



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Mile K. Eraković

**EFEKAT TRIKALCIJUM SILIKATNOG CEMENTA  
(BIODENTINA) NA ZARASTANJE HUMANIH PERIAPEKSNIH  
LEZIJA NAKON RETROGRADNOG PUNJENJA KANALA  
KORENA ZUBA: KLINIČKA I EKSPERIMENTALNA STUDIJA**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2020



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Mile K. Erakovic

**EFFECT OF TRICALCIUM SILICATE CEMENT (BIODENTINE)  
ON THE HEALING OF HUMAN PERIAPICAL LESIONS AFTER  
RETROGRADE FILLING OF THE ROOT CANAL: A CLINICAL  
AND EXPERIMENTAL STUDY**

Doctoral dissertation

Kragujevac, 2020

## Identifikaciona stranica doktorske disertacije

<b>Autor</b>
Ime i prezime: Mile Eraković
Datum i mesto rođenja: 24.12.1978. god., Podgorica
Sadašnje zaposlenje: Klinika za stomatologiju, VMA, Crnotravska 17, Beograd
<b>Doktorska disertacija</b>
Naslov: EFEKAT TRIKALCIJUM SILIKATNOG CEMENTA (BIODENTINA) NA ZARASTANJE HUMANIH PERIAPEKSNIH LEZIJA NAKON RETROGRADNOG PUNJENJA KANALA KORENA ZUBA: KLINIČKA I EKSPERIMENTALNA STUDIJA
Broj stranica: 155
Broj slika: 27 grafikona i 11 slika
Broj bibliografskih podataka: 339
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Klinika za stomatologiju VMA i Institut za medicinska istraživanja VMA, Crnotravska 17, Beograd
Naučna oblast (UDK): Medicina, stomatologija
<b>Mentor:</b> Prof dr Miloš Duka, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu, za užu naučnu oblast Oralna medicina
<b>Ocena i odbrana</b>
Datum prijave teme: 11.9.2020. god.
Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije: IV-03-9/11 od 22.1.2020. godine
Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata:
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Prof dr Aleksandra Lukić, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Bolesti zuba i endodoncija, predsednik</li><li>2. Prof dr Slobodanka Mitrović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Patološka anatomija, član</li><li>3. Prof dr Tatjana Kanjevac, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Dečja i preventivna stomatologija, član</li><li>4. Prof dr Ivan Jovanović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija, član</li><li>5. Doc dr Marija Bubalo, docent Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu, za užu naučnu oblast Oralna medicina, član</li></ol>
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Prof dr Aleksandra Lukić, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Bolesti zuba i endodoncija, predsednik</li><li>2. Prof dr Slobodanka Mitrović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Patološka anatomija, član</li><li>3. Prof dr Tatjana Kanjevac, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Dečja i preventivna stomatologija, član</li><li>4. Prof dr Ivan Jovanović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija, član</li><li>5. Doc dr Marija Bubalo, docent Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu, za užu naučnu oblast Oralna medicina, član</li></ol>
Datum odbrane disertacije:

## ZAHVALNICA

Klinički deo ove doktorske disertacije je urađen u Odeljenju za oralnu hirurgiju Klinike za stomatologiju VMA u Beogradu. Eksperimentalni deo istraživanja je urađen u Institutu za medicinska istraživanja VMA i Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu.

Najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru **pk prof dr Milošu Duki**, načelniku Odeljenja za oralnu hirurgiju Klinike za stomatologiju VMA koji me je najpre motivisao da upišem doktorske studije, pomogao oko odabira teme, paralelno samnom uradio i kontrolisao sve kliničke aspekte projekta uključujući i tumačenje kliničkih rezultata.

Zahvalnost dugujem svim članovima komisije, posebno **prof dr Tatjani Kanjevac**, na korisnim savetima, kontinuiranoj i bezrezervnoj podršci.

Posebnu zahvalnost dugujem i odajem **akademiku Miodragu Čoliću**, brigadnom generalu u penziji, koji mi je omogućio da najveći deo eksperimentalnih istraživanja obavim u okviru projekta OI 175102, kojim je on rukovodio kod Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja R. Srbije. Akademik Čolić je zajedno samnom i mojim mentorom definisao naučni problem ove disertacije i trasirao istraživačke pravce. Interesovao se kontinuirano za sve aspekte istraživanja i napravio finalnu korekciju disertacije. To je za mene, početnika u naučnim istraživanjima, bilo najdragocenije iskustvo i ogromna pomoć. Neizmerno hvala poštovani akademice.

Eksperimentalni deo ove disertacije ne bi bio moguć bez dragocene pomoći kolega iz Instituta za medicinska istraživanja VMA, **Sergeja Tomića**, **Marine Bekić** i **Marijane Milanović**. Pomoć u RT-PCR esejima sam imao od **Jelene Đokić** iz Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu. Od njih sam učio kako se sprovode i analiziraju komplikovani laboratorijski eksperimenti a koji u njihovim rukama izgledaju veoma jednostavno. Neizmerno sam im dodatno zahvalan na velikom trudu i pomoći da originalni rezultati ove disertacije budu publikovani u međunarodnom časopisu kategorije M21a.

Zahvalnost odajem **prof. dr Nebojši Arsenijeviću** sa Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu, koji je uvek za mene imao reči podrške, istinsko interesovanje za rad na disertaciji i koji me je stalno motivisao da istraživanja završim na vreme.

Zahvaljujem se kolegama i osoblju iz Odeljenja za oralnu hirurgiju Klinike za stomatologiju VMA koji su bili uz mene kada je bilo potrebno. Takođe hvala kolegama iz Klinike za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu, od kojih sam mnogo naučio tokom specijalizacije, uključujući i savladavanje tehnike retrogradne opturacije kanala korena.

Bez podrške moje porodice ovaj rad ne bi bio moguć. I zato veliko i neizmerno hvala supruzi Nataši, deci Tari i Vojinu, majci Vesni i sestri Nadi. Nažalost, moj otac Kosta, nije dočekao ovaj trenutak.

## SAŽETAK

U ovoj disertaciji je testirana originalna hipoteza po kojoj je trikalcijum silikatni cement, Biodentin, primenjen za retrogradnu opturaciju kanala korena zuba, efikasniji u zarastanju humanih periapeksnih lezija (PL) u odnosu na amalgam. Rezultati su potvrđeni u randomizovanoj kliničkoj studiji na 24 (Biodentin) odnosno 25 (amalgam) korena zuba. Eksperimentalna studija je imala za cilj objašnjenje mehanizama kliničkih rezultata ispitivanjem citotoksičnosti, inflamacije, imunomodulacije i osteogene diferencijacije mezenhimalnih stromalnih matičnih ćelija (MSC) uspostavljenih iz PL. Iako je pokazano da je kondicionirani medijum (KM) Biodentina citotoksičniji u odnosu na KM amalgama, necitotoksične koncentracije oba KM su inhibirale produkciju proinflamacijskih citokina i hemokina (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 i MCP-1) od strane infiltrišućih ćelija izolovanih iz PL. Međutim, za razliku od amalgama, necitotoksične koncentracije KM Biodentina su pokazivale imunomodulacijski efekat (povećanje produkcije IL-10, Th2 citokina i IL-17A) i osteoprotekciju (smanjenje nivoa RANKL i odnosa RANKL/OPG). Analizom 9 osteblastnih gena (*RUNX2*, *ALP*, *BGLAP*, *COL1A1*, *SP7*, *BMP2*, *TGF- $\beta$ 1*, *FGF2* i *WNT2*) i Ca depozita pokazano je da KM Biodentina snažno stimulise proliferaciju i osteoblastnu diferencijaciju MSC u osnovnom medijumu i potencira osteoblastogenezu u prisustvu osteoinduktivnog medijuma. Iako je KM amalgama stimulisao ekspresiju pojedinih osteoblastnih gena, nije indukovao osteoblastnu diferencijaciju MSC. Zaključeno je da je stimulacijski efekat Biodentina na regeneraciju koštanih i meko-tkivnih struktura nakon hirurškog tretmana PL povezan sa stimulacijom proliferacije i osteoblastne diferencijacije MSC kao i lokalnim anti-inflamacijskim, imunomodulacijskim i osteoprotektivnim efektima.

**Ključne reči:** Biodentin, amalgam, periapeksna lezija, retrogradna opturacija kanala korena, zarastanje, citotoksičnost, citokini, imunomodulacija, mezenhimalne stromalne matične ćelije, osteogena diferencijacija

## ABSTRACT

In this dissertation, the original hypothesis was tested according to which tricalcium silicate cement, Biodentine, applied for retrograde root canal filling, is more efficient in healing of human periapical lesions (PLs) compared to amalgam. The results were confirmed in a randomized clinical study on 24 (Biodentine) and 25 (amalgam) tooth roots, respectively. The experimental study aimed to explain these mechanisms by examining cytotoxicity, inflammation, immunomodulation, and osteogenic differentiation of mesenchymal stromal stem cells (MSCs) established from PLs. Although the conditioned medium of Biodentine (B-CM) has been shown to be more cytotoxic than CM of amalgam (A-CM), non-cytotoxic concentrations of both CMs inhibited the production of proinflammatory cytokines and chemokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, and MCP-1) by PL cells. However, in contrast to amalgam, non-cytotoxic concentrations of B-CM showed immunomodulatory effects (increased production of IL-10, Th2 cytokines and IL-17A) and osteoprotection (decreased RANKL levels and RANKL/OPG ratio). Analysis of 9 osteoblastic genes (*RUNX2*, *ALP*, *BGLAP*, *COL1A1*, *SP7*, *BMP2*, *TGF- $\beta$ 1*, *FGF2* and *WNT2*) and Ca deposits showed that B-CM strongly stimulated the proliferation and osteoblastic differentiation of MSCs in the basal medium and potentiated osteogenesis in the osteoinductive medium. Although A-CM stimulated the expression of some osteoblastic genes, it did not induce osteoblast differentiation of MSCs. It was concluded that the stimulating effect of Biodentine on the regeneration of bone and soft tissue after surgical treatment of PLs is associated with the stimulation of proliferation and osteoblastic differentiation of MSCs as well as its local anti-inflammatory, immunomodulatory and osteoprotective effects.

**Keywords:** Biodentine, amalgam, periapical lesion, retrograde root canal filling, healing, cytotoxicity, cytokines, immunomodulation, mesenchymal stromal stem cells, osteogenic differentiation

## Sadržaj:

1.	UVOD.....	1
1.1.	ENDODONTSKA HIRURGIJA.....	1
1.2.	PERIAPEKSNE LEZIJE: ETIOPATOGENEZA I INFLAMATORNO-IMUNSKJE KARAKTERISTIKE	1
1.3.	DIJAGNOZA PERIAPEKSNIH LEZIJA.....	8
1.4.	TERAPIJA PERIAPEKSNIH LEZIJA .....	9
1.5.	MATERIJALI ZA RETROGRADNO PUNJENJE KANALA KORENA.....	10
1.5.1.	Amalgam .....	11
1.5.2.	Glasjonomerni cementi .....	11
1.5.3.	Cink oksid eugenol cementi .....	11
1.5.4.	Mineral-trioksid agregat.....	12
1.5.5.	Inovativna biokeramika.....	12
1.6.	BIODENTIN .....	13
1.6.1.	Osnovna fizičko-hemijska svojstva Biodentina .....	13
1.6.2.	Biokompatibilnost i bioaktivnost Biodentina.....	15
1.7.	INTERAKCIJA DENTALNIH MATIČNIH STOMALNIH MEZENHIMSKIH ĆELIJA I BIOMATERIJALA .....	16
1.8.	NAUČNI PROBLEM.....	18
2.	HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	21
3.	MATERIJALI I METODE.....	22
3.1.	VRSTA STUDIJE .....	22
3.2.	KLINIČKA STUDIJA .....	22
3.2.1.	Ispitanici.....	22
3.2.2.	Apikotomija i retrogradno punjenje kanala korena.....	23
3.2.3.	Retrogradno punjenje kanala korena.....	23
3.2.4.	Praćenje parametara zarastanja PL.....	24
3.3.	EKSPERIMENTALNA STUDIJA.....	25
3.3.1.	Priprema ekstrakta (kondicioniranog medijuma) amalgama i Biodentina.....	25
3.3.2.	L929 ćelije.....	25
3.3.3.	Izolacija ćelija iz periapeksnih lezija .....	25
3.3.4.	Uspostavljanje kultura mezenhimskih stromalnih matičnih ćelija iz periapeksnih lezija.....	26
3.3.5.	Sposobnost formiranja kolonija MSC - CFU-F test.....	26
3.3.6.	Fenotipska analiza MSC .....	27
3.3.7.	Diferencijacija MSC iz periapeksnih lezija.....	27
3.3.8.	Testovi citotoksičnosti .....	28
3.3.9.	Test apoptoze i nekroze.....	28

