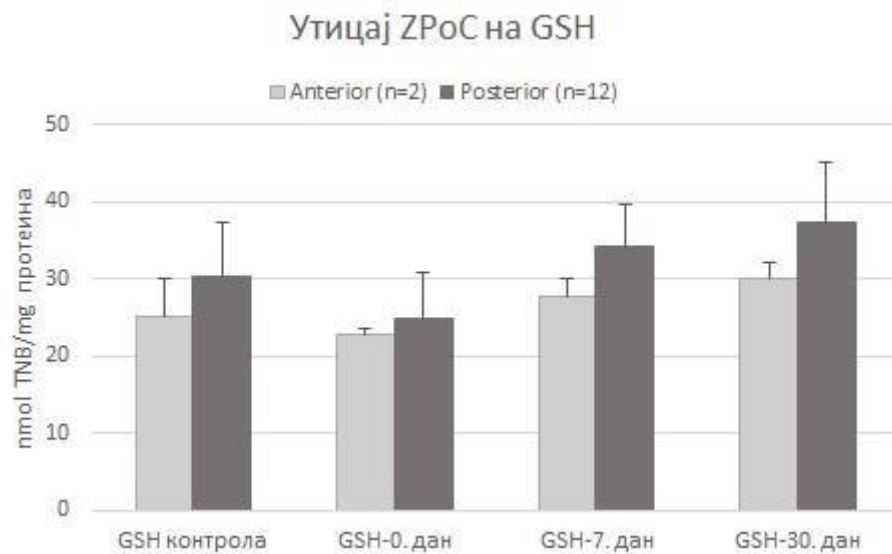
Легенда Погледати легенду Графикона 6 а. Ниво LPO је изражен преко TBARS, односно nmol MDA/mg протеина.



**Графикон 6 с.** Утицај Амг на активност SOD у GCF испитаника

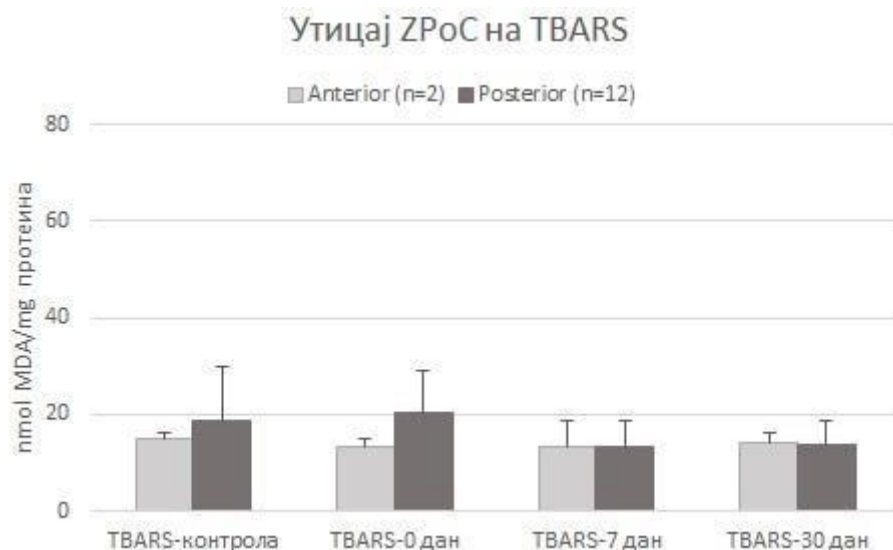
Легенда: Погледати легенду Графикона 6 а. Активност *tSOD* је представљена као *U SOD/mg* протеина

Утицај ZPoC на GCF редокс статус испитаника је представљен графиконом 7 (Графикон 7 а-с).



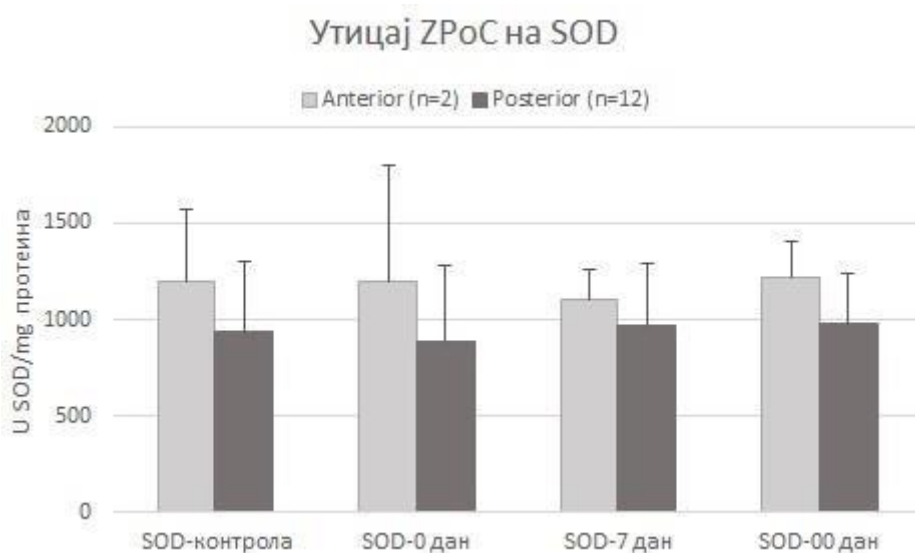
**Графикон 7 а.** Утицај ZPoC на ниво GSH у GCF испитаника

Легенда: Пацијенти са предњим и задњим леченим зубима ( $n=14$ ): 12 пацијената са леченим задњим зубима (3 из K2, 4 из K3 и 5 из K4 групе) и 2 пацијента са леченим предњим зубима (2 из K2 групе). Количина апликованог ZPoC за предње:  $0.035 \pm 0.025$  g и задње зубе  $0.229 \pm 0.167$  g. Садржај GSH је изражен као *nmol TNB /mg* протеина.



**Графикон 7 б.** Утицај ZPoC на липидну пероксидацију у GCF испитаника

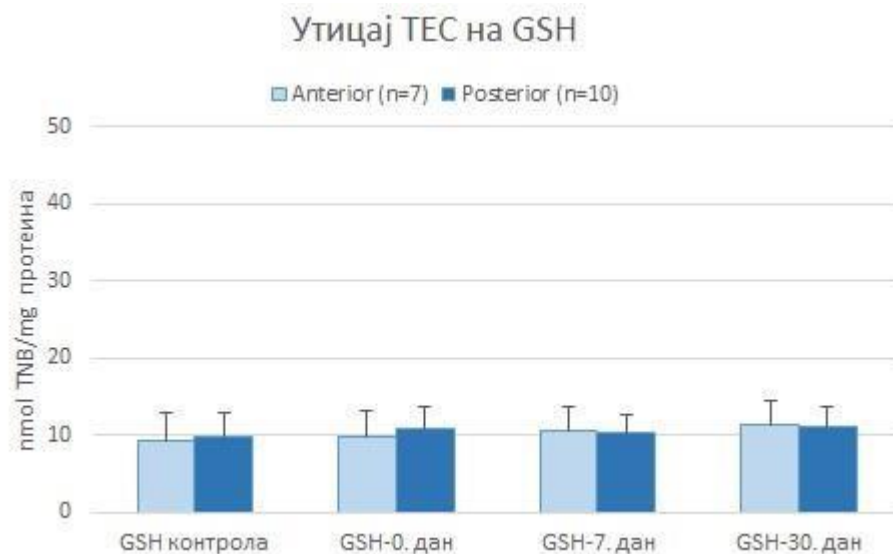
*Легенда: Погледати легенду Графикона 7 а. Ниво LPO је изражен преко TBARS, односно nmol MDA/mg протеина.*



**Графикон 7 с.** Утицај ZPoC на активност SOD у GCF испитаника

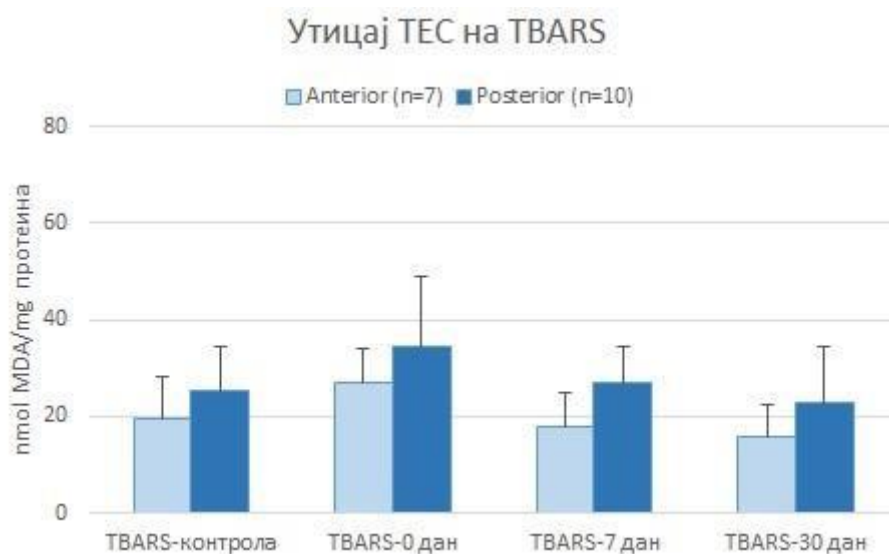
*Легенда: Погледати легенду Графикона 7 а. Активност tSOD је представљена као U SOD/mg протеина*

Утицај ТЕС на GCF испитаника је представљен графиканом 8 (Графикон 8 а-с).



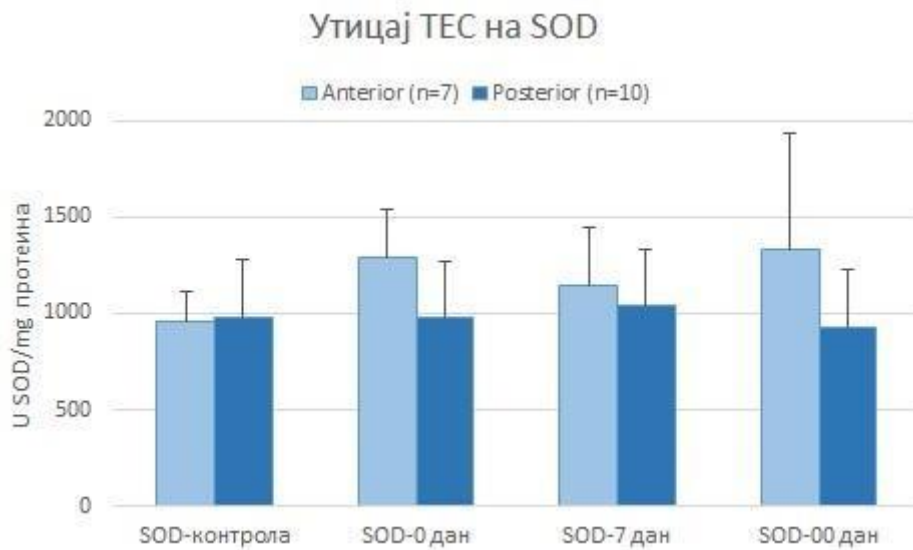
**Графикон 8 а.** Утицај ТЕС на ниво GSH у GCF испитаника

*Легенда: Пацијенти са предњим и задњим леченим зубима (n=17 пацијената): 10 пацијената са леченим задњим зубима (6 из K2 и 4 из K5 групе) и 7 пацијената са леченим предњим зубима (6 из K2 и 1 из K5 групе). Количина апликованог ТЕС за предње  $0.029 \pm 0.02253$  g и задње зубе  $0.152 \pm 0.159$  g. Садржај GSH је изражен као nmol TNB /mg протеина.*



**Графикон 8 б.** Утицај ТЕС на липидну пероксидацију у GCF испитаника

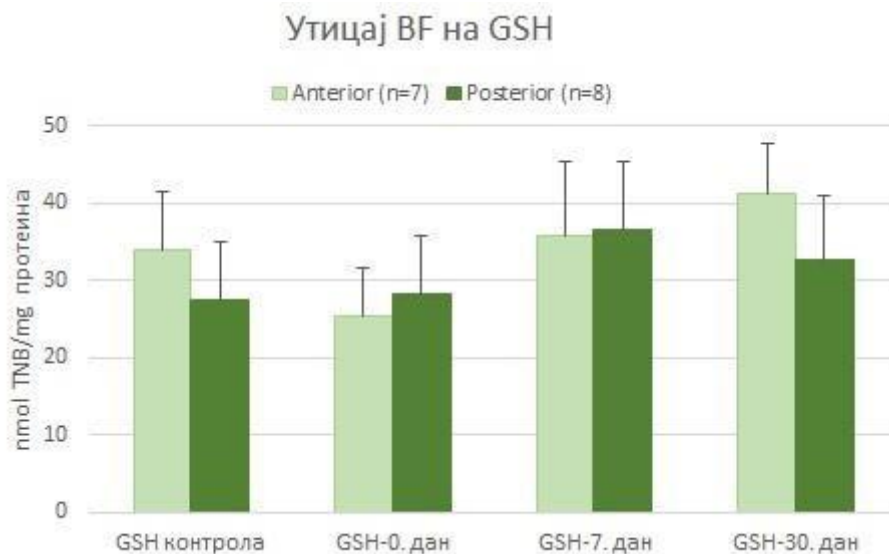
*Легенда: Погледати легенду Графикона 8 а. Ниво LPO је изражен преко TBARS, односно nmol MDA/mg протеина.*



**Графикон 8 с.** Утицај ТЕС на активност SOD у GCF испитаника

*Легенда: Погледати легенду Графикона 8 а  
Активност tSOD је представљена као U SOD/mg протеина*

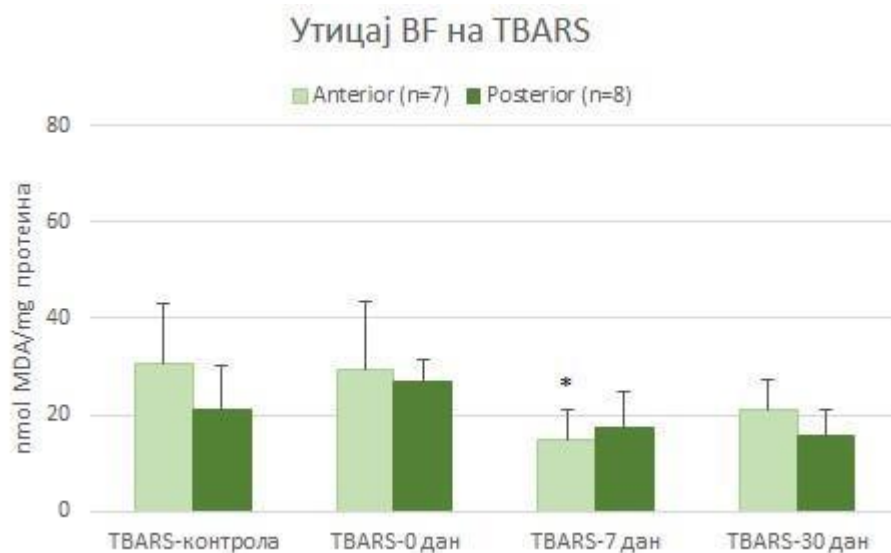
Утицај BF на GCF испитаника је представљен графиконом 9 (Графикон 9 а-с).



**Графикон 9 а.** Утицај BF на ниво GSH у GCF испитаника

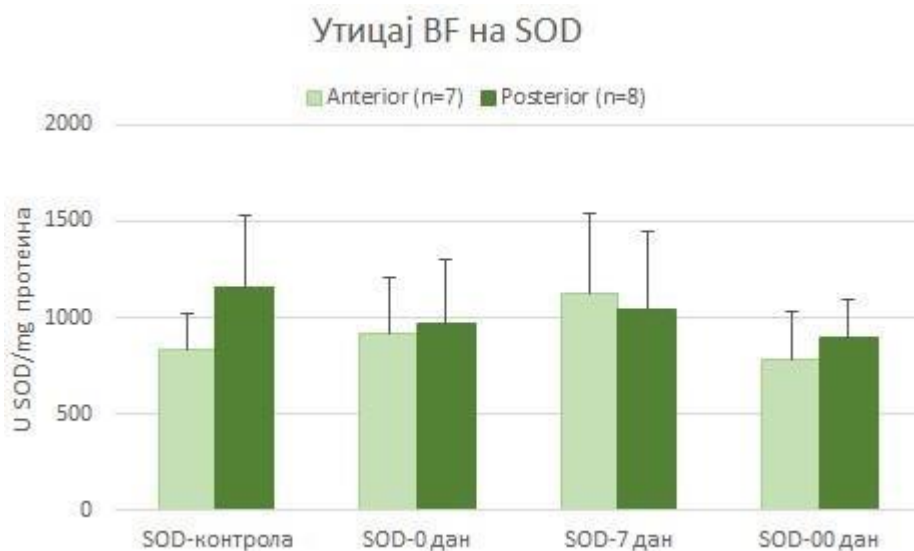
*Легенда: Пацијенти са предњим и задњим леченим зубима (n=15): 8 пацијената са леченим задњим зубима и 7 са предњим зубима (сви из K2 групе). Количина утрошеног BF за предње: 0.029±0.014 g и 0.064±0.042 g за задње зубе. Садржај GSH је изражен као nmol TNB /mg протеина.*





**Графикон 9 б.** Утицај BF на липидну пероксидацију у GCF испитаника

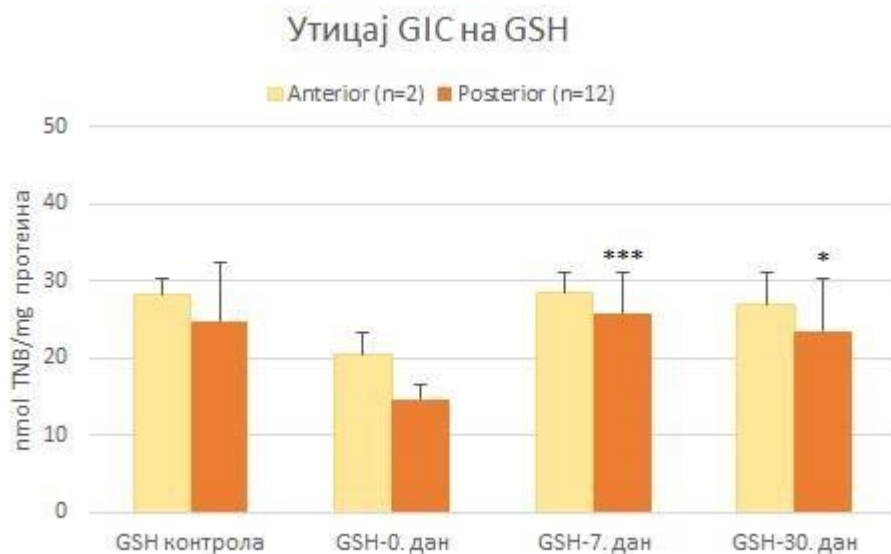
*Легенда: Погледати легенду Графикона 9 а.  
Ниво LPO је изражен преко TBARS, односно nmol MDA/mg протеина.*



**Графикон 9 с.** Утицај BF на активност SOD у GCF испитаника

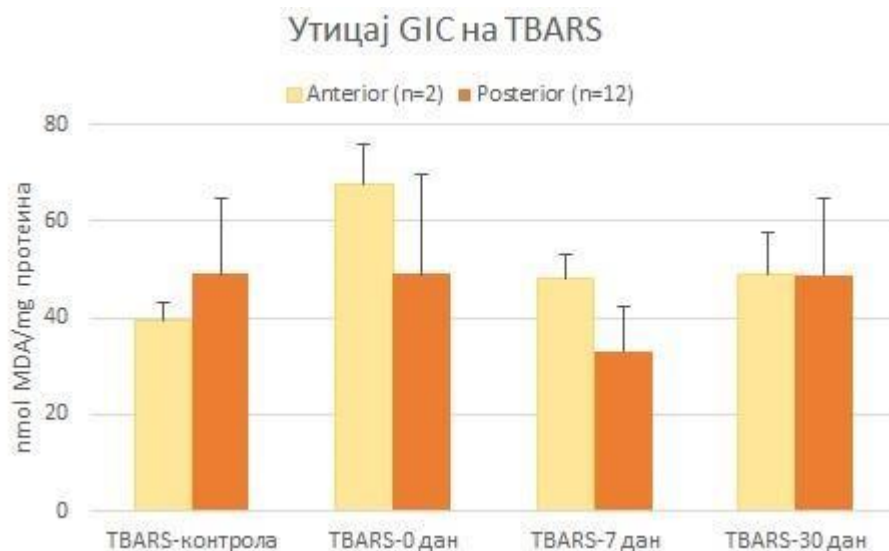
*Легенда: Погледати легенду Графикона 9 а. Активност tSOD је представљена као U SOD/mg протеина*

Утицај GIC на GCF испитаника је представљен графиком 10 (Графикон 10 а-с).



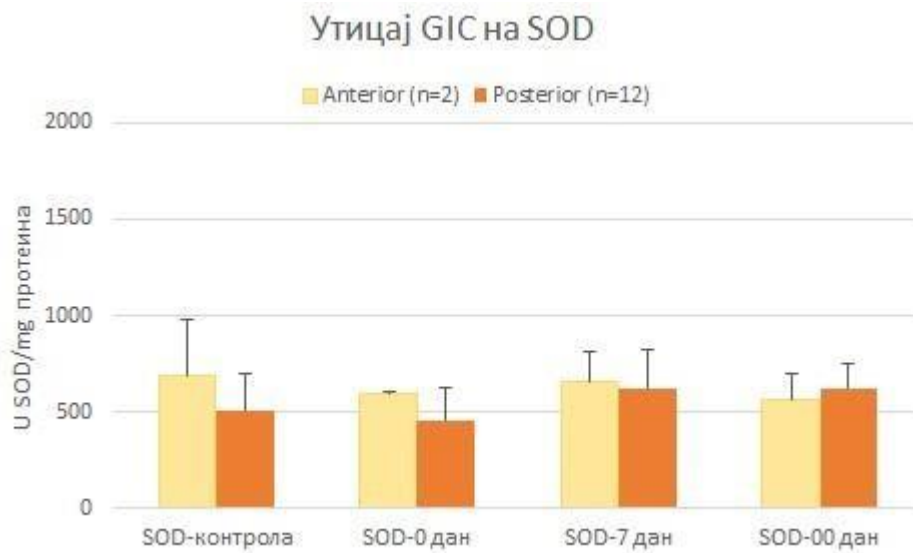
**Графикон 10 а.** Утицај GIC на ниво GSH у GCF испитаника

*Легенда: Пацијенти са предњим и задњим леченим зубима (n=14): 12 пацијената са леченим задњим зубима (9 из K2, 2 из K3 и 1 из K5 групе) 2 пацијената са леченим предњим зубима, из K2 групе. Количина утрошеног GIC за предње  $0.035 \pm 0.015$  g и  $0.168 \pm 0.153$  g за задње зубе. Садржај GSH је изражен као nmol TNB /mg протеина.*