3.3.10. Metode za detekciju citokina .....	29
3.3.11. Modulacijski efekat Biodentina i amalgama na osteoblastnu diferencijaciju MSC .....	29
3.3.12. Određivanje genske ekspresije pomoću lančanog umnožavanja DNK u realnom vremenu (Real-time PCR).....	30
3.3.13. Testovi proliferacije .....	31
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	32
4. REZULTATI.....	33
4.1. KLINIČKA STUDIJA .....	33
4.1.1. Demografski podaci .....	33
4.1.2. Karakteristike periapexnih lezija lečenih hirurškim putem uz primenu materijala za retrogradnu opturaciju kanala korena .....	34
4.1.3. Poređenje efikasnosti Biodentina i amalgama u hirurškom lečenju periapexnih lezija u zavisnosti od veličine lezija .....	42
4.2. EKSPERIMENTALNA STUDIJA. DEO I: BIODENTINA I AMALGAMA IN VITRO.....	44
4.2.1. Karakterizacija ekstrakta Biodentina i amalgama.....	44
4.2.2. Efekat kondicioniranih medijuma, pripremljenih ekstrakcijom sveže polimerizovanog Biodentina i amalgama na metaboličku aktivnost L929 ćelija .....	45
4.2.3. Efekat kondicioniranih medijuma, pripremljenih ekstrakcijom otvrdnutog Biodentina i amalgama na metaboličku aktivnost L929 ćelija .....	51
4.2.4. Efekat kondicioniranih medijuma, pripremljenih ekstrakcijom Biodentina i amalgama na citotoksičnost i proliferaciju L929 ćelija .....	58
4.3. EKSPERIMENTALNA STUDIJA. DEO II: MODULACIJSKI EFEKAT BIODENTINA I AMALGAMA NA PRODUKCIJU CITOKINA OD STRANE ĆELIJA IZ PERIAPEKSNIH LEZIJA IN VITRO.....	62
4.3.1. Ćelijski sastav periapexnih lezija .....	62
4.3.2. Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na citotoksičnost ćelija iz periapexnih lezija .....	64
4.3.3. Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na produkciju pro-inflamacijskih citokina i hemokina od strane PL ćelija u kulturi .....	68
4.3.4. Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na produkciju Th citokina od strane PL ćelija u kulturi .....	71
4.3.5. Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na produkciju RANKL i OPG od strane PL ćelija u kulturi .....	75
4.4. EKSPERIMENTALNA STUDIJA. DEO III: UTICAJ KONDICIONIRANIH MEDIJUMA BIODENTINA I AMALGAMA NA OSTEOGENU DIFERENCIJACIJU MEZENHIMSKIH STROMALNIH MATIČNIH ĆELIJA USPOSTAVLJENIH IZ PERIAPEKSNIH LEZIJA.....	77



4.4.1.	Uspostavljanje PL-MSC kultura .....	77
4.4.2.	Fenotipska analiza PL-MSC .....	78
4.4.3.	Osteoblastogena, hondrogena i adipogena diferencijacija PL-MSC.....	80
4.4.4.	Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na citotoksičnost i proliferativna svojstva PL-MSC .....	81
4.4.5.	Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na osteogenu diferencijaciju PL-MSC procenjivanu na osnovu bojenja sa Alizarin crvenim.....	84
4.4.6.	Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na osteogenu diferencijaciju PL-MSC procenjivanu na osnovu ekspresije transkripcionih faktora RUNX2, SP7 i WNT2 .....	87
4.4.7.	Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na na osteogenu diferencijaciju PL-MSC procenjivanu na osnovu ekspresije gena matriksne mineralizacije, BGLAP, COL1A1 i ALP .....	92
4.4.8.	Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na na osteogenu diferencijaciju PL-MSC procenjivanu na osnovu ekspresije gena karakterističnih za osteoblastne i fibroblastne citokine BMP-2, TGF- $\beta$ 1 i FGF-2 .....	96
5.	DISKUSIJA .....	101
5.1.	KLINIČKA STUDIJA .....	101
5.2.	EKSPERIMENTALNA STUDIJA: CITOKOMPATIBILNOST EKSTRAKATA BIODENTINA I AMALGAMA.....	107
5.3.	EKSPERIMENTALNA STUDIJA: MODULACIJA PRODUKCIJE CITOKINA U KULTURI.....	112
5.4.	EKSPERIMENTALNA STUDIJA: EFEKAT EKSTRAKTA BIODENTINA I AMALGAMA NA OSTEOLASTNU DIFERENCIJACIJU PL-MSC .....	119
6.	ZAKLJUČCI.....	127
7.	LITERATURA .....	129

# 1. UVOD

## 1.1. Endodontska hirurgija

Endodontska hirurgija je posebna oblast endodoncije koja se po pravilu primenjuje kada standardno ortogradno endodontsko lečenje ne dovodi do željenog uspeha. Osim ove ključne indikacije, endodontsko hirurško lečenje se sprovodi i u slučajevima nemogućnosti izvođenja revizije punjenja kanala korena zuba zbog različitih indikacija, a od kojih su posebno značajne nadogradnje u kanalu ili postoji protetski rad koji bi na taj način bio ugrožen. Najznačajniji postupci u endodontskoj hirurgiji su apikotomija, hemisekcija i amputacija korena, zatvaranje perforacija između korena i alveole (*fausse-route*) kao i sanacije fraktura apikalne trećine korena i eksternih resorpcija (1). Prema definiciji resekcija korena ili apikotomija je sečenje apikalnog dela korena zuba i potpuno odstranjenje patološkog tkiva iz periapexnog prostora, u cilju izlečenja periapexnog hroničnog zapaljenskog procesa uz istovremeno očuvanje funkcionalnosti zuba. Ovim hirurškim zahvatom se uklanjaju i akcesorni korenski kanali i dodatni apikalni otvori koji mogu biti uzrok neuspeha endodontske terapije. Apikotomijom se najviše može odstraniti apikalna trećina korena a da se ne poremeti stabilnost zuba. U protivnom, može doći do labavljenja i gubitka zuba (2).

Apikotomijom se može očuvati zub i pripadajuće suprastrukture (nadogradnja, krunica, most) ukoliko su prisutne (1). Ova procedura u najvećem broju slučajeva predstavlja potpuno uspešan terapijski postupak kojim se sanira patološka promena, sprečava recidiv i vađenje obolelog zuba. Osnovne indikacije za apikotomiju definisali su Gutmann i Harrison (3): ako postoji opravdana sumnja u neuspeh endodontskog tretmana; ako endodontsko lečenje nije bilo uspešno a ponovni tretman nije moguć; ako je potrebna biopsija periapexnog regiona. Apikotomija nalazi široku primenu u svakodnevnoj stomatološkoj praksi. Ona nije ograničena samo na prednje zube već može biti bezbedno primenjena i kod molara. Međutim, brojna klinička iskustva i publikovani radovi nedvosmisleno ukazuju da je apikotomija u molarnoj regiji tehnički teže izvodljiva i praćena je većim brojem komplikacija (4).

Najčešća indikacija za apikotomiju su hronični zapaljenski procesi na vrhu korena zuba koji nisu mogli da budu sanirani standardnom endodontskom terapijom, a koje se zajedničkim imenom nazivaju periapexne ili periapikalne lezije (PL). Vrlo često se sreću u stomatološkoj praksi i predstavljaju više od jedne trećine svih indikacija za oralno-hirurške intervencije. Postoji više načina klasifikovanja PL, ali se najčešće primenjuje tzv. Wein-ova klinička klasifikacija i Hirsch-ova histološka klasifikacija. Šira klasifikacija svih patoloških promena u apikalnom parodontijumu je dala Svetska zdravstvena organizacija. U ovom kontekstu često se koristi i klasifikacija Američkog udruženja endodontista (1-4).

## 1.2. Periapexne lezije: etiopatogeneza i inflamatorno-imunske karakteristike

PL su patološke promene oko korena zuba koje najčešće nastaju kao posledica prodora mikroorganizama iz kanala korena zuba. Među mikroorganizmima dominiraju anaerobne bakterije

ali se mogu naći i fakultativni anaerobi i virusi (5). Prema istraživanjima Abou-Rass i Bogen-a, 1998, najčešći uzročnici su: *Actinomyces* (31.8%), *Propionibacterium* (22.7%), *Streptococcus* (18.2%), *Staphylococcus species* (13.6%), *Porphyromonas gingivalis* (4.6%), *Peptostreptococcus micros* (4.6%) и 4.6% Gram negativnih enterobakterija (6). Kolonizacija kanala korena zuba nastaje zbog nekroze pulpe uzrokovane karijesom, zapaljenskim promenama, zbog traumatskog oštećenja ili jatrogenih postupaka. Uzroci nastanka PL mogu biti i termički i hemijski iritansi izazvani endodontskim procedurama, uključujući i efekte mikropartikula gutta-perke ili kristala holesterola (7).

Bakterije koje naseljavaju endodontski prostor u nekrotičnoj pulpi i njihovi produkti dolaze u kontakt sa apeksnim parodontijumom preko apikalnih ili lateralnih kanala, uključujući i ramifikacije pulpe u predelu korena zuba, čime započinje zapaljenski proces. Početni zapaljenski odgovor uključuje vazodilataciju i povećanu permeabilnost krvnih sudova što je praćeno eksudacijom tečnosti i migracijom ćelija iz krvi u periapeksno tkivo (7, 8). Ovi složeni patofiziološki mehanizmi se odvijaju u dvosmernoj komunikaciji između bakterijskih produkata (toksina, enzima) i imunskih komponenti domaćina. Od solubilnih komponenti važni su neuropeptidi, vazoaktivni amini, derivati arahidonske kiseline, produkti razgradnje komponenti komplementa, lizosomalni enzimi, fibrinolitički peptidi i drugi medijatori. Kada su u pitanju ćelijske imunske komponente, u inicijalnoj fazi najznačajniju ulogu imaju rezidentni makrofagi, mastociti i stromalne ćelije periodontalnog ligamenta kao i infiltrišući polimorfonuklearni leukociti i monociti (9). Kasniju fazu, koja postepeno prelazi u hroničnu zbog nemogućnosti imunskog sistema da ukloni infekciju, karakteriše predominantna uloga limfocita i mononuklearnih fagocita (makrofaga), nastalih transformacijom monocita nakon njihove transmigracije iz krvi u tkivo. Međutim, dinamika zbivanja u PL je koordinisana stalnim sadejstvom svih ćelija i solubilnih medijatora u okviru složenih molekulskih i ćelijskih komunikacija (7-9).

Ključnu ulogu u razvoju PL ima imunski sistem domaćina. Iako su bakterije razvile brojne mehanizme izbegavanja imunskog odgovora domaćina, plastičnost imunskog odgovora i razvoj brojnih regulacijskih mehanizama omogućavaju da se u dugom vremenskom periodu zapaljenski procesi u periapeksnom regionu drže pod kontrolom. Cena toga je i osteodestrukcija alveolarne kosti kao finalni mehanizam ograničenja hronične inflamacije (9, 10).