**Графикон 10 б.** Утицај GIC на липидну пероксидацију у GCF испитаника

*Легенда: Погледати легенду Графикана 10 а. Ниво LPO је изражен преко TBARS, односно nmol MDA/mg протеина.*

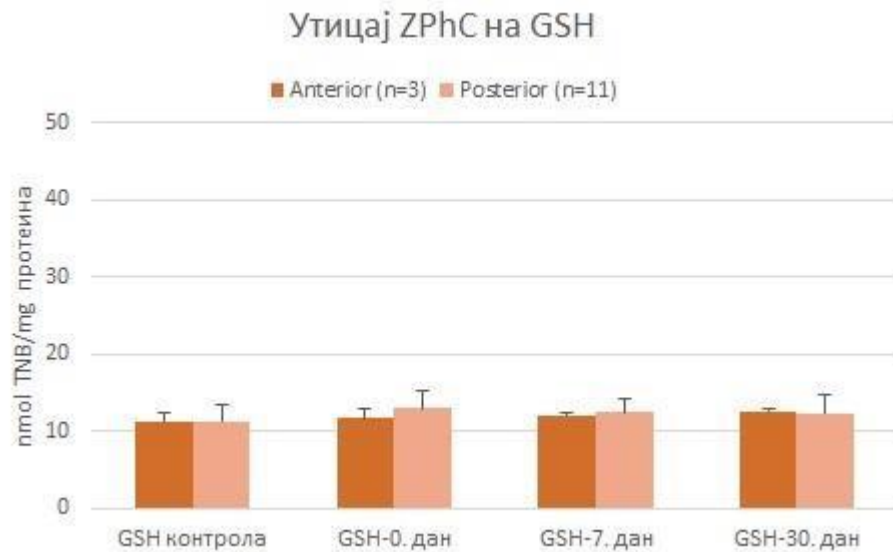


**Графикон 10 с.** Утицај BF на активност SOD у GCF испитаника

*Легенда: Погледати легенду Графикона 10 а. Активност tSOD је представљена као U SOD/mg протеина*

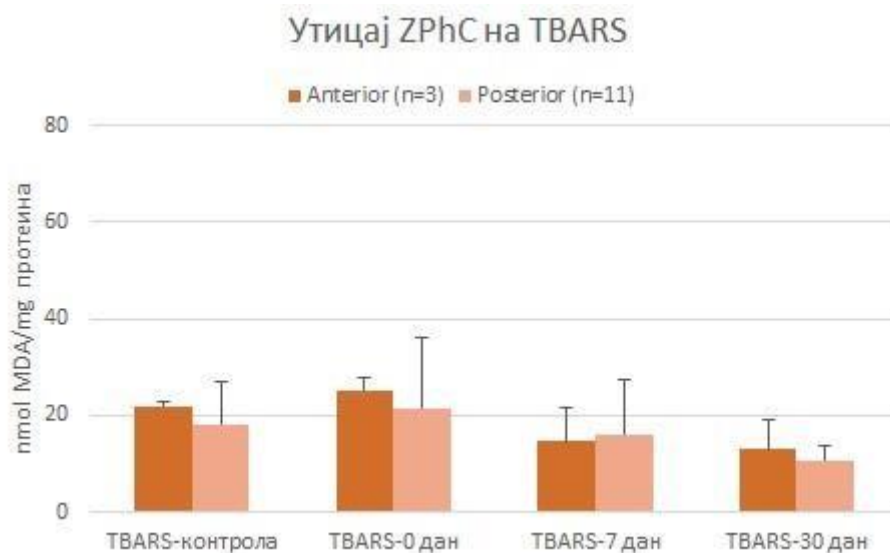
Утицај ZPhC на GCF редокс статус стоматолошких пацијената

Редокс статус испитаника је представљен графиком 11 (Графикон 11 а-с).



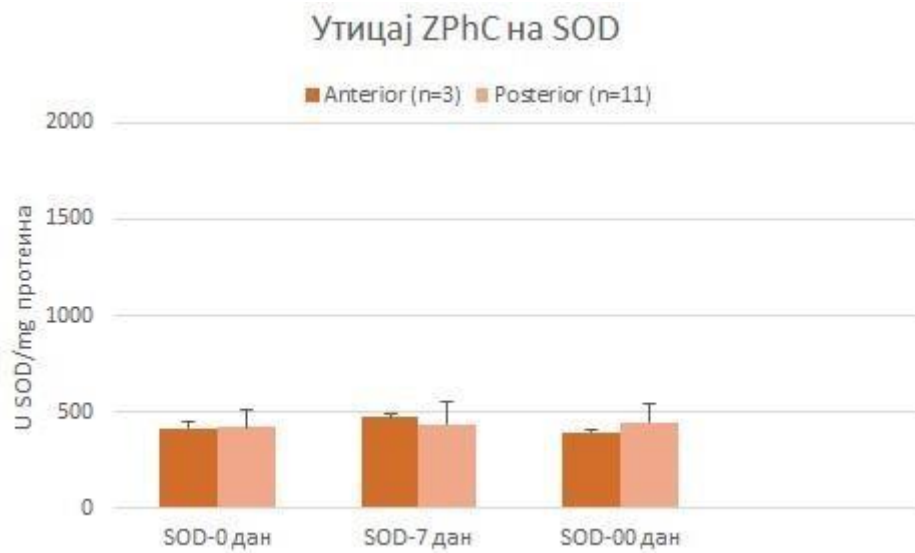
**Графикон 11 а.** Утицај ZPhC на ниво GSH у GCF испитаника

*Легенда: Пацијенти са предњим и задњим леченим зубима (n=14): 11 пацијената са леченим задњим зубима (5 из K2, 3 из K3, 1 из K4 и 2 из K5 групе) и 3 пацијената са леченим предњим зубима, (2 из K2 и 1 из K3 групе). Количина утрошеног ZPhC за предње  $0.08 \pm 0.081$  g и  $0.235 \pm 0.145$  g, за задње зубе. Садржај GSH је изражен као nmol TNB /mg протеина.*



**Графикон 11 б.** Утицај ZPhC на липидну пероксидацију у GCF испитаника

*Легенда: Погледати легенду Графикона 11 а. Ниво LPO је изражен преко TBARS, односно nmol MDA/mg протеина.*



**Графикон 11 с.** Утицај ZPhC на активност SOD у GCF испитаника

*Легенда: Погледати легенду Графикона 10 а. Активност tSOD је представљена као U SOD/mg протеина*

Поред овога испитивали смо утицај DRMs на редокс статус у GCF, током читавог времена (Графикон 12c). Показан је значајан утицај DRMs на OS параметре.

Статистички подаци (F вредност, p вредност) и значајне различите DRMs - групе ( $p < 0.05$ ) приказани су у табелама на десној страни слика. Највећи пораст нивоа tGSH остварен је код испитаника који су третирани ZPoC, BF и GIC пуњењима, док је највиши ниво tSOD нађен у случајевима леченим ZPoC и BF 30-тог дана.

Највећи пораст липидне пероксидације (TBARS вредност) је добијен код испитаника који су лечени GIC, 30-тог дана.

Анализом утицаја DRMs на OS статус (слика 3), видљиво је да су највећи пораст активности tGSH и tSOD постигли ZPoC и BF, док је LPO смањен готово свим DRMs са изузетком GIC, који је индуковало значајно повећање MDA 30-тог дана.

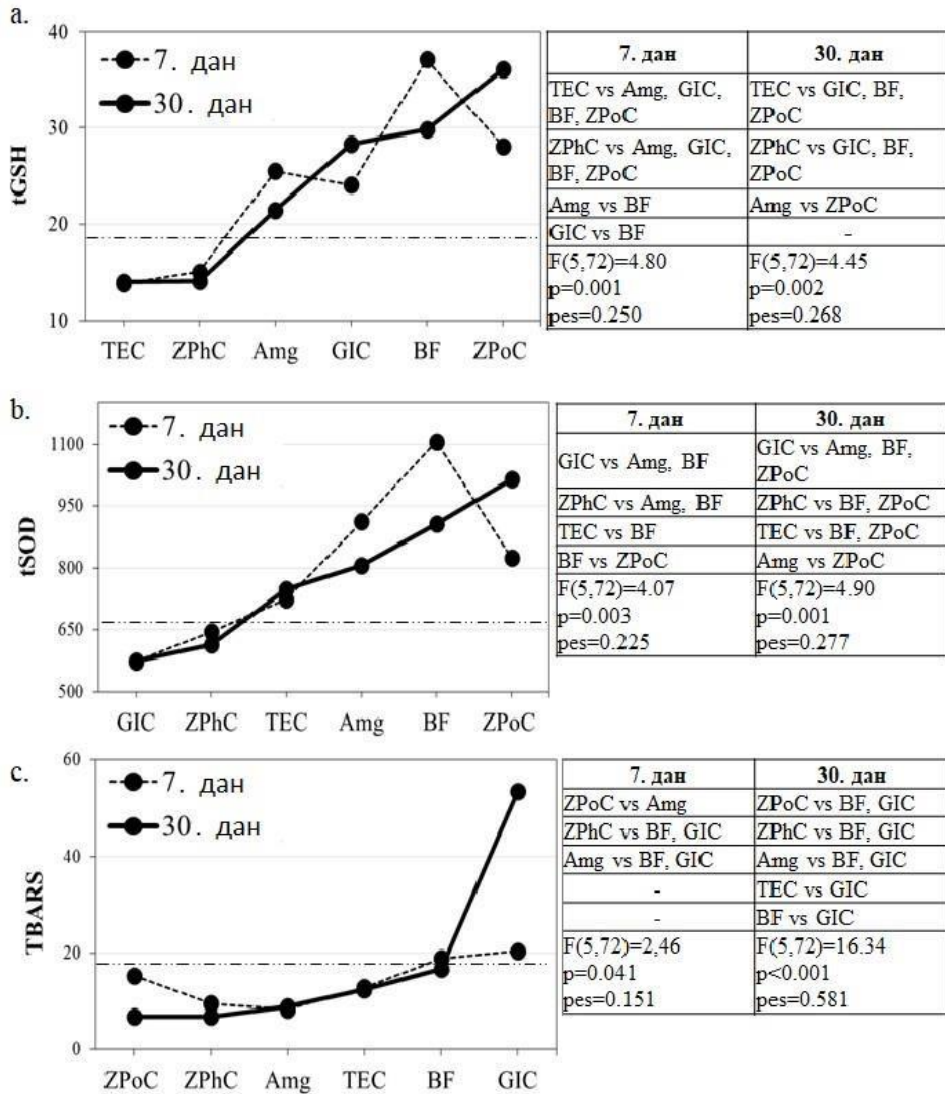
Утицај позиције третираних зуба на редокс статус 30-тог дана је тестиран код свих испитаника (слика 4). Већа активност tSOD је била код предњих у односу на задње зубе 30-тог дана ( $p = 0.018$ ) (слика 4).

Такође тестирана је повезаност количине за испуне на OS параметре, али није потврђена повезаност. Добијена је значајна корелација између количине за испуне и положаја зуба (*Pearson* корелација: 0.307,  $p = 0.004$ ).

Већа вредност активности tSOD је испољена на предњим зубима у поређењу са бочним зубима 30-тог дана ( $p = 0.018$ ).

Није уочена повезаност између тежине испуна и OS параметра.

Значајна корелација је добијена између тежине испуна и позиције зуба (Табела 3) (*Pearson* корелација: 0.307,  $p = 0.004$ ).



**Графикон 12.** Утицај рестаурација на OS параметре пре и након третмана

Легенда: Процењена маргинална средња вредност за OS параметре у GCF, 7-ог и 30-тог дана у односу на 0-ти дан (хоризонтална линија: дуга црта са тачкама). У односу на примењени материјал за рестаурацију: а) GSH коваријанта у 0-том дану је била 19.3  $\mu\text{mol TNB/mg}$  протеина; б) tSOD коваријанта у 0-том дану је била 665.6 U/mg протеина; в) TBARS коваријанта у 0-том дану је била 17.8  $\mu\text{mol MDA/mg}$  протеина. Дистрибуција пацијената кроз К групе и ресторативне групе је дата у табели (Табела 2). 7-ми и 30-ти дан су представљени испрекиданом, односно пуном линијом. Табеле на десној страни показују разлике (p values) у OS параметрима између ресторативно третираних група: делимично етажирано. Користићена је 2x2 анализа коваријансе (ANCOVA) и пост-хок поређења (најмање значајна разлика, LSD)  $p \leq 0.05$  је сматрана статистички значајном.

## 5. ДИСКУСИЈА

Последњих година, истраживања у области стоматологије фокусирана су на анализу гингивалне течности са циљем да се идентификују потенцијални валидни биохемијски маркери активности инфламацијских процеса око зуба (2, 5). Резултати истраживања у последњих двадесет година показала су удруженост оксидативног стреса и различитих патолошких стања у усној шупљини (38, 39, 59). Новије студије у којима се испитује редокс статус у микроокружењу уста углавном се односе на активност пероксидазе у сливи (39,47,60,61,62). Вођени чињеницом да је гингивална течност сваког појединачног зуба значајно мање експонирана системским утицајима из околине у односу на салу и да прецизније рефлектује стање тврдих и меких ткива у непосредној близини одабрали смо гингивалну течност као погодан узорак за ову врсту истраживања (63). У овом истраживању испитивали смо утицаје денталног каријеса *per se* и примењених трајних/привремених денталних испуна на редокс статус GCF, мерењем репрезентативних ONS маркера, као што су tSOD, TBARS и tGSH.

Оксидоредукциони статус коштаног ткива зуба, сливе и GCF се разликује (38, 58). У студијама где су разматрани различити ресторативни материјали и њихови редокс статуси проучавана је углавном салу (мерени су NO, MDA, 8-хидрокси -2'-деокси гуанозин) (39-41, 43, 63). Узимајући у обзир састав и локалитет анатомнофункционалних својстава GCF, уочава се значај могућности праћења локалних процеса око зуба и пародонталних ткива у окружењу, за разлику од сливе која је изложена и свим локалним утицајима, хране у устима, излучевинама пљувачних жлезда, као и системским утицајима (физиолошки, инфламаторни, инфективни) (63).

С обзиром да је GCF настала филтрирањем из крзна гингиве у гингивалном епителу, она поред ендогених репрезентата ONS садржи имуноглобулине класе IgG, IgA, IgM, албумине, аминокиселине, фибриноген, лизозоме и ензиме. Адхезију епитела за површину зуба омогућавају плазма протеини који се налазе у GCF. С обзиром да GCF помаже у испирању сулкуса бактерија, уједно може бити подлога за размножавање бактерија и реминерализацију већ створеног плака. Пошто се процеси који се дешавају у зубу рефлектују и у непосредном окружењу, нађено је да је GCF у непосредној близини зуба најпоузданији орални дијагностички медиј за мерење редокс статуса зуба захваћених каријесом или одговора на примењен начин лечења зуба (45,46).

Разликовање између/унутар предњих (секутића и очњака) и задњих зуба (премолара и кутњака), повезано је с положајем зуба, величином, обликом, карактеристикама корена, функцијама повезаним са притиском код угриза и осталим физиолошким и патолошким стањима и утицајима што све заједно резултира појединачним физиолошким профилем зуба. Зато су коришћене као контроле здрави антагонисти, који су као одраз у огледалу у односу на третиране зубе и били су адекватни за процену редокс поремећаја статуса зуба захваћених каријесом, унутар класификованих К-категија.

Касније, након ресторације, коришћене су вредности 0-ог дана сваког појединачног зуба као полазна тачка за процену утицаја примењених рестаурација на појединачан зуб током наредних 30 дана.



Недавно је у истраживањима истакнуто разликовање утицаја појединих зуба (на основу специфичности профила зуба) на имунски статус GCF (64).

На основу тога уочено је да и у случају оксидоредуктивног статуса GCF, постоје варијације у вредностима измерених параметара ONS у зависности од примењених ресторативних материјала у свакој K - групи.

## 5.1. КАРИЈЕС И OS

Каријес се данас схвата као бактеријско обољење денталних чврстих ткива, која представља финални стадијум локалног имунског одговора на инвазију оралних патогена. Показано је да је локална антиоксидансна одбрана против фактора околине изузетно важна у периодонталној болести (61).

Оксидативни стрес представља неспособност антиоксидативног одбрамбеног система да се у живим организмима изборе са неконтролисаним, прекомерном продукцијом слободних радикала, која резултује у оксидативној повреди свих класа биомолекула, укључујући протеине, липиде, фосфолипиде и дезоксирибонуклеинску киселину. До сада су се биопродукти ових реакција углавном пратили у саливи као маркери оксидативног стреса, не узимајући у обзир различитост примењених ресторативних материјала за санирање каријеса. Резултати *in vitro* студија показали су да материјали денталних испуна коришћени за терапију каријеса покрећу значајан локални биолошки одговор манифестован продукцијом бројних медијатора и оксидоредукционих параметара (65). Самим тим у доступној литератури нема компаративних резултата који би одговарали дизајну ове студије.

Истраживањем смо утврдили да се ONS у GCF-у поред суседних зуба са каријесом развија упоредо са степеном захваћености ткива инфламацијом, од K2 - K4, што је засновано на значајно сниженом нивоу tGSH и активности SOD ( $p=0.043$  за оба, у групи K4) и повећаној вредности LPO (ниво MDA).

Ендодонтски третман зуба претходно изведен у K5 групи довео је до губитка централног крвотока, праћеног смањеним метаболичким процесима зуба (који је и даље повезан са телом преко пародонталне мембране и цемента).

Коренски канали су област зуба са највећом концентрацијом крвних судова, нерава и везивног ткива и везивног ткива у односу на површину (61). У K5 групи, tGSH и tSOD није се узимала у обзир активност контролне групе (здрави антагонисти), док је LPO била незначајно повећана ( $p=0,074$ ), као у K4 групи.

Висока LPO указује на оксидативна оштећења липидних компоненти ћелијских мембрана, те њихов нарушен интегритет и функцију. Добијени резултати јасно указују на важност и пресудну улогу виталитета зуба у смислу одржавања функционалности и здравља зуба, о чему има доста података, али овакав начин истраживања пружа могућност мерљивости параметара антиоксидативне одбране. У групи K5 је уочен највећи степен антиоксидативне одбране у непосредној близини маргиналне гингиве зуба.

## 5.2. КАРИЈЕС И SOD, O<sub>2</sub><sup>•</sup>, LPO

Изазов нам је био да пратимо активност tSOD-а, будући да се данашња сазнања углавном базирају на истраживањима са саливом, саливарној пероксидази која разлаже H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, произведен од бактерија. Недовољна активност пероксидазе може резултирати стварањем хипотиоцијанатне киселине и/или хипотиоцијанита (реакција између неразложеног H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и тиоцијанатних јона). Хипотиоцијанитни облици показују антимикробно деловање прекидајући енергетски метаболизам бактерија кроз реакцију са -SH групама гликолизних бактеријских ензима (хексокиназа, алдолаза и пируват киназа). Друга пероксидаза, мијелопероксидаза, ензим зависан од хема смештен у леукоцитима (неутрофилима и моноцитима), катализује оксидацију хлорида посредством H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у хипохлорну киселину, која уништава патогене (14, 30, 49).

Више од 80-90% кисеоника (O<sub>2</sub>) претвара се у O<sub>2</sub><sup>•</sup> у фагоцитима током „оксидативног праска“ (уништавање фагоцитованог патогена) (36). Ослобођен из фагоцита у околно ткиво, O<sub>2</sub><sup>•</sup> се посредством SOD-а конвертује у H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, или неензиматски реагује са молекулима као што су NO<sup>•</sup> при чему настаје штетни пероксинитратни анјон (ONOO<sup>-</sup>). Реакција стварања ONOO<sup>-</sup> се спонтано дешава због три пута јаче израженијег афинитета рекатанта од реакције ензимске трансформације O<sub>2</sub><sup>•</sup> у H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (14).

Открили смо смањену активност tSOD-а у групама K2 - K4 у поређењу са контролним вредностима што до сада није разматрано и проучавано на овакав начин када су у питању каријесне лезије. Степен инхибиције tSOD-а расте са степеном деструкције зубне круне изазване каријесом (K4 група, p=0,043).

Смањена tSOD активност може бити повезана са неколико фактора:

а) посттранслационом модификацијом метаболичког пута синтезе протеина (ацетилација аминокиселина) посредством ензима грам негативних анаероба, као што су *Phoryromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*;

б) смањеним нивоом релевантних метала који улазе у његов састав (бакар, цинк, манган), што се дешава код пародонталних болести; (66)

в) недовољном нивоу супстрата (O<sub>2</sub><sup>•</sup>), што се на пример догађа у реакцији стварања ONOO<sup>-</sup>, од стране O<sub>2</sub><sup>•</sup> и NO<sup>•</sup> (67).

Промењена ћелијска сигнализација (активност кардиолипин/цитохром Ц пероксидазе у митохондријској мембрани повезана је са оксидацијом и конформацијским променама фосфолипида што се одржава на морфологију спољњег слоја ћелијских мембрана – а то је сигнал препознавања за унос фагоцитираних апоптотских ћелија).

Липидна пероксидација и измењене липидне мембране су типичне за оксидативно оштећење ћелија, подлеглих апоптози и инфламацији (33, 68). Дакле, инфламација се преваходно јавља код каријеса, те треба истаћи да проинфламаторни цитокини (интерлеукин 1 (IL-1), фактор некрозе тумора алфа (TNF $\alpha$ ), интерферон гама (IFN $\gamma$ )) обезбеђују прекомерну продукцију RNS појачавањем активности индуцибилне азот оксид синтазе (iNOS) (68-70). Војводић и сар. (2016) су показали да IL9 у GCF може бити прихваћен као мера одговора одонтобласта на проширеност зубног каријеса, која је

повезана са редокс статусом (71). Дакле, редокс осетљив транскрипциони фактор који се такође може сматрати фактором одговора на OS (72).

Металопротеиназа, као што је NADPH оксидаза регрутованог фагоцита са пероксидазном функцијом, доприноси LPO и инфламацији (73, 74).

Количина генерисаног  $H_2O_2$  је позитивно повезана са активношћу tSOD-а, јер катализује оксидоредукцију (дисмутацију) у  $H_2O_2$ . У погледу LPO, добро је познато да  $O_2^{\bullet-}$  (SOD супстрат) није довољно потентан да је може покренути, за разлику од  $HO^{\bullet}$ . Познато је да се  $HO^{\bullet}$  може произвести хомолитичким цепањем  $H_2O_2$  или Фентон-реакцијама у организму.

Поред ћелија ткива, аеробне и факултативне бактерије производе SOD ради одбране од ROS (69). Овде смо потврдили позитивну повезаност између степена зубне лезије и LPO, а негативне корелације са активношћу tSOD. Најнижа активност tSOD и највиши ниво MDA нађени су у групи K4, што се може објаснити и упалним / имунским одговорима и токсичним производима аеробних бактерија, као и чињеницом да се  $O_2^{\bullet-}$ , настао током фагоцитозе не уклања адекватно (неактивна SOD).