Neki od mehanizama kojima bakterije izbegavaju imunski odgovor domaćina je nemogućnost ispoljavanja adhezivnih molekula, kao što je na primer E-selektin, na endotelnim ćelijama koji su uključeni u mobilizaciju inflamacijskih ćelija iz krvi u tkivo, kao što to čini *Porphyromonas gingivalis* produkcijom lipopolisaharida (LPS). Pojedine Gram-negativne bakterije imaju sposobnost maskiranja antigenskih struktura na svojoj površini. *Actinomyces israelii* formira velike kolonije koje ne mogu biti lako fagocitovane od strane neutrofilnih granulocita (11).

Hronične PL pokazuju patohistološku sliku granuloma ili ciste. Granulomi su sastavljeni iz mononuklearnog infiltrata raspoređenog difuzno ili u obliku manjih ili većih agregata u stromalnom tkivu razorenog, edematoznog i uvećanog periodontalnog ligamenta u periapeksnoj regiji. U granulomu dominiraju limfociti, plazmociti i mononuklearni fagociti uz manje prisustvo neutrofilnih granulocita. Broj neutrofila se povećava u toku egzacerbacije inflamacije u PL, što je često praćeno pojavom kliničkih simptoma u vidu bola i otoka.

Osim ovih ćelija, važnu komponentu čine i dendritske ćelije, koje su ključne antigen prezentujuće ćelije kao i mastociti. Dendritske ćelije imaju sposobnost hvatanja antigena mikroorganizama u PL, preradu proteinskih molekula do peptida i povezivanje peptida sa molekulima glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC). Ovi procesi uzrokuju sazrevanje i migraciju dendritskih ćelija do lokalnih regionalnih limfoidnih tkiva gde se odvija aktivacija antigen-specifičnih T limfocita (12). Da li dendritske ćelije imaju i ulogu u aktivaciji efektorskih T limfocita lokalno u PL nije dovoljno istraženo (7-10).

Patofiziologiji PL značajno doprinose i stromalne komponente kao što su proliferisana ostrvca Malasezovih epitelnih ćelija, endotelne ćelije, fibroblasti, mezenhimske matične stromalne ćelije (MSC) i komponente ekstracelularnog matriksa. MSC su izolovane iz PL i po svojim fenotipskim karakteristikama poseduju sličnosti sa MSC periodontalnog ligamenta kao i sposobnost diferencijacije u adipocite, hondroblaste i osteoblaste (12, 13). Ispoljavaju imunosupresivna i anti-inflamacijska svojstva. Međutim, pod izvesnim okolnostima PL-MSK mogu da stimulišu produkciju pro-inflamacijskih citokina, što ukazuje na njihovu dvostruku ulogu u imunopatogenezi PL (12, 14).

Intenzivnijom proliferacijom Malasezovih ostrvaca nastaje cista koju ove epitelne ćelije ograničavaju. Ciste su po pravilu veće od granuloma ali je i u tkivu oko ciste prisutan sličan inflamatorni supstrat kao kod granuloma. U proliferisalom epitelu posebnu populaciju antigen-prezentujućih ćelija čine Langerhansove ćelije (7-9). Kada su ciste veće lako ih je radiografskim pregledom razlikovati od granuloma na osnovu veće radiotransparentnosti. Međutim, to često predstavlja problem kada je njihova veličina mala. Malasezove epitelne ćelije su, prema istraživanjima Seltzer i sar. 1969, prisutne u 26% ispitivanih PL (15). Proliferacija epitela se dešava pod uticajem različitih lokalno produkovanih citokina i faktora rasta, a sam proces je poznat pod imenom inflamacijska hiperplazija (16, 17). Uloga Malasezovih epitelnih ćelija je najbolje opisana u sklopu regeneracije cementa korena zuba. Pokazano je da su ove histološke strukture pretežno lokalizovane u predelu periodontalnog ligamenta u nivou resorptivnih lakuna i da ispoljavaju koštani morfogenetski protein-2 (*engl.* bone morphogenetic protein, BMP-2), a da su u toku rane faze regeneracije cementa pozitivne na osteopontin i ameloblastin. Pretpostavlja se da su Malasezove epitelne ćelije upravo uključene u proces regeneracije cementa korena zuba u predelu PL (16-18). Skorašnja istraživanja se bave izolacijom i kultivacijom Malasezovih ćelija čime se obogaćuju znanja o njihovoj patofiziološkoj ulozi (19).

U razvoju, progresiji i ograničenju PL učestvuju sve ćelijske komponente i njihovi solubilni produkti. U inicijalnoj fazi su najbitnije ćelije urođene imunosti dok u hroničnoj fazi dominira interakcija efektorskih mehanizama specifičnog imuniteta sa svim ostalim ćelijskim komponentama (9, 20).

Od ćelija urođene imunosti poseban značaj imaju neutrofilni granulociti koji su prva linija odbrane u svakoj inflamaciji, pa i u apikalnom periodontitisu (7-9, 20-23). Neutrofili migriraju iz krvi u tkivo u toku nekoliko minuta pod uticajem hemoatraktanata od kojih je najznačajniji interleukin (IL)-8 odnosno CXCL8, kako se označava prema hemokinskoj nomenklaturi (24). IL-8 produkuju ćelije oralnog epitela, fibroblasti vezivnog tkiva i druge imunske ćelije (25, 26). Neutrofili su pre svega zaduženi za fagocitozu patogenih mikroorganizama i njihovu sledstvenu intracitoplazmatsku digestiju pod uticajem brojnih enzima smeštenih u intracitoplazmatskim

granulama (22-24). Takođe produkuju brojne pro-inflamacijske citokine. Međutim, neutrofilni granulociti mogu oslobađati i komplekse sastavljene od hromatina i enzima (pre svega mijeloperoksidaze) u obliku mreže koja se naziva NET (*engl.* neutrophil extracellular traps), a ceo ovaj proces je poznat pod nazivom NET-ozna. Ovi mehanizmi funkcije granulocita, kojima se mikroorganizmima ograničava mobilnost zbog zarobljavanja u NET-ovima i indirektnog mikrobicidnog efekta enzima (27), verovatno imaju veoma važnu ulogu u patogenezi PL. Međutim, ovi procesi, koji su opisani kod parodontopatije nisu dovoljno izučeni u PL (28). Jedna publikacija pokazuje da aktivirane endotelne ćelije u PL, delovanjem IL-8, indukuju NET-ozna, koja sa druge strane, mehanizmima povratne sprege stimuliše apoptozu endotelnih ćelija (29). U toku hronične inflamacije poput PL, neutrofilni granulociti pospešuju migraciju Th17<sup>+</sup> ćelija koje imaju pro-inflamacijska svojstva. U ovim procesima ključnu ulogu imaju CCL2 i CCL20 hemokini koje produkuju neutrofili (30, 31). Ovi hemokini se vežu za CCR2 odnosno CCR6 hemokinske receptore, koji su karakteristično ispoljeni na Th17<sup>+</sup> ćelijama (32).

Ubrzo nakon prelaska u tkivo monociti se diferenciraju u makrofage ili inflamacijski tip dendritskih ćelija. Makrofagi fagocituju apoptotske neutrofile čime se sprečava oslobađanje proteolitičkih enzima iz granula neutrofila u ekstracelularni prostor. Međutim, kada je akumulacija neutrofila produžena u uslovima hronične inflamacije, fagocitni kapacitet makrofaga nije u stanju da uspešno ukloni mrtve neutrofile tako da brojni proteolitički enzimi granulocita dodatno oštećuju tkivo i dalje stimulišu inflamaciju (33).

Opisane su dve populacije makrofaga koje imaju međusobno antagonističko delovanje. M1 tip makrofaga ima izrazitu fagocitnu funkciju, a produkcijom brojnih proinflamacijskih medijatora, različitih faktora rasta i hemokina značajno doprinosi kako započinjanju tako i propagaciji zapaljenskog procesa u PL. Tome doprinosi i njihova sposobnost stimulacije migracije limfocita i aktiviranje efektorskih funkcija limfocita. Suprotno, M2 tip makrofaga inhibira inflamaciju i pospešuje zarastanje pa je bitan kod reparativnih procesa i proliferacije fibroznog tkiva u PL. Monociti se diferenciraju u proinflamacijske M1 makrofage pod uticajem interferona- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), lipopolisaharida (LPS) ili granulocitno-makrofagnog faktora stimulacije kolonija (GM-CSF). Za razliku od ovih biomolekula, IL-4, IL-13, IL-10 i makrofagni (M)-CSF stimulišu M2 diferencijaciju (34, 35). Skorašnja istraživanja pokazuju da je broj M1 makrofaga veći u cistama kod PL sudeći prema ekspresiji CD68 i produkciji faktora nekroze tumora (TNF)- $\alpha$ . Sa druge strane, u granulomima dominiraju CD163<sup>+</sup> makrofagi, M2 fenotipskih karakteristika, koji mogu imati ulogu u ograničenju inflamacije i podsticanju fibroznih procesa u PL (36).

Mastociti čine relativno malu populaciju imunskih ćelija u PL (37, 38). Mogu se identifikovati imunohistohemijskim metodama na osnovu ekspresije na c-kit na membrani i enzima triptaze koja je specifično lokalizovana u njihovim granulama. Mastociti su brojniji u cistama u odnosu na granulome (39) i najčešće su lokalizovani perivaskularno, između centralnog granulacionog tkiva i periferne fibrozne kapsule. Dosadašnja istraživanja ukazuju da mastociti imaju važnu ulogu u razvoju inflamacije u toku akutnog apikalnog periodontitisa ali i tranziciji akutne inflamacije u hroničnu PL kao i održavanja inflamacije u PL. Ukratko, multiple funkcije ovih ćelija se mogu svesti na nekoliko najvažnijih: povećanje vaskularne propustljivosti, stimulacija angiogeneze, resorpcija koštanih struktura, degradacija ekstracelularnog matriksa i regulacija inflamacije (37, 40).

Ključna uloga ćelija urođene imunosti u PL se prvenstveno odnosi na produkciju proinflamacijskih citokina i drugih biomolekula koji ovi citokini, osim što pospešuju zapaljenske procese različitim mehanizmima, direktno ili indirektno dovode do destrukcije alveolarne kosti. Najznačajniji i najviše izučeni proinflamacijski citokini su IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ . U PL ove citokine predominantno produkuju M1 makrofagi i neutrofili. Međutim, njih sekretuju i druge ćelije kao što su fibroblasti, endotelne i epitelne ćelije, pojedine subpopulacije T limfocita i prirodno ubilačkih (NK) ćelija. Proinflamacijski citokini stimulišu migraciju leukocita u PL, aktiviraju granulocite, makrofage, mastocite, limfocite i druge komponente urođene i stečene imunosti (5, 7). Međutim, svaki od njih ispoljava i pojedine specifične efekte. Za sve proinflamacijske citokine je pokazano da deluju osteolitički aktiviranjem funkcije osteoklasta ili podstičući njihovu diferencijaciju. Delovanje može biti direktno ili indirektno preko drugih medijatora (41, 42).

IL-1 je prvi otkriveni citokin urođene imunosti, koji ostvaruje brojne funkcije delujući na komponente urođene i stečene imunosti. Porodica IL-1 molekula obuhvata IL- $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-1 receptor antagonist, IL-18, IL-33, IL-F5 - IL-F10 (43-45). IL- $\alpha$  i IL- $\beta$  poseduju slične biološke aktivnosti i deluju na isti receptor. Njihova ekspresija je značajno povećana u PL i prema brojnim istraživanjima lokalne koncentracije ovih citokina koreliraju sa stepenom inflamacije i tkivnog oštećenja (20, 46-48). Delovanje IL-1 inhibira antagonist receptora za IL-1 (IL-1R antagonist) (49).

Porodicu IL-6 čine: IL-6, IL-11, leukemijski inhibicioni faktor, onkostatini M, cilijarni neurotrofni faktor, kardiotrofin-1 i -2, kardiotrofinu sličan citokin, neuropoetin i IL-27 (50). Produkcije IL-6 i IL-11 su povećane u PL što korelira sa stepenom inflamacije i stepenom osteolitičkih procesa (20, 51-54). IL-27 takođe pripada i porodici IL-12. Njegova produkcija i uloga u PL je malo istraživana (55, 56). Rezultati Čolića i sar. (55) pokazuju da IL-27 može imati pro- i anti-inflamacijska svojstva u kulturama ćelija izolovanih iz PL. U fazi uspostavljanja ili egzacerbacije PL, IL-27 stimuliše produkciju IFN- $\gamma$ , a inhibira produkciju IL-17 i na taj način stimuliše Th1 imunski odgovor. Suprotno, IL-27 smanjuje Th1 i Th2 imunski odgovor i stimuliše produkciju imunoregulacijskih citokina kod klinički asimptomatskih PL.

IL-8 je jedan od najsnažnijih hemotaktičkih citokina koji indukuje migraciju neutrofila na mesto zapaljenja. IL-8 produkuju brojne ćelije uključujući monocite, limfocite, epitelne ćelije, endotelne ćelije i fibroblaste pod uticajem IL-1, TNF- $\alpha$  i LPS-a (24, 57). IL-8 je detektovan kako u tkivu PL (57, 58) tako i u kulturi ćelija izolovanih iz PL i njegovi nivoi su povezani sa stepenom infiltracije neutrofilnih granulocita (25). Od ostalih hemokina treba spomenuti CCL2, odnosno monocitni hemoatraktantni protein-1 (MCP-1) i makrofagni inflamatorni protein-1 $\alpha$  (MIP1 $\alpha$ ), čija ekspresija je detektovana u PL (33, 59). Oba hemokina privlače neutrofile i monocite na mesto zapaljenja. MCP-1 produkuju endotelne ćelije, epitelne ćelije i fibroblaste pod uticajem LPS-a i drugih inflamacijskih medijatora (9, 33, 34).

TNF- $\alpha$  je jedan od najbolje izučeni pro-inflamacijskih citokina čija se funkcija u urođenom imunskom sistemu značajno preklapa sa delovanjem IL-1. Međutim, sistemski efekti im se značajno razlikuju (60). TNF- $\alpha$  je uključen u rani stadijum zapaljenske kaskade. U inicijalnoj fazi apikalnog periodontitisa TNF- $\alpha$  se oslobađa iz mastocita pod uticajem bakterija i njihovih produkata. U kasnijem toku bolesti, ovaj citokin produkuje brojne ćelije: monocite, makrofage, neutrofilne granulocite, fibroblaste, epitelne i endotelne ćelije, kao i osteoblaste. Slično IL-1,

lokalne koncentracije TNF- $\alpha$  su značajno povećane, posebno kod simptomatskih PL (20, 47, 51, 61-64).

Posle uspostavljanja nespecifičnog imunskog odgovora u PL dolazi do aktivacije specifičnog ćelijskog i humoralnog imuniteta posredovanog T, odnosno B ćelijama. Oba tipa imuniteta (nespecifični i specifični) saraduju međusobno u eradikaciji patogena u PL. Međutim, stalna antigenska stimulacija iz kanala korena zuba dovodi do kontinuirane aktivacije imunskog odgovora što je praćeno stalnim nakupljanjem inflamacijskih ćelija u periapeksno tkivo, daljom produkcijom pro-inflamacijskih citokina i medijatora. Ovi biomolekuli u sadejstvu sa osteolitičkim medijatorima i enzimima iz porodice matriksnih metaloproteinaza dovode do destrukcije vezivnog tkiva i čvrstih dentalnih i koštanih struktura (20, 65).

Obe komponente specifičnog imunskog odgovora imaju podjednak značaj u patogenezi PL s tim što su T limfociti više izučavani. T ćelije u zavisnosti od fenotipa pomažu komponentama urođene imunosti u eliminaciji mikroorganizama (pomoćnički „helper” limfociti koji ispoljavaju CD4 fenotip; Th limfociti, sinonim Th ćelije), ili direktno ubijaju ćelije zaražene mikroorganizmima (citotoksični limfociti, CD8 fenotipa) (66). Postoji više podvrsta efektorskih T limfocita i one su brojnije kod Th limfocita. Th limfociti su bitni i za aktivaciju B limfocita na proteinske antigene koji, nakon diferencijacije u plazma ćelije, produkuju specifična antitela (67).

Citokini Th limfocita zauzimaju centralno mesto u kompleksnoj citokinskoj mreži kod PL ali i drugih hroničnih periodontalnih inflamacija kao što je parodontopatija. Populacija efektorskih Th limfocita je veoma heterogena i obuhvata najmanje 4 dobro definisana podtipa koji su označeni kao Th1, Th2, Th17 i T regulatorni podtip. Njihova diferencijacija od naivnih CD4<sup>+</sup> T limfocita zavisi od prirode antigenkog stimulusa i okruženja u kome se ovi procesi odigravaju (68).

Dinamika polarizacije Th limfocita je najverovatnije kontinuirani proces, obzirom da se u PL lezijama istovremeno detektuje više različitih Th citokina. Pretpostavlja se da u inicijalnoj fazi dolazi do aktivacije Th1 odgovora praćenog produkcijom IFN-gama u cilju pomoći M1 tipu makrofaga. Ovaj citokin je najpotentniji aktivator M1 makrofaga, koje su efektorske ćelije celularnog imuniteta. IL-12 je ključni citokin koji usmerava imunski odgovor prema Th1 (69). Njega produkuju aktivisane antigen-prezentujuće ćelije (dendritske ćelijepr, Langerhansove ćelije, makrofagi). Th1 odgovor protiče po tipu reakcije kasne preosetljivosti, koja se najčešće sreće u ranoj fazi razvoja PL (9, 20, 35). Zbog toga veći broj autora smatra da je stimulacija Th1 odgovora od bitnog značaja za propagaciju zapaljenskog procesa u periapeksnoj mikrosredini obzirom da pojedine studije pokazuju da visoki nivoi IFN- $\gamma$  u PL koreliraju sa stepenom osteodestrukcije. Međutim, ima i suprotnih nalaza koji ukazuju na to da uspešan Th1 odgovor kontroliše i ograničava zapaljenske procese u PL (35, 70, 71).

U odsustvu IL-12, imunski odgovor biva usmeren u pravcu Th2, u kome CD4<sup>+</sup> T limfociti produkuju IL-4, IL-5 i IL-13 (68, 69). Ovi citokini stimulišu humoralni imunski odgovor koji je inače fiziološki značajan u eliminaciji helminata. Postoji stalan balans između ova dva tipa specifičnog imunskog odgovora, obzirom da Th1 inhibira Th2 i obrnuto (68, 69). Brojni rezultati eksperimentalnih i kliničkih studija su pokazali da su u toku razvoja PL prisutna oba tipa imunskog odgovora, ali da u kasnijoj fazi oboljenja predomina Th2 koji je povezan sa ograničenjem zapaljenskih procesa u PL. Za sada nema čvrstog odgovora šta određuje prirodu Th1/Th2 odgovora

u PL ali se svakako može povezati sa prirodnom antigenske stimulacije, dužinom trajanja hronične inflamacije i kompleksnošću citokinske mreže (20, 71-73).

Neki od faktora koji utiču na polarizaciju Th odgovora u PL, a koji su povezani sa genetskim faktorima su opisani kod parodontopatije. Naime pokazano je da su pojedini sojevi miševa podložni infekciji sa *P. gingivalis*, dok su drugi rezistentni. Rezistentni sojevi razvijaju snažan Th1 odgovor i visok nivo IgG2a antitela. Sa druge strane, osetljivi sojevi razvijaju slab Th1 odgovor koji je praćen visokim nivoom IgG1 antitela (74-77). Dobro je poznato da pojedine komponente bakterija različito stimulišu Th odgovor. Kao primer navodi se LPS iz *E. coli* koji vezivanjem za Toll slični receptor 4 (TLR-4) na antigen-prezentujućim ćelijama stimuliše produkciju IL-12 i Th1 odgovor. Suprotno tome, LPS iz *P. gingivalis*, vezivanjem za TLR-2, indukuje Th2 odgovor (74, 78). IL-33, široko eksprimiran citokin, je takođe prisutan i u PL.

IL-33 je inicijalno pokazan kao snažan stimulator Th2 imunskog odgovora (alergijske bolesti). Međutim, dalja istraživanja su pokazala da ovaj citokin, koji se inače oslobađa i iz oštećenih ćelija (alarmin), ima mnogobrojne i raznovrsne funkcije u brojnim hroničnim zapaljenskim bolestima, delujući ne samo na Th2 već i na Th1 i T regulatorni imunski odgovor (79).

Th17 je treća subpopulacija Th ćelija koja ima značajnu ulogu u patogenezi PL. Th17 ćelije proizvode više različitih citokina od kojih su najviše izučeni IL-17A i IL-22. Na diferencijaciju ovih ćelija utiču IL-1, IL-6 i TGF-beta, a na klonsku ekspanziju i aktivaciju efektorskih Th17 ćelija ključnu ulogu ima IL-23 (80). IL-23, zajedno sa IL-27 i IL-35, pripada IL-12 familiji citokina koji imaju prevashodni značaj u polarizaciji Th odgovora i regulaciji imunskih funkcija (81). Th17 imunski odgovor je značajan za patogenezu brojnih autoimunskih bolesti, a visoki nivoi IL-17 su nađeni i u tkivu zahvaćenog parodontopatijom, u PL lezijama, uključujući i dokazanu produkciju u ćelijskim kulturama iz PL (20, 82, 83). Smatra se da IL-17A, posredstvom stimulacije produkcije IL-6, IL-8 i PGE2 i aktivacije osteoklasta direktno utiče na progresiju oboljenja. U prilog ovoj pretpostavci su i rezultati koji pokazuju da *P. gingivalis* stimuliše transkripciju gena za IL-17 kod ljudi (84). Naši radovi pokazuju da su nivoi IL-17 najveći u simptomatskim PL u fazi egzacerbacije inflamacije. U ovim interakcijama je važna interakcija između IL-8 i Th17 ćelija (85).

Indirektno delovanje proinflamacijskih citokina na procese osteolize kod hronične parodontopatije i apikalnog periodontitisa je povezano sa ekspresijom liganda za receptor koji aktivira nuklearni faktor kapa B (RANKL). RANKL je jedinstven citokin koji direktno kontroliše funkciju osteoklasta, ključnih osteolitičkih ćelija, delujući na svoj receptor (RANK). Pripada superfamiliji TNF liganada. Najčešće je ispoljen na infiltrišućim limfocitima ali i na fibroblastima i drugim stromalnim ćelijama, a takođe se može naći i u solubilnoj formi (86). Aktivacija osteoklasta posredstvom RANKL – RANK interakcije je veoma strogo kontrolisana. U tome ključnu ulogu ima molekul koji se naziva osteoprotegerin (OPG). Ovaj citokin veže RANKL i na taj način onemogućava njegovo vezivanje za RANK (87).

Više radova je pokazalo uključenost RANKL – RANK i OPG sistema u razvoju PL (88-91). Naši skorašnji radovi pokazuju da je nivo RANKL veći u supernatantima kultura PL ćelija iz simptomatskih lezija u kojima dominiraju T ćelije u odnosu na B ćelije i plazma ćelije. U ovim lezijama je nađen i veći odnos RANKL/OPG u odnosu na asimptomatske lezije. Produkcija RANKL u kulturama PL ćelija je bila stimulirana dodatkom IFN- $\gamma$ , IL-17 i većim koncentracijama



IL-33 (92). Pokazano je da IFN- $\gamma$  stimuliše diferencijaciju osteoklasta posredstvom direktnog delovanja na prekursore osteoklasta, ali i posredstvom produkcije RANKL i TNF- $\alpha$  (93) što je u skladu sa našim nalazima. Međutim, objavljeni su i suprotni nalazi da IFN- $\gamma$  inhibira stvaranje osteoklasta delujući na RANKL-RANK signalni put (94). Suprotno našim nalazima o stimulatornom delovanju citokina na produkciju RANKL, pokazali smo da IL-10 i niže koncentracije IL-33 stimulišu produkciju OPG, što je od značaja za inhibiciju osteodestruktivnih procesa u PL (92).