Изражени LPO у GCF-у поред невиталних зуба, у групи K5, се тумачи неадекватним снабдевањем крвљу и минимизираним метаболичком функцијом зуба, док, у највишем степену развијен OS у K4 групи тумачимо управо *per se* ефектом зубног каријеса.

### 5.3. КАРИЈЕС И GSH

Снижавање нивоа GSH у GCF с порастом повреде зубне лезије (значај је постигнут у групи K4,  $p=0,043$ ) се може објаснити и аеробним и/или анаеробним путевима као код пародонтопатије где је уочено профилисање промена у саливарном редокс статусу у одговору на инфламацију и оксидативни стрес у пародонтопатији. Промене локалног редокс потенцијала значајно доприносе пародонтопатији кроз модулацију GSH метаболизма у одговору на инфламацију и оксидативни стрес (74).

Показано је такође смањење GSH у саливи код пародонтопатије, и то без претходно третираних пародонтопатичних зуба (35,36,51-54). Ниски нивои GSH могу се приписати: а) његовој недовољној синтези када нема глутамин у довољној количини (код анаеробних инфекција);

б) с обзиром да је најзначајнији ендогени антиоксиданс, троши се током OS (у редокс реакцијама катализованих глутатион пероксидазом, при чему се оксидује до своје дисулфидне форме (GS-SG));

в) затим GSH се троши у реакцијама тиолизације (катализоване GSH-трансферазом) или током хелирања метала;

г) ако је недовољно активна глутатион редуктаза, ензим који је одговоран за регенерацију GSH, тако што трошећи NAD(P)H катализује редукцију GS-SG до GSH, те тако овај ензим подржава антиоксидативну улогу GSH (75, 76).

Ниво GSH био је незнатно виши у групи K5 у поређењу са контролним зубима. До смањења GSH у K5 групи није дошло као у осталим K групама, вероватно због смањених метаболичких активности.

#### 5.4. ДЕНТАЛНИ МАТЕРИЈАЛИ

Нова генерација привремених испуна на бази смоле обично се састоји од олигомерне матрице бифенол-А-диметакрилат (BisGMA), триетилен-гликол-диметакрилат (TEGDMA), 2-хидроксиетилметакрилат (HEMA) или уретандиметакрилат (UEDMA) и неорганске честице силике. Непотпуна полимеризација DRCs ствара услове микропродора метакрилских мономера у међупростор зуба и материјала изазивајући локалне или системске штетне ефекте (77, 78).

Забележени су штетни, а не позитивни учинци дуготрајно ослобођених мономера/супстанци за испирање (79). Након ерозије и разградње, компоненте које се могу испирати могу дифундовати у пулпу кроз сулкусну течност и временом могу изазвати штетне ефекте (80). Због ретракције зубних испуна бактерије се могу колонизирати у међупросторима између њих и зуба. Такође, присутни микроби могу произвести киселине и токсине одговорне за повреду пулпе (81).

У овој студији, примењени су следећи композити код наших стоматолошких пацијената: BF (који садрже мономера: BisGMA 15-25% and TEGDMA 12-14%) и TEC (BisGMA и UEDMA 2.5-10 %, сваки). Композити BisGMA-базирани могу ослободити нечистоће као што су бифенол А (BPA), који је такође хемијско биолошки производ разлагања бифенол А диметилакрилата (BisDMA). Потврђено је да испољава ендокрионтоксични ефекат (82). У групи метакрилата, HEMA и TEGDMA задржавају највећи сензибилизациони потенцијал (83). Формалдехид (реактивни хаптен) и глутаралдехид које се јављају током полимеризације композитних материјала или одређених адхезива се класификују као "значајни контакт алергена". Алергија на формалдехид се манифестује као астма или продужен гингивитис, због своје споре елиминације (задржава се у телу до 115 дана после третмана) (84).

TEGDMA повећава ниво нуклеарног фактора капа В (NF-κB) блокирањем фосфатидилинозитол 3-киназе (PI3-K) и активацијом митоген-активирајуће протеин киназе (МАРК) (85). До сада су испитивани генотоксични ефекти композитних мономера (HEMA), TEGDMA, глицидил метакрилат (GMA), UEDMA, BisGMA] или других метаболита бис-2,3-дихидроксипропил (BADPE-4OH) на бактеријама и ћелијама сисара, хуманим фибробластима коже, пулпи фибробласта и лимфоцитима.

#### 5.5. ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И ДЕНТАЛНИ МАТЕРИЈАЛИ

Оксидативни стрес представља неспособност антиоксидативног одбрамбеног система да се у живим организмима изборе са неконтролисаним, прекомерном продукцијом слободних радикала, која резултује у оксидативној повреди свих класа биомолекула,

укључујући протеине, липиде, фосфолипиде и дезоксирибонуклеинску киселину. Различите класе CP (реактивни кисеоник, азот, сумпор или угљеникови деривати) могу иницирати одговарајући тип стреса, оксидативни, нитрозативни, тиолски или угљенични (ROS, RNS, RSC or RCC)(34). Последице могу бити различитих нивоа, од измењене ћелијске сигнализације и промене енергетског статуса ћелије, до смрти ћелије, најчешће путем апоптозе (14).

Оксидативно оштећење DNK настаје оксидацијом база или разбијањем ланаца (потврђена *Comet* есејем) или изазивањем хромозомске промене са формирањем микронуклеуса (36, 86).

У погледу прооксидативних и/или антиоксидативних ефеката неполимеризованих мономера, Обрадовић-Ђуричић и Ђукић и сарадници дошли су до закључка (2013) да BisDMA, BisGMA, TEGDMA и UEDMA у комбинацији са витамином Е (д-токоферол) смањује пероксидазну активност сут с/кардиолипин комплекса, синергистички, на дозно зависан начин у *in vitro* студији (87). Иако се мала количина невезаних мономера (1.55%) ослобађа из DRCs током времена (због непотпуне UV полимеризације) довољно је да неки од њих доведу до локалних цитотоксичних ефеката, што је једна од манифестација био-некомпатибилности DRC (88, 89). Дифундујући кроз дентин, TEGDMA доспева у пулпу и ремети физиолошку редокс хомеостазу ткива, манифестујући цитотоксични ефекат, чак и у субтоксичним концентрацијама (<4 mM) (79, 89, 90). Хумана гингивална фибробластна апоптоза је уочена при TEGDMA токсичним концентрацијама (TC50 1.2 mM) (79, 90, 91). У овом истраживању уочено је највеће повећање садржаја GSH и активности tSOD 30-тог дана код K3 и K4 групе, док је LPO највећа у K4 групи, код примењених третмана. Процент пацијената са примењеним привременим испунама унутар K3 и K4 група је ZpC: 40 и 83%; ZPhC: 40 и 17% и GIC: 20 и 0%. Потврђен је преовлађујући позитиван утицај привремених испуна (ZPoC, ZPhC) на редокс баланс у односу на негативан утицај каријеса *per se*. Полазна основа за процену утицаја примењених ресторативних материјала на појединачне зубе током следећих 30 дана рестаурације су вредности од 0-тог дана сваког појединачног зуба.

## 5.6. ТОКСИЧНОСТ DRCs И ОКСИДАТИВНИ СТРЕС

Могућност ослобађања мономера од стране примењених DRCs је неколико стотина пута мања у односу на субтоксичне дозе. Применили смо ТЕС у опсегу од 10 - 500 mg (просечна вредност: 30 mg) и BF у опсегу од 20-140 mg (просечна вредност: 30 mg). Сходно примењеној количини DRCs и мономерној пропорцији унутар њега, израчуната количина мономера која може да се испусти из ТЕС би била 0.75 - 3 mg за оба, BisGMA (1.5 - 5.9  $\mu\text{mol}$ ) и UEDMA (1.6 - 6.4  $\mu\text{mol}$ ); и од BF, би била 4.5 - 7.5 mg (8.8 - 14.6  $\mu\text{mol}$ ) за BisGMA и 3.6 - 4.2 mg (12.6 - 14.7  $\mu\text{mol}$ ) за TEGDMA. Tetric EvoCeram је примењена на K2 (n=12) и K5 пацијентима (n=12), док је BF је примењен само на K2 пацијентима (n=15). Опсег хипотетички отпуштених TEGDMA мономера је процењен на 12.6 - 14.7  $\mu\text{mol}$  (из BF), што је 300 пута ниже у односу на пријављене субтоксичне дозе. *Pinar* и

сар. (2015) наводе да се мономери ослобађају из композита у саливи током 30 дана од третмана (92).

Уочени су ендокриротоксични ефекти Bis-GMA и TEGDMA мономера током дуготрајних излагања (смањују плодност и раст), док ВРА изазива оба, естрогене и антиандрогене ефекте (93, 94). Осим тога, велики проблем праве алергијске реакције, које варирају од анафилактичког шока, астме, симптома и тешких уртикарија по целом телу, црвенила и отока на лицу, до интраоралних симптома гингивитиса поред третираних регија оралног еритема и отока усне. Супстанце сличне TEGDMA модификују ћелије које учествују у хомеостазу реметећи редокс равнотеже; долази до промена механизма регулаторних фактора раста и пулпа-дентин комплексне функције, а уочено је и да утичу на секреторну активност одонтобласта. Треба нагласити да неполимеризовани мономери доприносе болестима пулпе фаворизујући пролиферацију кариогених микроорганизама (*S. mutans*, *S. salivaris*, *L. acidophilus*, etc.) (95).

Bisphenol A и његови деривати као што су, BisGMA, bisphenol-A-glycidyl-diacrylate (BAGDA) и bisphenol A ethoxylate dimethacrylate (BAEDM) битно утичу на активности цитохрома (сyt) P450 која учествује у оксидативном катаболизму једињења и може бити повезан са прекомерном продукцијом интраћелијског ROS (митохондријлни респираторни ланац) и утрошком ћелијских донора (NADPH, GSH) редукционих еквивалената (протон и електрон) (93, 96, 97).

Цитотоксични ефекти ресторативних материјала се такође приписују металним јонима (98). У нашој студији смо применили BF у наведеном износу (30 mg, медијана), који садржи алуминофлуоро-борсиликатно стакло 50-60% и Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1-2%. Познато је да алуминијумови јони (Al<sup>3+</sup>) могу да допринесу FRs хиперпродукцији, кроз учешће у Фентон-сличним реакцијама (64). Алуминофлуоро-борсиликатно стакло и Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> може изазвати преосетљивост код особа осетљивих на акрилат и метакрилат (99).

Глас-јономер цемент се састоји од флуороалуминосиликатног стакленог праха (сличног оном који се користи код силикатних цемената) и течне компоненте - полиалкеноичне киселине (комплекс акрилне, итакоичне и малеинске киселине, који такође може да се угради у прах). "Глас-полиалкеноатни цемент" је научни израз за GIC. То је ресторативни материјал на бази воде који постиже своју улогу кроз киселинско - базне реакције (за разлику од полимеризације код DRCs), хемијске адхезије и јоноизмењивачких принципа (вс. микромеханичка везаност за киселине-деминерализује глеђ и дентин DRCs) (100). Супротни, цитотоксични, ефекат GIC се односи на ослобађање јона метала, иако је позната добра биокомпатибилност GIC (79, 101, 102).

На крају, Amg (код сталних ресторативних пломби) отпушта елементарну живу (Hg<sup>0</sup>), што је преобладајући извор хуманог излагања неорганској Hg<sup>0</sup>. Елементарна жива је веома нестабилна и лако оксидише у Hg<sup>1+</sup> (mercurous) и токсичних Hg<sup>2+</sup> (mercuric), када може испољити токсични локални и системски ефекат (103). Могуће је да Hg<sup>1+</sup> учествује у Фентон реакцији (познато је да у Фентон реакцији метали са прелазном валенцом у својој редукованој форми реагују са H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и настаје најпотетнтнији прооксиданс, HO•, те се тренутно иницира OS) (14). Процењена је просечна дневна апсорпција између 2000 - 17000 ng зависно од броја Amg пуњења (104).