Jedina populacija Th limfocita koja ima dominantne imunosupresivne funkcije je populacija Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatornih ćelija (*engl.* Tregs). Njihovo prisustvo je dokazano u PL (95) i ove ćelije su ključne u supresiji imunskog odgovora, inflamacije i osteolize. Tregs ostvaruju ove efekte putem produkcije transformišućeg faktora rasta- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-10 i IL-35 (96-98). IL-10 i TGF- $\beta$  inhibiraju produkciju RANKL i povećavaju produkciju OPG (99), čime indirektno doprinose zaustavljanju osteolitičkih procesa u PL.

U ovim mehanizmima značajnu ulogu imaju i Th2 citokini. Pokazano je da IL-4 direktnim delovanjem sprečava diferencijaciju prekursora osteoklasta posredstvom STAT-6 signalnog puta (*engl.* signal transducer and activator of transcription). Osim toga, IL-4 inhibira ekspresiju RANK a povećava ekspresiju OPG (100). Da li i koliko osteodestruktivnim procesima doprinose i drugi podtipovi Th ćelija, kao što su Th9 i Th22, koji su prisutni u PL i za koje se pretpostavlja da učestvuju u stabilizaciji zapaljenskih procesa u PL (101) se malo zna. Supresiji imunološke reaktivnosti u PL doprinose i tzv. iscrpljene T ćelije koje ispoljavaju koinhibicijske receptore kao što su PD-1 (*engl.* programmed cell death protein-1) i LAG-3 (*engl.* lymphocyte-activation gene 3). Skorašnji rad (102) pokazuje povećanu akumulaciju T ćelija u PL koje ispoljavaju ova dva inhibicijska molekula, pri čemu je njihova brojnost veća u granulomima u odnosu na ciste.

### 1.3. Dijagnoza periapexskih lezija

Dijagnoza PL se postavlja na osnovu anamneze i kliničkog pregleda (inspekcija, palpacija, perkusija, ispitivanja vitaliteta, ispitivanje pokretljivosti zuba) i rendgenskog snimanja (103). Osnovni dijagnostički parametri koji ukazuju na prisustvo PL mogu se sumirati na sledeće: obavezno prisustvo karijesa i nekroze pulpe, odsustvo akutnih simptoma, ponekad palpatorna osetljivost u predelu vrha korena zuba, osetljivost na vertikalnu perkusiju i periapexsno radiografsko rasvetljenje.

Standardni intraoralni rendgenski snimak uz ortopan je i dalje zlatni standard uprkos dostupnosti savremenijih kompjuterizovanih tomografskih snimaka. Radiografski snimak je nezamenjiv i nužan ne samo u dijagnostici već i u praćenju efekta lečenja. Ipak, većina patoloških promena u pulpi, kao i PL u ranom stadijumu, nisu vidljive na snimku. Promene postaju vidljive tek kada se zapaljenski proces proširi i dođe do resorpcije alveolne kosti i tvrdih zubnih tkiva. U svakom slučaju uvek se mora analizirati veza između pulpe i periapexsnog tkiva, jer je vidljivo rasvetljenje u periapexsu obično udruženo sa nekrozom pulpe. Takođe treba istaći da rasvetljenje u periapexsnom području zuba s vitalnom pulpom najverovatnije nije endodontskog porekla, a često može biti i normalna struktura. Osim prosvetljenja na rendgenskom snimku može se videti i zasenčenje (kondenzirajući ostitis ili nepatološka sklerozacija kosti) (104, 105).

Dvodimezionalni standardni rendgenski snimak je često nepouzdan (lažno pozitivan ili lažno negativan), jer on zapravo prikazuje trodimenzionalnu strukturu pri čemu postoji mogućnost superponiranja anatomskih struktura sa periapexnim područjem pojedinih zuba (npr. *foramen mentale*, *foramen nasoplatinum*). Da bi se nepouzdanost smanjila bitno je voditi računa o vremenu ekspozicije snimanja, uglu snimanja, kvalitetu filma i drugim parametrima (104). Zato se zbog navedenih nedostataka, u savremenoj rendgenskoj dijagnostici uvode nove metode kao što su „Cone Beam” kompjuterska tomografija, (CBCT) koja ima daleko veći stepen dijagnostičke tačnosti i preciznosti u prikazu anatomskih i patoloških karakteristika zuba i okolnih struktura. Treba naglasiti da se primenom ove tehnike značajno smanjuje doza zračenja, u odnosu na standardne radiografske metode (106, 107).

#### **1.4. Terapija periapexnih lezija**

Terapija PL se može podeliti na nehiruršku i hiruršku. Nehirurška terapija podrazumeva uklanjanje promenjene pulpe, mehaničko-medikamentozne i hemijske obrade i širenja kanala korena, a zatim njegovu potpunu opturaciju odgovarajućim materijalima. Čišćenje, širenje i punjenje kanala se po pravilu završava u području unutrašnjeg otvora kanala korena kako bi se izbeglo bilo kakvo dodatno traumatsko oštećenje periapexnog tkiva, a time i omogućilo njegovo fiziološko zarastanje. Da bi se endodontski tretman uspešno sproveo potrebno je, osim obezbeđenja aseptičkog radnog polja, da postoji dovoljno sačuvanog zdravog zuba i potpunog aparata zuba, mogućnost adekvantne instrumentacije endodontskog prostora i njegovog potpunog popunjavanja. (108).

Materijal za punjenje kanala korena treba da poseduje svojstva potpune hermetičke opturacije apexnog otvora i kanala korena sa koronarne strane kao i akcesorne i lateralne kanale u cilju sprečavanja reinfekcije endodontskog prostora. Za opturaciju tradicionalno se koristi gutta-perka i različiti cementi. Takođe je bitno da funkcija zuba bude sačuvana i da je endodontsko lečenje estetski korektno. Međutim, uspeh endodontskog lečenja se procenjuje na 68-93% (108-110). Kao što je već istaknuto, neuspeh konvencionalnog lečenja može biti i uzrok nastanka PL koja ranije nije postojala. U tom cilju neophodna je endodontska reintervencija koja se sastoji iz ponovnog čišćenja i dezinfekcije kanala od krune do korena i njegova ponovna opturacija. Opšte je prihvaćeno mišljenje je da lečenje pulpnih i periapexnih procesa prvenstveno treba da bude nehirurško, a da se hirurške metode koriste samo u slučajevima neuspeha konvencionalne metode ili kao dodatak konvencionalnoj terapiji kod potrebe za korektivnim ili reparativnim intervencijama. Najčešći hirurški zahvati su: incizija, apikotomija, kiretaža, amputacija korena i hemisekcija (108-111).

Kao što je u uvodu naglašeno, apikotomijom se vrši odstranjenje apikalne trećine korena zuba zajedno sa patološkim procesom. Standardni postupak apikotomije uključuje sledeće korake: podizanje mukoperiostalnog režnja, trepanaciju kosti u projekciji vrha korena zuba, uklanjanje PL pomoću kirete, odstranjenje vrha korena, retropreparaciju korena do dubine od 3 mm, aplikaciju sveže pripremljenog materijala za retrogradnu opturaciju kanala vrha korena, vraćanje mukoperiostalnog režnja u prvobitno stanje i suturu režnja (112, 113). Apikotomija nije indikovana kada su ugrožene anatomske strukture kao što je blizina maksilarnog sinusa, blizina nerava, nemogućnost adekvatnog pristupa PL i nepovoljan odnos kliničke krune i korena. Takođe,

postoje i sistemske kontraindikacije a vezane su za pojedine ozbiljne bolesti pacijenta. Kada se kod takvih pacijenata ova hirurška procedura mora sprovesti postoje jasni protokoli zbrinjavanja kako bi se izbegle komplikacije (112-115).

Nakon odstranjenja PL, najznačaniji postupak u endodontskoj hirurgiji predstavlja retrogradno punjenje kanala korena zuba u cilju njegove potpune opturacije. Na taj način se sprečava dalji prodor mikroorganizama, čime se omogućava zarastanje PL i regeneracija koštanog tkiva. Indikacije za retrogradno punjenje kanala korena se mogu svrstati u sledećih 5 grupa (116):

1. Apikotomija zuba u kojem je odumrla pulpa u razvojnoj fazi, a *foramen apicis dentis* je široko otvoren tako da se kanal korena ne može adekvatno ortogradno ispuniti.
2. Apikotomija zuba u čijem je kanalu slomljena igla, koja se prilikom endodontskog lečenja, a ni hirurškim pristupom, ne može odstraniti, te sprečava ortogradno punjenje kanala korena.
3. Apikotomija zuba u čijem je kanalu cementiran protetski rad na kočiću, a kanal nije u potpunosti ispunjen.
4. Apikotomija zuba u kojem je došlo do opstrukcije kanala korena zbog odlaganja dentina u kanalu (dentikli, pulpoliti, obliteracije i drugi uzročnici).
5. Neuspešna apikotomija nakon punjenja kanala korena fosfatnim cementom i gutta-perkom.

Može se još navesti da je retrogradno punjenje uvek indikovano i kada se posumnja na varijante apikalnih ramifikacija, prisustvo acesornih kanala na različitim nivoima od vrha zuba, kao i prisustvo bezmetalnih protetskih radova kod kojih postoji realno velika mogućnost da dođe do preloma prilikom trepanacija pulpe rotirajućim instrumentima (114, 115).

## **1.5. Materijali za retrogradno punjenje kanala korena**

Načela koja bi trebali da zadovolje materijali za punjenje kanala korena postavio je Grossman još pre 50 godina (117). Po njemu najvažnija svojstva materijala koji se koriste za ove namene su: sposobnost adherencije za površinu zuba; u potpunosti zatvaranje kanala apikalno i lateralno; trodimenzionalna stabilnost; biokompatibilnost; sposobnost stimulacije regeneracije parodontnog tkiva; korozivna stabilnost; da ne boji zube; nepropustljivost za rendgenske zrake i lako rukovanje.

Materijali treba da imaju stalan volumen pri čemu se širenje pri stvrdnjavanju smatra poželjnom, a kontrakcija nepoželjnom pojavom. Materijal treba da bude nerastvorljiv u tkivnim tečnostima da ne bi iritirao periapeksno tkivo. Na taj način se sprečava pojava inflamacije u periapeksnom tkivu, a time i nepovoljno dejstvo na njegovu regeneraciju. Takođe je poželjno i da poseduje baktericidno delovanje. Do sada najčešće korišćeni materijali za ovu namenu su amalgam, glasjonomer cementi, cink oksid eugenol cementi ojačani polimetil-metakrilatom ili superetoksi benzoičnom kiselinom i bioregenerativni cementi (118, 119).

### **1.5.1. Amalgam**

Amalgam je najduže korišćeni material za retrogradno punjenje kanala korena zuba. Uprkos brojnim nedostacima, među kojima se posebno naglašava njegova citotoksičnost, amalgam se i danas široko koristi posebno u ekonomski nerazvijenim zemljama. Postoje više prednosti za korišćenje amalgama u ove svrhe. Najpre on je lako dostupan, jednostavan je za rukovanje, poseduje sposobnost samozaptivanja, nije rastvorljiv i poseduje izuzetnu radiokontrastnost.

Amalgam koji se koristi za retrogradno punjenje je legura bez cinka i osim žive sadrži srebro (40–70%), kalaj (12–30%) i bakar (12–24%). Međutim, amalgam poseduje i brojne nedostatke. Osim citotoksičnosti koja je uzrokovana korozivnom nestabilnošću i oslobađanjem jona žive i drugih metalnih jona u biološke tečnosti, osetljivost na vlagu, teškoće pri stvrdnjavanju, i obojenost mekih i tvrdih tkiva su značajni problemi. Osim toga, postoji mogućnost da tokom manipulacije dođe do oslobađanja mikropartikula u operativnu ranu koje je teško ukloniti. Ono što je sa funkcionalnog aspekta bitno je da amalgam nema sposobnosti dobre trodimenzionalne opturacije vrha korena zuba. Takođe marginalna adaptacija amalgama je relativno loša zbog čega ne može da se spreči mikročurenje, a time i prodor mikroorganizama u periradikularno tkivo (119-121).

### **1.5.2. Glasjonomerni cementi**

Glasjonomerni cementi, kao što je na primer Ketac Silver, su našli primenu kod retrogradne opturacije kanala korena zbog svoje hemijske sposobnosti vezivanja za dentin. Dodatne osobine, koje čine ove materijale pogodnim ne samo za ovu već i druge primene u stomatologiji su: zadovoljavajuća biokompatibilnost uprkos niskoj toksičnosti i neiritantnost tkiva. Međutim, ukoliko se ovi cementi nađu u vlažnoj sredini ili u kontaktu sa krvlju tokom inicijalne faze vezivanja, dolazi do slabljenja adhezije za dentin. Nedostatak im je i nedovoljna radiokontrastnost. U svrhu poboljšanja tog svojstva danas se glasjonomernim cementima dodaje srebro. Ovako ojačani glasjonomerni cementi pokazuju veoma dobra svojstva kod retrogradne opturacije kanala korena (122).

### **1.5.3. Cink oksid eugenol cementi**

Najznačajniji predstavnici ove grupe materijala za retrogradno punjenje kanala korena su cink oksid eugenol cementi ojačani polimetil-metakrilatom ili aluminijum oksidom sa dodatkom benzoične kiseline.

Cink oksid eugenol cement ojačan polimetil-metakrilatom je poznat pod imenom IRM (*engl.* Intermediate Restorative Material). Polimetil-metakrilat je smola koja smanjuje rastvorljivost i povećava čvrstoću materijala. IRM cementu je dodat hidroksiapatit koji povećava biokompatibilnost materijala i poboljšava njegovu moć opturacije kanala. Međutim, nedostatak je što hidroksiapatit čini materijal podložnijim dezintegraciji, što omogućava mikročurenje i prodor mikroorganizama i iritansa kroz porozne strukture materijala u periapeksno tkivo. Takođe, nedostatak IRM je što u vlažnoj sredini nema sposobnost vezivanja između slojeva materijala zbog čega se u kavitet unosi u jednom komadu (123).

Super etoksi benzoična kiselina (Super EBA) svojim komponentama doprinosi boljim svojstvima cink oksid eugenol cementima. Ortobenzoična kiselina doprinosi smanjenju udela eugenola u cementu čineći ga time manje agresivnim prema tkivu. Ovaj cement ima neutralni pH, slabu rastvorljivost i slabu radiokontrastnost.

Prednosti Super EBA u odnosu na IRM su u tome što Super EBA ima sposobnost vezivanja u vlažnoj sredini pa se samim tim može nanositi slojevito. Glavni nedostaci su brzo stvrdnjavanje i slaba ili skoro nikakva adhezije na dentin. Zbog toga se adhezija za dentin pospešuje kondicioniranjem dentina poliakrilnom kiselinom (124).

#### **1.5.4. Mineral-trioksid agregat**

Mineral-trioksid agregat (MTA) pripada grupi bioaktivnih materijala koji se koriste za različite vrste pulpnih i endodontskih procedura. Ovi materijali su sastavljeni od trikalcijum silikata i dikalcijum silikata i izvorno su konstituenti Portland cementa koji se široko koristi u industriji (125, 126). Od ove grupe materijala su proizvedene brojne modifikacije pa se zato nazivaju i bioaktivni cementi MTA tipa (127). Sva tri disilikatna materijala, isključujući one na bazi smole imaju sledeće zajedničke karakteristike: za reakciju vezivanja neophodna je voda i zato se nazivaju i hidraulični cementi, imaju bazni pH (>7), oslobađaju jone kalcijuma i postepeno otvrdnjavaju (za oko 4 nedelje). U komponente ovih silikatnih cementa se dodaju radiokontrastna sredstva. Zato se ovi tipovi cementa koriste i kao zlatni standard kod mnogih endodontskih procedura (127, 128).

Prah MTA čine hidrofilne čestice trikalcijum silikata, trikalcijum-aluminata, trikalcijum oksida i silikat oksida. Tečni deo čini redestilovana voda. Komercijalno dostupni MTA materijali su ProRoot MTA, MTA Angelus, MTA Plus, MTA Fillapex, CPM Sealer i mnogi drugi, a proizvodi ih preko 25 svetskih kompanija (127). Tokom stvrdnjavanja iz MTA se otpušta kalcijum hidroksid, čime se povećava baznost pH. MTA je hidrofilni materijal veoma dobre radiokontrastnosti. Njegova sposobnost vezivanja za dentin je slična glasjonomernim cementima ali za to nije potrebna bilo kakva priprema površine dentina (129). MTA je biokompatibilan i bioaktivni material, što je potvrđeno u brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama. Sposobnost stimulacije regeneracije koštanog i fibroznog tkiva, stimulacija stvaranja cementa i diferencijacija osteoblasta upravo se pripisuje dejstvu hidroksilnih jona (130). Zbog dobre sposobnosti adhezije i opturacije MTA je našao veliku primenu u endodontiji i endodontskoj hirurgiji kod retrogradnog punjenja kanala, ali se koristi uspešno i kao restaurativni materijal. Nedostatak mu je dugo vreme primarnog stvrdnjavanja (od čak nekoliko sati) što otežava njegovu primenu u toku endodontsko-hirurškog tretmana (127, 131). Osim toga, sa ovim materijalom se teže manipuliše zbog čega se koriste posebno konstruisani mikro-nosači za MTA. Višak materijala se uklanja mikro-parodontološkim kiretama (127).

#### **1.5.5. Inovativna biokeramika**

Veliki broj materijala koji pripada porodici MTA materijala na bazi tri/dikalcijum silikata, se koristi u savremenom endodontskom lečenju korena zuba. Ovi materijali sadrže cirkonijum dioksid, kalcijum silikat, kalcijum fosfat, kalcijum hidroksid i ostale komponente. Materijali su hidrofilni i imaju sposobnost stvaranja hidroksiapatita čime se stvara hemijska veza između

dentinskih zidova i materijala za punjenje (132, 133). Neki od savremenijih biokeramičkih materijala koji pripadaju tzv. inovativnoj biokeramici su našli primenu i kod retrogradnog punjenja kanala. BioAggregate prah sadrži trikalcijum silikat, dikalcijum silikat, *tantalium pentoxide*, monobazni kalcijum fosfat i amorfni silikon oksid. Tečni deo je voda (133). Sličnih svojstava je i BP-RPM inovativna biokeramika (*engl.* iRoot BP Plus Root Repair Material) koja sadrži kalcijum silikat, cirkonijum oksid, tantal oksid/pentoksid i monobazni kalcijum fosfat. U odnosu na BioAggregate koji ima dugo vreme stvrdnjavanja (oko 20 časova), vreme stvrdnjavanja BP-RPM je znatno kraće i iznosi oko 2 sata (134).

ERRM inovativna biokeramika (*engl.* EndoSequence Root Repair Material) je u obliku paste i sadrži kalcijum silikat, cirkonijum oksid, tantal oksid, monobazni kalcijum fosfat sa dodatkom još pojedinih komponenti koji pomažu u procesima punjenja kanala. Vreme stvrdnjavanja ovog materijala je oko 4 sata (135).

Kao i kod MTA, i kod ovih biokeramičkih materijala stvrdnjavanje započinje procesom hidratacije čestica kalcijum silikata, pri čemu nastaje kalcijum silikatni gel i kalcijum hidroksid. Kalcijum hidroksid dalje reaguje sa fosfatnim jonima pri čemu se stvara hidroksiapatit i voda. Voda dalje reaguje sa česticama kalcijum silikata, čime se proces kontinuirano nastavlja sve do potpunog stvrdnjavanja (127).

## **1.6. Biodentin**

### **1.6.1. Osnovna fizičko-hemijska svojstva Biodentina**

Bidentin je noviji trikalcijum silikatni cement iz grupe MTA tipa materijala koji se pod ovim imenom pojavio na tržištu 2009. godine od proizvođača Septodont, Saint Maur des Fosses, Francuska. Sastoji se od kapsule sa prahom i ampule sa tečnom komponentom. Glavnu komponentu praha čini trikalcijum silikat uz dodatak dikalcijum silikata, kalcijum karbonata i cirkonijum dioksida. Silikati čine 80.70%, a kalcijum karbonat 14.25% mase praha. Trikalcijum silikat predstavlja glavnu komponentu praha i odgovoran je za osnovna fizičko-hemijska svojstva materijala i za reakciju vezivanja. Kalcijum karbonat ima ulogu punilaca koji je odgovoran za mehaničke karakteristike. Cirkonijum dioksid (5%) se dodaje radi rendgenkontrastnosti odnosno bolje vizualizacije materijala kod rendgenskog snimanja. On je bolji u odnosu na bizmut oksid koji se koristi kod drugih cementa u ove svrhe zbog bolje biokompatibilnosti i veće otpornosti na koroziju. Međutim, njegova radiotransparentnost je manja. Tečnost predstavlja rastvor kalcijum hlorida (14.7%) u destilovanoj vodi koji služi za ubrzavanje reakcije stvrdnjavanja i polimera (Premium 150) u koncentraciji od 3% koji smanjuje sadržaj vode u cementu (136-138).

Kao i kod svih cemenata, i kod Biodentina tokom mešanja tečne i čvrste komponente dolazi do reakcije hidratacije i formiranja silikatne gelozne faze i kalcijum hidroksida, čime je omogućena dalja jonska razmena i stvrdnjavanje. Silikatni gel je neka vrsta matriksa cementa, a kristali kalcijum karbonata popunjavaju prostore između čestica, poboljšavajući mehaničke karakteristike materijala (139, 140). Neizreagovane trikalcijum silikatne čestice bivaju okružene slojem silikatnog gela koji je relativno nepropustljiv za vodu, čime se usporavaju dalje reakcije. Formirani

silikatni gel stalno podstiče hidrataciju trikalcijum silikata a time i ponovnog stvaranja novog silikatnog gela i kalcijum hidroksida. Na taj način se postepeno popunjava prostor između trikalcijum silikatnih zrna (140-142).

U poređenju sa drugim cementima na bazi kalcijuma, Biodentin ima dve prednosti: brže vreme vezivanja koje iznosi od 6-12 minuta i bolje mehaničke karakteristike. Tokom početne faze vezivanja Biodentina, dolazi do pojave poroznosti koja se postepeno popunjava tokom narednih dana novim kristalnim strukturama. Ovu reakciju ubrzava tečni kalcijum hlorid koji je poznat kao veoma efikasan akcelerator hidratacije. U kasnijoj fazi čvrsta faza se pojačava i konačno dostiže maksimum stvrdnjavanja nakon dve nedelje (139, 142). U toku procesa očvršćavanja dolazi do formiranja kristala koji se mogu naći u prezasićenom rastvoru. Kod potpunog stvrdnjavanja se zaustavlja pokretljivost slobodnih jona u porama ispunjenim elektrolitom. Jedna od metoda kojim se procenjuje očvršćivanja cemenata je impedantna spektroskopija. Ova metoda se bazira na merenju električnog otpora koji se povećava sa smanjenjem pokretljivosti jona odnosno smanjenja poroznosti materijala (136, 140, 141).

Elastični modulus Biodentina iznosi 22.0 Gpa, i veoma je sličan dentinu koji iznosi 18.5 Gpa (136, 137). Jačina kompresija je oko 220 MPa što je takođe slično jačini kompresije kod dentina (290 MPa) (136, 137). Slična je i mikročvrstoća Biodentina i dentina koja iznosi 60 HVN. Savojsna čvrstoća je oko 34 mPa. Testovi rezistencije na kiselinu i eroziju u kiseloj sredini pokazuju manju površinsku dezintegraciju Biodentina u odnosu na druge cimente (136-140, 143).