## 5.7. ЕФЕКАТ ДЕНТАЛНИХ МАТЕРИЈАЛА НА GSH

У доступној литератури нису нађени подаци о ефекту денталних материјала на GSH. У нашем истраживању највећи утросак GSH установљен је код пацијената третираних ZPhC и TEC. TetricEvoCeram садржи BisGMA (2.5-10%) и UEDMA (2.5-10%). С обзиром да је BisGMA садржај мањи у TEC него у BF (BisGMA: 15-25%) и чињеница да TEC садржи UEDMA не садржи TEGDMA [разлика BF: TEGDMA (12-14%)] предочили смо да је мономер UEDMA највећим делом одговоран за GSH смањење (испоставило се да BisGMA не омета GSH проток) (90).

Пошто је ниво GSH најнижи у K5 [(n=14): 5-TEC, 6-Amg, 1-GIC и 2-ZPhC] и K2 групе [(n=58): 12- TEC, 8-Amg, 5-ZPoC, 15-BF, 11-GIC and 7-ZPhC], утврдили смо да ZPhC и TEC утичу на утросак GSH (уз већ смањену циркулацију крви и прекомерни метаболизам, у K5 групи) што превазилази ефекте код ZPoC и BF.

Добијени резултати нису у складу с постојећом дозно-зависном цитотоксичношћу TEGDMA на хуманим фибробластима пулпе, повезаног са GSH смањењем и хиперпродукцијом FRs (105). Међутим, полиморфизам GSH цикличног ензима *in vivo* би требало бити повезан са индивидуалном осетљивошћу на TEGDMA молекулу (106, 107).

Највиши ниво GSH је добијен с ZPoC > BF ≥ GIC. Сходно K - групама, највиши GSH ниво је остварен у K3 > K4 групама [K3 (n=10): 4-ZPoC, 2-GIC и 4-ZPhC; K4 (n=6): 5-ZPoC и 1-ZPhC], што се објашњава протективним ефектом ZPoC. Такође, закључили смо да је Amg показао умерено повољно дејство, незнатно је повећао GSH. Полиморфизам GSH циклуса ензима *in vivo* треба повезати са индивидуалном осетљивошћу на TEGDMA молекулу (106, 107).

Највиши ниво GSH је добијен са ZPhC > BF > GIC. У погледу K-група, највиши нивои GSH су реализовани у K3 > K4 групама [K3 (n=10): 4- ZPhC, 2-GIC и 4- ZPhC; K4 (n=6): 5- ZPoC и 1- ZPhC], носећи ZPoC заштитни ефекат.

## 5.8. ЕФЕКАТ ДЕНТАЛНИХ МАТЕРИЈАЛА НА SOD

Улога SOD у патолошким стањима зуба још није утврђена. На основу података из литературе могло се очекивати да примењени материјали за денталне испуне могу индуковати и про-оксидативну и анти-оксидативну локалну активност (108).

По аналогији са оствареним ефектом на ниво GSH, најнижа tSOD активност постигнута је захваљујући ZPhC > GIC, а највиша с ZPoC > BF, 30-ти дан. Повећање tSOD активности применом BF (за разлику TEC) може бити на рачун Al<sup>3+</sup> присутног у BF (и евентуално повећаног формирања O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). TetricEvoCeram и Amg повећавају незнатно tSOD активност у односу на вредности 0-тог дана.

Најнижи ниво GSH и активности tSOD у K5 групи (пацијенти чији су зуби ендодонтски третирани) пре и након денталне рестаурације показују очигледан утицај недовољног

снабдевања крви и метаболизма на физиолошки профил у непосредном оралном окружењу (GCF) укључујући потенцијал опоравка оштећеног ткива.

Највећа tSOD активност остварена је у K3 и K4 групи. Број пацијената третираних са ZPoC (n=4) био је једнак између ове две групе, док је број пацијената третираних ZPhC преовладала у K3 (n=4) у односу на оне у K4 (n=1). Можда је објашњење за њихов супротан ефекат на tSOD активност сличан реализованом обрасцу у K3 и K4 групи, тј. активираним компензаторним репаративним механизму унутар ових двеју група, јер су ту установљене највеће денталне лезије (K3 - пацијенти са денталним каријесом спојен с лезијом денталних нерава, K4 - пацијенти са денталном некрозом). Прекомерна и неконтролисана продукција слободних кисеоничних радикала (укључујући *superoxide anion* -  $O_2^{\bullet-}$ , *hydrogen peroxide* -  $H_2O_2$ , *hydroxyl radical* -  $HO^{\bullet}$ , *hypochlorous acid* -  $HOCl$ ) одвија се и у денталним лезијама као што је каријес, током фагоцитозе. Реактивни елементи оштећују субћелијске и/или ћелијске мембране фаголизозома неутрофилних гранулоцита током процеса респираторног праска. Временом, оксидациони производи поли несатурисаних масних киселина (делови ћелијских мембрана) се конвертују у карбониле, као што је MDA, који се сматра поузданим маркером липидне пероксидације (36). У неконтролисаним условима долази до преласка мијелопероксидазе и NADНоксидазе из фаголизозома у цитоплазму фагоцитних ћелија. Најчешће, то резултује ослобађањем оба наведена ензима из фагоцитних ћелија у интерстицијални простор инфицираног/инфламираног ткива, са последичним оштећењем. Секвестрација  $O_2^{\bullet-}$  од укупне супероксид дисмутазе (SOD) и  $H_2O_2$  од каталазе може умањити бактерицидну активност посредовану мијелопероксидазом унутар и/или изван фагоцита, што резултује у смањеној липидној пероксидацији узрокованој овим ензимом (34, 109). У нашем истраживању липидна пероксидација (30-тог дана) је сузбијена у готово свим K групама (најнижа LPO је детектована у K4 групи, док није било промена у K2 групи, у поређењу са вредностима 0-тог дана). Скоро сви дентални испуни су смањивали LPO (ZPoC=ZPhC=Amg $\geq$ TEC), осим BF, који није показивао ефекат и GIC, који га је значајно повећавао. Преваленца K2-пацијената (n=11) међу осталим K-пацијентима [K3 (n=2) и K5 пацијенти (n=1)] третираних са GCI, имплицирају да степен примарне денталне лезије није био пресудан на каснији ефекат ресторативних материјала на сузбијање LPO. Објашњење за повећани ниво LPO након примене GCI лежи у чињеници да GCI садржи металне јоне који индукују митохондријалну пермеабилну транзицију, продукујући  $HO^{\bullet}$ , посредством *Фентонове* реакције (64).

## 5.9. ЕФЕКАТ ДЕНТАЛНИХ МАТЕРИЈАЛА НА LPO

Примена TEC и BF није резултовала повећањем MDA у GCF, што је добар резултат. Наши резултати нису у сагласности са резултатима *Pinar G.* и сарадника (2015) који су имали повећане вредности MDA у саливи денталних пацијената третираних композитима (92).



Показано је да рестаурација денталним материјалима с антиоксидативним својствима може у значајној мери да редукује болести десни инициране каријесним лезијама, што представља значајан допринос у терапији каријеса (110, 111).

Ова студија може дати значајан научни допринос у денталној медицини, с обзиром да досадашња научна истраживања нису била усмерена на испитивања про- и анти-оксидативних својстава денталних ресторативних материјала а што је оваквим приступом истраживању и недвосмислено показано.

Добијени резултати и даља истраживања могла би потврдити и дефинисати испитиване маркере у гингивалној течности који би прецизно рефлектовали степен захваћености ткива каријесом. Након завршене денталне рестаурације, вредности ових медијатора указивали би на најоптималнији локални биолошки одговор, на врсту примењеног материјала, у успешности сузбијања инфламације.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

У складу са постављеним циљевима дошли смо до следећих закључака :

1. Мерење репрезентативних ONS маркера параметара у узорцима гингивалне течности је препозната као најпоузданији и најлакше доступан узорак за процену редокс потенцијала зуба с обзиром да је трансудат крвне плазме смештен у гингивалном сулкусу у близини зуба.
2. Примењене количине DRCs садржавале су дозе мономера стотина пута мање од декларисаних субтоксичних доза, те токсични локални, као ни системски ефекти нису остварени код пацијената који су учествовали у овој студији.
3. Утврђена је повезаност OS са денталним лезијама GCF (активност tSOD и ниво tGSH се значајно смањује, док се LPO повећава).
4. Статус оксидативног стреса није у корелацији са положајем зуба.
5. Уочена је позитивна корелација између масе испуна и позиције зуба, што је очекивано с обзиром на односе размера предњих и задњих зуба.
6. Дентални каријес *per se* доприноси развоју OS у GCF (најразвијенији у K4 групи), а LPO је најекстензивнија у K5 групи - ендодонтски третирану зуби.
7. Утицај примењених третмана на редокс баланс: У GCF је преовладао ефекат каријеса.
8. На мерене параметре OS у GCF примењени ресторативни материјали су деловали (од најизразитијег ка слабијем ефекту) на следећи начин: на пораст GSH: ZpоC>BF>GIC>Amg, на пораст активности tSOD: ZpоC>BF>Amg; и на смањење MDA: ZpоC>ZPhC>Amg >TEC.
9. Од примењених ресторативних материјала, ZpоC, ZPhC и BF су показали највећи антиоксидативни ефекат, на супрот GIC.
10. Реакција GCF на примењене ресторативне материјале била је минимална у K5 групама што указује на важност адекватне циркулације зуба, како за одрживост здравља зуба укључујући доток антиоксидативних елемената путем крви, тако и успешност примењених денталних материјала.

11. Од три мерена параметара OS у GCF MDA и GSH су се показали као најпоузданији и најосетљивији параметри оксидативног стреса.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. McLachlan JL, Sloan AJ, Smith AJ, Landini G, Cooper PR. S100 and cytokine expression in caries. *Infect Immun*, 2004, 72:4102-4108
2. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 25; 3:17030.
3. Kaidonis J, Townsend G. The 'sialo-microbial-dental complex' in oral health and disease. *Ann Anat*. 2016 ; 203: 85-9.
4. Makarova NE, Vinnichenko YA. Local enamel demineralization diagnostics and treatment. *Stomatologija (Mosk)*. 2017; 96(4):67-71.
5. Papagerakis P, Zheng L, Kim D, Said R, Ehlert AA, Chung KKM, Papagerakis S. Saliva and Gingival Crevicular Fluid (GCF) Collection for Biomarker Screening. *Methods Mol Biol*. 2019;1922:549-562.
6. Živković S. Preparacija kaviteta. Data status. 2017.
7. Frazão P. Epidemiology of dental caries: when structure and context matter. *Brazilian Oral Research*.2012;26:108-114.
8. Berggreen E, Bletsa A, Hayeraas KJ. Circulation in normal and inflamed dental pulp. *Endodontic topics*. 2010;17:2-11.
9. Sanghi DK, Tiwie RA. Comprehensive Review on Dental Carries. *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences*. 2015; 2(4):369-377.
10. Stamenković D. Gradivni stomatološki materijali:dostignuća I perspective. Stomatološki fakultet Beograd.2017.
11. Anauate-Netto C, Borelli L Neto, Amore R, DI Hipólito V, D'Alpino PHP. Caries progression in non-cavitated fissures after infiltrant application: a 3-year follow-up of a randomized controlled clinical trial. *J Appl Oral Sci*. 2017 Jul-Aug; 25(4):442-454.
12. Milovanović M, Kanjevac T, Volarević V, Lukić A. Fluoride release from glass ionomer cements correlates with necrotic death of human dental pulp stem cells. *Ser J Exp Clin Res* 2011; 12(2):67-70.
13. Kanjevac T, Volarević A. Cytotoxicity of glass ionomer cements on human pulp cells. *Ser J Exp Clin Res* 2010; 11(3): 115-117.