U kontaktu sa dentinom i drugim zubnim strukturama, dolazi do formiranja kristalne mreže između Biodentina i tvrde zubne supstance. Zbog ovih specifičnih svojstava, koja se povezuju sa lakim otpuštanjem kalcijumovih i hidroksilnih jona i sledstvenim stimulacijskim efektima na stvaranje dentina i osteoblasta, Biodentin je našao široku primenu u stomatologiji: kod ispuna, kao dentinski zamenik, za direktno i indirektno prekrivanje pulpe, za prekrivanje perforacija na bilo kom nivou komore pulpe, biopulpotomije, internih i eksternih resorpcija, u apeksnoj hirurgiji kod retrogradnog punjenja kanala korena i terapije nezavršenog rasta korena (apeksifikacija). Može se uopšteno reći da se Biodentin koristi kao zamenik za dentin zbog stimulacije formiranja tercijernih dentinskih struktura, kao materijal koji održava vitalitet zubne pulpe i kao osteoregenerativni materijal (144-146).

Za uspeh materijala koji se koriste za prekrivanje perforacija i pulpe ili retrogradnog punjenja od ključnog značaja je njihova sposobnost hermetičkog zatvaranja. U tom smislu poroznost materijala je najbitnija karakteristika kako bi se spečilo mikrocurenje, a time i mogućnost prolaza bakterija kroz mikropukotine. Poroznost se lakše postiže u kontinuiranoj vlažnoj mikrosredini pa zato Biodentin ima dodatnu prednost kod retrogradnog punjenja u odnosu na druge primene kada je bitno da materijal ostane suv (145, 147).

Dobru opturaciju Biodentina, posebno na marginama, omogućuju kristali hidroksiapatita koji se stvaraju pri kontaktu Biodentina i tvrdog zubnog tkiva. Precipitaci hidroksiapatita prodiru u dentinske kanaliće čime se stvara hemijska veza između dentina i cementa. Deponovanju hidroksiapatita u kontaktu Biodentina i dentina pomažu i fosfatni joni iz pljuvačke, što zajedno sa sposobnošću materijala da se dodatno širi, doprinosi adhezivnim svojstvima Biodentina (148).

Prodor hidroksiapatitnih kristala u dentinske tubule je veći u odnosu na druge cemente čime se ostvaruje veći stepen zaštite tvrdog zubnog tkiva od demineralizacije.

Za materijale koji se koriste za gore navedene namene je takođe važna njihova stabilnost u vlažnoj mikrosredini, kao što su krv ili biološke tečnosti, odnosno njihova otpornost na dezintegraciju. Nijedan od do sada korišćenih materijala nije apsolutno stabilan, ali se u odnosu na druge cemente stabilnost Biodentina procenjuje kao zadovoljavajuća, najverovatnije zbog efekta polimera koji ima surfaktantna svojstva.

Biodentin poseduje i antimikrobna svojstva zbog visokog, baznog pH (oko 12) koji potiče od kalcijum hidroksida. Osim toga, bazna sredina deluje i kao dezinficijens na okolna meka tkiva i koštane strukture (149).

### **1.6.2. Biokompatibilnost i bioaktivnost Biodentina**

Kada je u pitanju primena Biodentina kod retrogradne opturacije kanala korena zuba za sada su objavljeni povoljni rezultati u smislu odsustva inflamacije i stimulacije reparacije mekog i koštanog tkiva kroz prikaz nekoliko slučajeva (150-152). Rezultati ozbiljnijih kliničkih studija do sada nisu objavljeni. Prvi povoljni klinički rezultati se temelje na studijama o efikasnosti Biodentina kod drugih indikacija, prvenstveno zasnovanih na stimulaciji formiranja dentina i rezultata *in vitro* studija kojim je pokazano da je Biodentin biokompatibilni materijal sa potencijalom stimulacije osteoblasta i odontoblasta (153-156).

Biokompatibilnost nekog materijala se definiše kao odsustvo izazivanja neželjenih reakcija materijala u kontaktu sa organizmom, pri čemu materijal treba da u potpunosti ostvari željenu funkciju. Drugim rečima, biokompatibilnost je sposobnost materijala da pri kontaktu sa tkivom ne uzrokuje njegovo oštećenje, toksičnu reakciju, iritaciju, zapaljensku i alergijsku reakciju ili mutagenost i kancerogenost (157). ISO standardi propisuju set *in vitro* i *in vivo* testova za procenu biokompatibilnosti kao što su testovi citotoksičnosti, genotoksičnosti i hemokompatibilnosti, odnosno testovi akutne i hronične toksičnosti, iritacije, senzibilizacije i lokalnih efekata nakon implantacije (158, 159). Do sada su u literaturi uglavnom publikovane studije citotoksičnosti Biodentina i reakcije nakon implantacije ovog biomaterijala (160, 161).

Kada je u pitanju citotoksičnost, standard (ISO 10993-5) propisuje testiranje materijala u direktnom kontaktu ili ispitivanje efekata eluata materijala nakon kondicioniranja materijala u biološkim medijumima. Iako ovaj standard propisuje detaljne postupke testiranja, mnogi istraživači se njih ne pridržavaju tako da je heterogenost dobijenih rezultata teško objediniti u cilju izvođenja adekvatnih zaključaka. Ključne razlike se odnose na metodološki pristup (direktan ili indirektan), vrstu testa, vrstu ćelija ili ćelijskih linija korišćenih u testu ili vremensko trajanje testa. Kada je u pitanju priprema eluata, odnosno kondicioniranog medijuma, vrlo je važan odnos površine ili mase materijala i zapremine medijuma (162).

Da je Biodentin ne-citotoksični materijal potvrđuju eksperimenti na mišjom odontogenom ćelijskom linijom (MDPC-23) gde je pokazano da ovaj materijal u direktnom kontaktu ne menja vijabilnost ćelija, niti indukuje nekrozu i apoptozu (163). Slični rezultati su dobijeni i sa ekstraktom Biodentina na fibroblastima uspostavljenih iz humane pulpe (164), na L929 mišjim



fibroblastima (165), MDPC-23 i Od-21 3D sferoidima (166), odnosno matičnim stromalnim ćelijama dobijenih iz neizniklih zuba (167), uprkos razlikama u pripremi ekstrakta Biodentina. Kada su MG63 osteoblastne ćelije direktno kultivisane na pelet pripremljen od sveže polimerizovanog Biodentina, nađena je blaga citotoksičnost (23%) nakon produžene inkubacije ćelija ali koja je u granicama prihvatljivosti (168).

Međutim, u odnosu na prethodne rezultate nekoliko studija je pokazalo da Biodentin poseduje citotoksična svojstva. Ovaj efekat je detektovan ili nakon produžene inkubacije ćelija sa ekstraktom Biodentina u toku 7 dana (169) ili primenom visokih koncentracija ovog materijala (20 mg/mL) u test sistemu sa matičnim ćelijama iz humanog periodontalnog ligamenta (170). Citotoksičnost je pokazana i kada su matične ćelije iz humane dentalne pulpe kultivisane direktno na diskovima Biodentina (171). Slični rezultati su dobijeni kako u direktnom tako i u indirektnom testu Biodentina i matičnih ćelija iz humanog periodontalnog ligamenta (172). Da Biodentin može izazvati i zapaljensku reakciju u periodoncijumu ukazuju eksperimenti vezani za implantaciju ovog materijala kod pacova (173). Sve ovo nameće potrebu o dodatnoj proveru citotoksičnosti Biodentina koristeći kriterijume definisane važećim ISO 10993-5:2009 standardom (162).

Dosadašnja ispitivanja biološke aktivnosti Biodentina su uglavnom bazirana na eksperimentalnim modelima koji su dizajnirani za procenu njegove efikasnosti u indikacijama za koje je Biodentin inicijalno proizveden, a to je reparacija pulpe. Na osnovu tih svojstava on je svrstan u grupu bioaktivnih endodontskih cementa. Ova odrednica je utemeljena na nekoliko važnih *in vitro* i *in vivo* studija u kojima su poređeni Biodentin i MTA. Ćelijske kulture su bile primarne ćelije izolovane iz humane pulpe. Oba cementa su pokazala povoljne efekte na stimulaciju ćelijske proliferacije, diferencijacije, migracije i mineralizacije ali bez bitnije razlike u biološkim potencijalima ovih cementa (174-177). Drugi set eksperimenata takođe nije pokazao razliku između Biodentina i MTA u pogledu formiranja reparativnog dentina, održanju vitaliteta pulpe, anti-bakterijskim svojstvima, nerastvorljivosti praćene u dužem vremenskom periodu ili sprečavanju mikroćurenja u predelu korone zuba (141, 148, 155, 178). Međutim, Biodentin se pokazao efikasnijim kada je u pitanju vezivanje za dentin. Takođe, Biodentin manje prebojava pulpu u odnosu na MTA, zbog prisustva cirkonijum oksida umesto bizmut oksida. Bioaktivnost Biodentina je pokazana i u histološkim *in vivo* studijama, a među najznačajnije efekte svakako treba istaći sposobnost formiranja mostova mineralizacije na granici materijala i pulpe (136, 141-144). Kada je u pitanju procena efikasnosti Biodentina kao osteoblastnog stimulacijskog materijala, mogu se navesti studije na osteoblastnim ćelijskim linijama ili matičnim stromalnim ćelijama izolovanih iz periodontalnog ligamenta. U ovim ispitivanjima biološki osteoblastni potencijal Biodentina je procenjiva preko procesa diferencijacije, povećane ekspresije gena karakterističnih za osteoblastnu aktivaciju ili diferencijaciju kao i formiranja hidroksiapatitnih kristalnih ostrvaca u ćelijskim kulturama (171, 172, 176, 179).

## **1.7. Interakcija dentalnih matičnih stomalnih mezenhimskih ćelija i biomaterijala**

Opisano je nekoliko populacija dentalnih MSC: MSC zubne pulpe (*engl.* Dental Pulp Stem Cells, DPSC) (180), MSC iz ekstrahovanih mlečnih zuba (*engl.* Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth, SHED) (181), periodontalnog ligamenta (*engl.* Periodontal Ligament Stem

Cells, PDLSC) (182), zubnog folikula (*engl.* Dental Follicle Stem Cells, DFSC) (183) i apikalne papile zuba (*engl.* Stem Cells from Apical Papilla, SCAP) (184). Svi ove populacije MSC ispunjavaju minimalne fenotipske i funkcionalne kriterijume koji su definisali Dominici i sar. 2006 (185) kao što su CD90, CD105, CD73 uz odsustvo drugih markera hematopetskih ćelija kao što su CD45, monocita CD14 i markera T (CD3) i B limfocita (CD19). Osim ovih markera, dentalne MSC u različitom procentu, a pre svega u zavisnosti od svog porekla, ispoljavaju CD44, CD146, CD106, CD24, Stro-1, Nestin, Oct-4, CD44 i druge markere (185-187). Funkcionalni kriterijumi uključuju sposobnost formiranja kolonija koje liče na fibroblaste (*engl.* Fibroblasts Colony Forming Units, F-CFU) i potencijal diferencijacije bar u tri razvojne linije; adipocite, hondroblaste i osteoblaste. Veći broj populacija dentalnih MSC ima sposobnost diferencijacije u miofibroblaste kao i ćelije nervnog sistema. Za diferencijaciju MSC u gore navedene ćelijske linije neophodni su odgovarajući indukcionni faktori koji se dodaju u medijume za kulturu a koji imaju sposobnost indukcije specifičnih gena (188, 189). Ovi geni se nazivaju master transkripcioni regulatori. Za adipogenezu ključni transkripcioni faktor je PPAR $\gamma$  (*engl.* peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ), za hondrogenezu je Sox9 (*engl.* SRY-box transcription factor 9), osteogenezu indukuje Runx2 (*engl.* runt-related transcription factor 2), a za mioblastnu diferencijaciju je ključan MyoD (*engl.* myoblast determination protein 1). Kada se jednom aktiviraju, ovi signalni putevi jedan drugog inhibiraju, tako da se diferencijacija odvija u jednom smeru. Tipičan primer je recipročna aktivacija Sox9 i Runx2 gena (190, 191).