14. Djukic M, Ninkovic M, Jovanovic M. Oxidative stress-clinical diagnostic significance. *JMB*, 2008; 27(4):409-425.
15. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*. 2015; 4: 180-183.
16. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine, Edition 4th, Clarendon Press, Oxford 2006.
17. Valko M, Leibfriz D, Moncol J, Cronin MT, Maur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell B* 2007;39:44-84.
18. Fulda S, Gorman A, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, 2010: 23-29.
19. Miricesco D, Greaby M, Totan A, Didilescu A, Rădulescu R. The antioxidant potential of saliva: Clinical significance in oral diseases. *Ther Pharmacol Clin Toxicol* 2011; 15(2): 139–143.
20. Noguchi N. Role of oxidative stress in adaptive responses in special reference to atherogenesis. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 43: 131–8.
21. Schaur G, Siems RJ, Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* 2008; 28: 569–631.
22. Curtin JF. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* 2002;265:49-72.
23. Barja G. Correlations with longevity and body size: to correct or not correct? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69: 1096–8.
24. Pavlović D, Đorđević V, Kocić G. Ćelijska signalna transdukcija – modulacija slobodnim radikalima. *Jugoslav Med Biohem* 2002;21:69-84.
25. Halliwell B. Antioxidants: the basics--what they are and how to evaluate them. *Adv pharmacol* 1997;38:3–20.
26. Đorđević V. Biochemical oxidation. In: Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević V, Nikolić J, Pavlović D, Kocić G, editors. *Biochemistry*. Beograd: Savremena administracija; 2000: 678–705. (Serbian)

27. Sculley DV, Langley-Evans SC. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. *Clin Sci (Lond)* 2003; 105(2): 167–72.
28. Todorović T. Oralna biohemija. Drugo dopunjeno i izmenjeno izdanje. Čigoja štampa, Beograd 2006.
29. Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol* 2002; 29(3): 189–94.
30. Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(3): 268–277.
31. Reznick AZ, Klein I, Eiserch JP, Cross CE, Nagler RM. Inhibition of oral peroxidase activity by cigarette smoke: in vivo and in vitro studies. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(3): 377–84.
32. Cankal DU, Ozmeric N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal disease. *Clinica Chimica Acta*, 2006; 366:90-100.
33. Stevanovic DI, Jovanovic DM, Jelenkovic A, Ninkovic M, Djukic M, Stojanovic I, Colic M. The effect of inhibition of nitric oxid synthase on aluminium-induced toxicity in the rat brain. *Gen Physiol Biophys*, 2009; 28:235-242.
34. Djukic M, Jovanovic M, Ninkovic M, Stevanovic I, Ilic K, Curcic M, Vekic J. Protective role of glutathione reductase in paraquat induced neurotoxicity. *Chem Bio Inter*, 2012; 199:74-86.
35. Djukic M. Prooxidative effect of xenobiotics, in: Djordjevic V, Pavlovic D (Eds.), Biochemical markers of oxidative stress in experimental and clinical medicine, School of Medicine, Nice, 2006: 114-118.
36. Bayir H, Kagan VE. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory. *Crit Care*, 2008;12(1):206.
37. Ma N, Tagawa T, Hiraku Y, Murata M, Ding X, Kawanishi S. 8-nitroguanine formation in oral leukoplakia, a premalignant lesion. *Nitric Oxide*, 2006; 14:137-143.
38. Ugar-Cankal D, Ozmeric N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. *Clin Chim Acta*, 2006; 366:90-100.

39. Khanna R, Thapa PB, Khana HD, Khana S, Khana AK, Shukla HS. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes status in oral carcinoma patients. *Kathmandu University Medical Journal*, 2005; 3(4):334-339.
40. Mandic B, Todorovic T. Antioxidant status in oral cancer patients. *Oral Oncology*, 2002; (8):38-42.
41. Lan A, Li W, Liu Y, Xiong Z, Zhang X, Zhou S, Palko O, Chen H, Kapita M, Prigge J, Schmidt E, Chen X, Sun Z, Chen X. Chemoprevention of oxidative stress-associated oral carcinogens by sulforaphane depends on NRF2 and the isothiocyanate moiety. *Oncotarget* 2016; 7 (3): 53502-53514.
42. Sculley V, Langley-Evans S. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2002; 61:137-43.
43. Marcotte H, Marc C. Lavoie. Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998; 62(1): 71–109.
44. Pilette C, Ouadrhiri Y, Van Snick J, Renauld JC, Staquet P, Vaerman JP, Sibille Y. IL-9 inhibits oxidative burst and TNF-alpha release in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes through TGF-beta. *J Immunol*, 2002; 168(8):4103-4111.
45. Todorović T, Dožić I, Pavlica D, Marković D, Ivanović M, Brajović G, Stefanović G, Mirković S, Anđelski B. Use of saliva as a diagnostic fluid in dentistry *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo* 2005;133: 372-378.
46. Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznic AZ. Characterisation of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med*, 2002; 3(32):267277.
47. Takane M, Sugano N, Ezawa TU, Ito K. A marker of oxidative stress in saliva: association with periodontally- involved teeth of a hopeless prognosis. *J Oral Sci*, 2005; 47: 53-57.
48. Sawamoto Y, Suaganao N, Tanaka H, Ito K. Detection of periodontopathic bacteria and an oxidative stress marker in saliva from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*, 2005; 20: 216-220.
49. Dabra S, China K, Kaushik A. Salivary enzymes as diagnostic markers for detection of gingival/ periodontal disease and their correlation with the severity of the disease. *Journal of Indian Society of Periodontology*.2012;16358-354.

50. Tyrina YY, Tyrin AV, Zhao Q, Đukić M, Quinn JP, Pit RB, Kagan EV. Oxidation of phosphatidylserine: a mechanism for plasma membrane phospholipid scrambling during apoptosis? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004; 324:971-976.
51. Schwartz RS, Summitt JB, Robbins JW. Fundamentals of operative dentistry, Contemporary approach, with illustrations, Jose dos Santos, second ed., Quintessence books, 2001.
52. Metivier PA, Bland DK. General Chairside Assisting: A Review for a National General Chairside Exam. *American Dental Assistants Association*, Courtesy Coldwell Systems, Champaign, IL, 2006.
53. Guentsch A, Kramesberger M, Sroka A, Pfister W, Potempa J, Eick S. Comparison of Gingival Crevicular Fluid Sampling Methods in Patients with Severe Chronic Periodontitis. *J Periodontol*, 2011; 82(7):1051–1060.
54. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma*, 1991; 31(1):32-35.
55. Sun M, Zigman S. An important spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine auto-oxidation. *Analytical Biochemistry*, 1978; 90:81-89.
56. Anderson ME. The DTNB-GSSG reductase recycling assay for total glutathione (GSH + 1/2GSSG), in: *Tissue glutathione*, ed. Greenwald RA, CRC Press, Florida, 1986, pp. 317-323.
57. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 1951; 193:265-275.
58. Kundalić J, Pavlović D, Jevtović-Stoimenov T, Cvetković T, Obradović R, Kesić L, Pejčić A, Kundalić B, Stošić N, Oxidative stress in the pathogenesis of periodontal disease, *Acta medica Medianae*, 55 (2016) 66-72.
59. Novaković N, Todorović T, Rakić M, Milinković i, Dožić I, Janković S, Aleksić Z, Čakić S. Salivary antioxidants as periodontal biomarkers in evaluation of tissue status and treatment outcome. *J of Periodonol Res*, 2014.
60. Alamo SM, Mancheño-Franch, Maryal-Gamarra C, Carlos-Fabuel L. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. *Journal of Clinical and experimental dentistry*, 2012; 4: 237-245.
61. Bejer-Mir A, Parsian H, Khoram M, Ghasemi N, Bijani A, Samani M. Diagnostic role of salivary and GCF nitrite, nitrate and nitric oxide to distinguish healthy periodontium from gingivitis and periodontitis. *Int J Mol Cell Med*, 2014; 3(3):138-145.



62. Khurshid Z, Mali M, Naseem M, Najeeb S, Zafar S, Human Gingival Crevicular Fluids (GCF) Proteomics: An Overview, *Dentistry Journal*, 2017;5: 12-18.
63. Poorsattar Bejeh-Mir A, Parsian H, Akbari Khoram M, Ghasemi N, Bijani A, KhosraviSamani M. Diagnostic Role of Salivary and GCF Nitrite, Nitrate and Nitric Oxide to Distinguish Healthy Periodontium from Gingivitis and Periodontitis. *Int J Mol Cell Med*, 2014; 3(3):138–145.
64. Khorsavi SM, Poorsattar Bejeh MA, Kashiri M, Gujeq D. Introducing cut-points for salivary nitric oxide to distinguish periodontitis from the normal periodontium. *Minerva Stomatol*, 2012; 61(10):443-448.
65. Tinti F, Soory M, Mechanisms for redox actions of nicotine and glutathione in cell culture, relevant to periodontitis, *Scientific reports*, 2012:2.
66. Taso E, Rakic M, Stefanovic V, Petkovic-Curcin A, Stanojevic I, Djukic M, Strulliou X, Vojvodic D, Banovic T, Kanjevac T. Variation of the Cytokine Profiles in Gingival Crevicular Fluid Between Different Groups of Periodontally Healthy Teeth. *SJECR* 2019; ISSN (Print) 1820-8665.
67. Arenholt-Bindslev D, Breinholt V, Preiss A, Schmalz G. Time-related bisphenol-A content and estrogenic activity in saliva samples collected in relation to placement of fissure sealants. *Clin Oral Investig*, 1999;3:120-125.
68. Butler AC, Veith DP, Nieto FM, Dashper GS, Reynolds CE. Lysine acetylation is a common post-translational modification of key metabolic pathway enzymes of the anaerobe. *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Proteomics*, 2015; 128:352–364.
69. Đukić M. Oxidative stress-free radicals, pro-oxidants and antioxidants. Mono and Manjana, Beograd, 2008.
70. Tyurina YY, Kini V, Tyurin AV, Vlasova II, Jiang J, Kapralov AA, Belikova AN, Yalowich CJ, Kurnikovand VI, Kagan EV. Mechanisms of Cardiolipin Oxidation by Cytochrome c: Relevance to Pro- and Antiapoptotic Functions of Etoposide. *Molecular Pharmacology*, 2006; 70:2706-2717.
71. Stefanović B, Taso E, Petković Čurčin A, Jović M, Miller K, Stanojević I, Vojvodić D. Influence of dental filling material type on the concentration of interleukin 9 in the samples of gingival crevicular fluid. *Vojnosanit Pregl* 2016;73(8):728–734.
72. Valen G, Zhong-qun Y, Hansson KG. Nuclear factor kappa B and the heart. *J Am Coll Cardiol*, 2001; 38(2):307-314.

73. Balázs R, Leto LT. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH Oxidases. *Contrib Microbiol*, 2008; 15:164–187.
74. Yijing H, Mingjiang Z, Zi L, Rina S, Qianqian C. Mass spectrometry-based metabolomic profiling identifies alterations in salivary redox status and fatty acid metabolism in response to inflammation and oxidative stress in periodontal disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014; 70:223–232.
75. Takahashi N, Sato T, Yamada T. Metabolic Pathways for Cytotoxic End Product Formation from Glutamate- and Aspartate-Containing Peptides by *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology*, 2000; 182(17):4704-4710.
76. Williams CF, Yarlett N, Aon MA, Loyd D. Antioxidant defenses of *Spironucleus vortens*: Glutathione is the major non-protein thiol. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 2014; 196:45-52.
77. Obradovic-Djuricic K, Medic V. Biocompatible composite materials, in D. Stamenkovic (Ed), *Dental materials*, School of Dentistry, Belgrade, 2012, pp. 215-240.
78. Obradovic-Djuricic K, Medic V, Radisic M et al. Correlation between the degree of conversion and the elution of leachable components from dental resin based cements. *J Serbian Chemical Society*, 2011; 76 (9):1307-1323.
79. Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res*, 1999; 48:277–288.
80. Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *Int J Mol Sci*, 2009; 10:3861-3899.
81. Cobanoglu N, Ozer F, Demirci M, Ozdemir O, Imazato S. Histopathological evaluation of human pulp response to two self-etching resins. *Journal of Restorative dentistry*, 2015; 3(1):1-7.
82. Braun JM, Yolton K, Dietrich KN, Hornung R, Ye X, Calafat AM, et al. Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environ Health Perspect*, 2007; 117:1945-1952.
83. Kanerva L, Estlander T, Jolanki R. Occupational allergic contact dermatitis caused by acrylic tri-cure glass ionomer. *Contact Dermatitis*, 1997; 37:49-50.
84. Savonius B, Keskinen H, Tuppurainen M, Kanerva L. Occupational respiratory disease caused by acrylates. *Clin Exp Allergy*, 1993; 23: 416-424.

85. Torres M, Forman HJ. Redox signaling and MAP kinase pathways. *Biofactors*, 2003; 17:287-296.
86. Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harreus UA, Staudenmaier R, Folwacny M, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials*, 2006; 27:1762-1770.
87. Obradovic-Djuricic K, Djukic M, Medic V, Dodic S. Possible Oxidative Pathways of Dental Composites Cytotoxicity: In Vitro Study. 46th Meeting of the Continental European Division of International Association for Dental Research (IADR). Florence, Italy, Sept. 2013. Abstr. No. 0396.
88. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod*, 1996; 22:244-248
89. Bouillaguet S. Biological risks of resin- based materials to the dentin-pulp complex. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2004; 15:47-60.
90. Noda M, Wataha JC, Lewis JB, Kaga M, Lockwood PE, Messer RL, et al. Dental adhesive compounds alter glutathione levels but not glutathione redox balance in human THP-1 monocyte cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2005; 73:308-314.
91. Volk J, Engelmann J, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. *Dent Mater*, 2006; 22:499-505.
92. Pinar G, Nilgun A, Hamit HA, Ahmet K. Effects of composite restorations on oxidative stress in saliva: an in vivo study. *Journal of Dental Sciences*, 2015; 10 (4):394-400.
93. Arenholt-Bindslev D, Breinholt V, Preiss A, Schmalz G. Time-related bisphenol-A content and estrogenic activity in saliva samples collected in relation to placement of fissure sealants. *Clin Oral Investig*, 1999; 3:120–125.
94. Nomura Y, Ishibashi H, Miyahara M, Shinohara R, Shiraishi F, Arizono K. Effects of dental resin metabolites on estrogenic activity in vitro. *J Mater Sci Mater Med*, 2003; 14:307–310.
95. Benderli Y, Ulukapi H, Balkanli O, Külekci G. In vitro plaque formation on some dental filling materials. *J Oral Rehabil*, 1997; 24:80-83.

96. Cannon MJ, Kostoryz E, Russo KA, Smith RE, Yourtee DM. Bisphenol A and its biomaterial monomer derivatives alteration of in vitro cytochrome P450 metabolism in rat, minipig, and human. *Biomacromolecules*, 2000; 1:656-664.
97. Schmalz G, Preiss A, Arenholt-Bindslev D. Bisphenol-A content of resin monomers and related degradation products. *Clin Oral Investig*, 1999; 3:114.
98. Maserejian NN, Hauser R, Tavares M, Trachtenberg L, Shrader P, McKinlay S. Dental Composites and Amalgam and Physical Development in Children. *J Dent Res*, 2012; 91(11):1019–1025.
99. Xuedong Z. *Dental Caries: Principles and Management*. Springer Berlin, Heidelberg, 2015.
100. Hewlett ER, Mount GJ. Glass-ionomers in contemporary restorative dentistry – a clinical update. *J Calif Dent Assoc*, 2003; 31(6):483-492.
101. Hamid A, Okamoto A, Iwaku M, Hume WR. Component release from lightactivated glass ionomer and compomer cements. *J Oral Rehabil*, 1998; 25:94-99.
102. Goldberg M, Stanislawski L, Bonte E, Daniau X, Bonte E, Daniau X, Lasfargues J. Biocompatibility of glass-ionomer cements, in: Davidson CL, Mjor IA, (Eds.), *Advances in glass-ionomer cements*, chapter 5, Quintessence Publishing, Chicago, 1999: pp 103–120.
103. Skare I, Engqvist A. Human exposure to mercury and silver released from dental amalgam restorations. *Archives of environmental health*, 1994; 49:384–394.
104. Olsson S, Bergman M. Daily dose calculations from measurements of intra-oral mercury vapor. *Journal of dental research*, 1992; 71:414–423.
105. Spanguolo G, Galler K, Schaltz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA-induced apoptosis in primary human pulp cells. *J Dent res*, 2004; 83:703-707.
106. Lefeuvre M, Bourd K, Loriot MA, Goldberg M, Beaune P, Perianin A, et al. TEGDMA modulates glutathione transferase P1 activity in gingival fibroblasts. *J Dent Res*, 2004; 83:914-919.
107. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Invest*, 2008; 12:1-8.
108. Testa B, Kraemer SD, *The biochemistry of drug metabolism—an introduction*, Chemistry & biodiversity, 4 (2007) 257-405.

109. Petrides P, Nauseef W, Peroxidase multigene family of enzyme, biochemical bases: Historical overview of myeloperoxidase in research on myeloperoxidase, Chapter 1, 2012 Springer.
110. Taso E, Stefanovic V, Stevanovic I, Vojvodic D, Topic A, Petkovic-Curcin A, ObradovicDuricic K, Markovic A, Dukic M, Vujanovic D. Influence of Dental Restorations on Oxidative Stress in Gingival Crevicular Fluid. *Oxidative Medicine and Longevity* 2018. Article ID 1823189.
111. Stefanovic V, Taso E, Kanjevac T, Abazovic Dz, Rakic M, Petkovic-Curcin A, Acovic A, Vojvodic D. Dental caries and restorative biomaterials affect IL-1  $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels in the gingival crevicular fluid. *Vojnosanit Pregl.* 2019; DOI:10.2298/VSP181116038S

# БИОГРАФИЈА

## Општи подаци и образовање

Ервин Тасо рођен је 05.06.1974. године у Панчеву. Основну и средњу школу завршио у истом граду. Стоматолошки факултет завршио у Београду 2001. године.

После завршеног обавезног стажа и Школе резервних официра Војске Србије почиње да ради у Војсци Србије као потпоручник, доктор стоматологије на ВМЦ Нови Београд 2003. године. Специјализацију из Стоматолошке протетике уписује 2004. године на Војномедицинској академији а 2007. постаје специјалиста и почиње да ради на Одељењу стоматолошке протетике Клинике за стоматологију ВМА.

Године 2011. уписује докторске студије на Универзитету у Крагујевцу и исте године прелази у Управу Клинике за стоматологију где почиње да ради хируршку протетику на имплантатима. Године 2016.-е уписује специјализацију из Оралне хирургије на Стоматолошком факултету у Београду и 2019-е године по стицању звања специјалисте оралне хирургије почиње да ради на Одељењу за имплантологију ВМА на месту оралног хирурга са чином потпуковника.

Члан је Секције за оралну хирургију СЛД и Секције за стоматолошку протетику.

Као члан тима за Континуирану едукацију Клинике за стоматологију ВМА одржао је неколико предавања специјализантима и запосленим на клиници.

Аутор је и коаутор неколико публикација.

## Библиографија

### M21

**Taso E**, Stefanovic V, Stevanovic I, Vojvodic D, Topic A, Petkovic-Curcin A, Obradovic-Duricic K, Markovic A, Dukic M, Vujanovic D. Influence of Dental Restorations on Oxidative Stress in Gingival Crevicular Fluid. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018, Article ID 1823189, 17 pages, <https://doi.org/10.1155/2018/1823189> **IF(2018)=4,868**

### M22

**Taso E**, Stefanovic V, Gaudin A, Grujic J, Maldonado E, Petkovic-Curcin A, Vojvodic D, Sculean A, Rakic M. Effect of dental caries on periodontal inflammatory status: A Split-mouth study. *Archives of Oral Biology*,104620 ,Publisher:Pergamon, 2019. **IF(2018)=2,009**

### M23

Stefanović B, **Taso E**, Petković Ćurčin A, Gardašević M, Jović M, Miller K, Stanojević I, Vojvodić D. Influence of dental filling material type on the concentration of interleukin 9 in the samples of gingival crevicular fluid. *Vojnosanit Pregl* 2016;73(8):728–734. **IF(2016)=0,367**

### M23

Stefanovic V, **Taso E**, Kanjevac T, Abazovic Dz, Rakic M, Petkovic-Curcin A, Acovic A, Vojvodic D. Dental caries and restorative biomaterials affect IL1 $\beta$  and TNF  $\alpha$  levels in the gingival crevicular fluid. *Vojnosanitetski preglad.* 38-38. 10.2298/VSP181116038S. **IF (2018) = 0,272**

### M51

**Taso E**, Stefanović V, Petković-Ćurčin A, Stanojević I, Đukić M, Struillou X, Vojvodić D, Kanjevac T. The cytokine profiles in gingival crevicular fluid vary between different groups of periodontally healthy teeth. *Serbian Journal of Experimental and clinical research*

Stefanović V Lazić Z, Mirković N, **Taso E**, Simeunović N, Nešić J. Primena EDS analize u ispitivanju metal-keramičkih međuspojeva višestruko livenih nikel-hrom dentalnih legura. / EDX ANALYSIS OF METAL-CERAMIC INTERFACES OF RECASTED NICKEL-CHROMIUM DENTAL ALLOYS. *Chemical Industry / Hemijska Industrija*, 2018, Vol. 72 Issue 3, p149-156, 8p. Publisher: Association of Chemical Engineers.

Stefanović V, **Taso E**, Mirković N. Energijska disperziona spektrofotometrijska (edx) analiza metalkeramičkih spojeva kobalt-hrom legura u izradi fiksnih zubnih nadoknada / Energy-dispersive x-ray spectrophotometry (edx) analysis of metalceramic bonds in cobalt-chromium alloys for the fabrication of fix dental restorations. Timocki Medicinski Glasnik, 2017, Vol. 42 Issue 3, p155-164, 10p. Publisher: Timocki Medicinski Glasnik.



**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Ервин Тасо, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

**Утицај материјала за денталне испуне апроксималних препарација на параметре оксидативног стреса у гингивалној сулкусној течности**

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,

да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 26.01.2021. године,

---

потпис аутора

## Образац 2

### ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ервин Тасо,



дозвољавам



не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

**Утицај материјала за денталне испуне апроксималних препарација на параметре оксидативног стреса у гингивалној сулкусној течности**

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу,

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*. Овом Изјавом такође



дозвољавам



не дозвољавам<sup>1</sup>

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

---

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу, 26.01.2021. године,

---

потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од Creative Commons лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>