Osteogena diferencijacija MSC je od posebnog značaja za regeneraciju koštanog tkiva, uključujući i oštećene koštane strukture izazvane patološkim procesima, kao što su PL. Sposobnost osteogene diferencijacije se procenjuje na osnovu više kriterijuma od koji se najčeće navode ekspresija alkalne fosfataze i formiranja mineralizovanih kalcijumovih struktura koje se histohemijski boje pomoću Alizarin crvenog. Osim toga, u kulturama se dokazuje ekspresija gena ili proteina koje ovi geni kodiraju kao što su: kolagen tipa I, koštani sijaloprotein, koštani morfogeni protein (BMP), osteokalcin, osteriks, osteonektin i mnogi drugi geni, pre svega ekstracelularnog matriksa ili signalni molekuli i njihovi transkripcioni faktori koji nisu strogo specifični samo za osteoblaste (190). Diferencijacija MSC u osteoblaste započinje aktivacijom nekoliko signalnih puteva čiji su receptori ispoljeni na membrani. Opisano je bar 5 različitih signalnih puteva: Wnt/ $\beta$ -katenin; TGF- $\beta$ /BMP; MAPK (*engl.* mitogen-activated protein kinase); Notch i „Hedgehog”. Signali koji se sprovode posredstvom ovih puteva dovode do ekspresije i kontrole Runx2, ključnog osteoblastnog transkripcionog faktora, nakon čega se ativiraju nishodni geni bitni za transformaciju osteoblasta u funkcionalno terminalne ćelije (osteocyte) (190, 191). Takođe je poznato da različiti faktori (temperatura, mehanički stres, visokofrekventne vibracije), faktori rasta poput EGF-2 (*engl.* epidermal growth factor-2), IGF-1 (*engl.* insulin growth factor-1), parathormon (PTH) i vitamin D3 utiču na proces osteogeneze (192).

Proces osteoblastne diferencijacije se grubo može podeliti u tri stadijuma. Prvi stadijum karakteriše ćelijska proliferacija i ekspresija fibronektina, kolagena, TGF- $\beta$  receptora 1 i osteopontina. U drugom stadijumu dolazi do zaustavljanja proliferacije, počinje diferencijacija i maturacija ekstracelularnog matriksa pomoću, alkalne fosfataze i kolagena. Treći stadijum je stadijum mineralizacije matriksa u kome ključnu ulogu ima osteokalcin (190, 191).

Mnogi stomatološki materijali, posebno bioregenerativni, stimulišu osteoblastogenezu različitim i često nedovoljno poznatim mehanizmima. Među njima poseban značaj imaju fosfati, kalcijumovi,

magnezijumovi i silicijumovi joni ili joni drugih metala (na primer stroncijum ili zlato) koji interferiraju sa komponentama ekstracelularnog matriksa ili su direktno uključeni u aktivaciju signalnih puteva osteoblastogeneze. Interesantno je da aktivnost Ca-Mg (*engl.* Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 7, TRPM7) jonskog kanala bitno utiče na proces osteo/odontogene diferencijacije DPSC (193). U ovim procesima važan je ne samo hemijski sastav materijala, njegova mikro i makro struktura, već i poroznost, što je bitno kada se biomaterijali koriste kao trodimenzionalne matrice za osteoregeneraciju. Neki biomaterijali poput biokeramike na bazi kalcijum bifosfata pospešuju procese adhezije, proliferacije i osteogene diferencijacije MSC posredstvom sekrecije pro-inflamacijskih medijatora (IL-1, IL-6, MCP-1) ili faktora rasta (*engl.* vascular endothelial growth factor, VEGF; *engl.* platelet-derived growth factor, PDGF; *engl.* epidermal growth factor, EGF) koji utiču na ekspresiju gena za osteogene markere: alkalna fosfataza (ALP), kolagen tip I, osteriks, koštani sijaloprotein i osteopontin) (170, 171, 194). Zbog svega navedenog, postoji opravdana potreba da se detaljnije izuče procesi genske regulacije kojima bioregenerativni stomatološki materijali ostvaruju svoja kompleksna biološka dejstva.

## 1.8. Naučni problem

Naš istraživački fokus je Biodentin, trikalcijum silikatni cement sa mnogo dobrih kliničkih performansi koje su dokazane u poslednjih 11 godina, od kako je uveden u stomatološku praksu. Međutim, uprkos relativno dobrom upoznavanju njegovih specifičnih svojstava kroz istraživanja i klinički rad i dalje postoje brojne nepoznanice vezane za biološka svojstva Biodentina koja ga čine pogodnim za kliničku praksu, a svaka od njih može biti uboličena u odgovarajuće istraživačko pitanje.

Prvi problem koji nas je zainteresovao je kakva je klinička efikasnost Biodentina u endodontskoj hirurgiji. U nedavno objavljenim revijskim radovima (123, 144), jasno se ističe da je za uspeh endodontske hirurgije od ključnog značaja izbor materijala za retrogradnu opturaciju kanala korena zuba. U ovom kontekstu prednost se daje materijalima koji imaju bioregenerativni potencijal, od kojih su MTA i njegovi derivati najviše istraživani i o čemu je napisano nekoliko revijskih radova i meta analiza (114, 115, 119, 129, 144, 195, 196). U njima se sumiraju analize više kliničkih studija ali se ne daju jasni zaključci koji je materijal najefikasniji. Kada je u pitanju Biodentin, za sada je objavljeno nekoliko prikaza slučajeva u kojima se uglavnom ističe njegov povoljan efekat na zarastanje PL posle apikotomije i retrogradnog punjenja korena kanala (150-152). Caron i sar. (151) navode i neke nedostatke, kao što su poteškoće sa rukovanjem, uprkos deklaraciji proizvođača, kao i nedovoljnu radiotransparentnost. Zato je opravdano da se kroz kliničku randomizovanu studiju efekat Biodentina proveriti i na taj način steknu pozitivna iskustva ali i upoznaju njegova neželjena svojstva. Randomizacija podrazumeva korišćenje i grupe ispitanike kod kojih će se primeniti kontrolni materijal. Možda je zbog toga najlogičnije koristiti materijal sličnih svojstava kao što je na primer MTA, što je inače najčešće bio slučaj u studijama u kojima je poređena efikasnost Biodentina zbog drugih indikacija. Međutim, ako bi se i pokazale razlike između ovih materijala sličnog sastava i sličnih fizičko-hemijskih karakteristika pretpostavka je da bi one bile male i da se ne bi bile jasno vidljive u ovako koncipiranoj kliničkoj studiji na relativno malom broju ispitanika. Zbog toga smo se mi u razradi koncepta ovog projekta opredelili da kontrolnu grupu čine ispitanici kod kojih bi se za retrogradno punjenje kanala korena koristio amalgam. Amalgam je tradicionalno najstariji materijal za ove namene (119). Uprkos,

brojnim nedostacima kao što su citotoksičnost i nepotpuna efikasnost u opturaciji kanala, on je i danas široko korišćen materijal, posebno u nerazvijenim zemljama, zbog niske cene, relativno lakog rukovanja i dobrog kliničkog iskustva (120, 121). Sa druge strane, zbog male količine materijala koji se koristi kod retrogradne opturacije kanala korena toksičnost amalgama se svodi na minimum. Za amalgam nije pokazana sposobnost stimulacije osteoblata, pa se može pretpostaviti da bi se u kontrolisanim uslovima bioregenerativni potencijal Biodentina bolje uočio nego kada bi kontrola bio MTA. Za procenu potpune kliničke efikasnosti materijala u pogledu zarastanja PL obično je neophodno godinu dana, pa i duže (114, 119). Međutim, značajne promene, pa i kompletno zarastanje, mogu se zapaziti i nakon 6 meseci (197). Obzirom na pretpostavljenu razliku u efikasnosti Biodentina u odnosu na amalgam, mi smo se opredelili da efekte pratimo posle 6 meseci verujući da bi u ovom vremenskom periodu razlike u radiografskim karakteristikama koštane regeneracije kao i kliničkim pokazateljima bile vidljivije. Svakako, bilo bi vredno da se studija nastavi i do godinu dana, a rezultati kasnijih ispitivanja bi mogli biti objavljeni kao posebna, objedinjena publikacija.

Drugo naučno pitanje koje traži odgovor je da li je Biodentin zaista biokompatibilni materijal. Sve dosadašnje revijske studije u kojima se sumiraju rezultati bioloških efekata Biodentina u *in vitro* i u *in vivo* eksperimentima ističu biokompatibilnost Biodentina kao njegovo osnovno svojstvo (142, 164, 165). Međutim, kada se detaljno analiziraju objavljeni podaci može se uočiti da je biokompatibilnost, pre svega odsustvo citotoksičnosti, pokazana u eksperimentalnim uslovima koji nisu u skladu sa važećim ISO standardima za procenu citotoksičnosti dentalnih materijala (163-168). Sa druge strane, opisani su i suprotni rezultati da pod izvesnim uslovima Biodentin pokazuje citotoksična svojstva što je ranije u uvodnom delu detaljno analizirano (169-173). ISO standardi propisuju direktno testiranje citotoksičnosti u kontaktu materijala i ciljnih ćelija, ili ispitivanje indirektnog efekta ekstrakta materijala na ciljne ćelije (162). U direktnom kontaktu nije lako proveravati mnoge ćelijske funkcije. Zato smo se mi opredelili da citotoksičnost Biodentina ispitamo indirektno. Ovakav pristup je opravdan jer se iz materijala u dugom vremenskom periodu mogu oslobađati joni sa biološkom aktivnošću, ali se zbog izvesne nestabilnosti u kontaktu sa vodenim rastvorima ili biološkim tečnostima oslobađaju i mikropartikule Biodentina kako je pokazano u nekoliko studija (198, 199). Stepen degradabilnosti se smanjuje kada dođe do potpunog otvrdnjavanja materijala, pa je opravdano da se citotoksičnost eluata Biodentina ispita odmah nakon pripreme za klinički rad jer se na taj način proverava neposredan citotoksični efekat materijala kao i efekat ekstrakta stvrdnutog Biodentina radi sagledavanja hroničnih efekata.

Oslobodene čestice i solubilni produkti mogu dospeti u periapeksni proctor, a njihov uticaj na okolno tkivo nije moguće predvideti na osnovu dosadašnjih istraživanja. Scenario može biti dvojak. Ako procesom fagocitoze čestice budu internalizovane od strane makrofaga postoji mogućnost aktivacije zapaljenskih procesa. Obrnuto, postoji mogućnost supresije inflamacije i preusmeravanja makrofaga u M2 podtip (36). Pošto o interakciji Biodentina sa periapexnim ćelijama nema podataka u literaturi nameće se potreba da se ovi procesi prouče u adekvatnom *in vitro* sistemu, prvenstveno kroz analizu balansa između pro-inflamacijskih, anti-inflamacijskih, osteolitičkih i osteoprotektivnih citokina. Ovako dizajnirani eksperimenti imaju dodatno opravdanje koje se zasniva na histološkoj analizi PL tokom zarastanja. Naime pokazano je da čak i kada se kliničkim i radiografskim pregledima konstatuje kompletno zarastanje kod mnogih slučajeva postoji zapaljenska reakcija (200).

Za Biodentin je pokazano da podstiče diferencijaciju dentalnih MSC u osteoblaste (171, 172, 179). Jedan rad govori i o sličnim efektima Biodentina na MSC iz zdravog periodontalnog ligamenta (176), ali mehanizmi kojima se to postiže nisu dovoljno proučeni. U Institutu za medicinska istraživanja VMA je u poslednjih nekoliko godina urađena serija eksperimenata na MSC izolovanih iz humanih PL (12-14). Iako ove ćelije ispoljavaju fenotipske i funkcionalne karakteristike MSC periodontalnog ligamenta, postoje i neke razlike koje ukazuju da ove ćelije mogu imati i proinflamacijska svojstva koje imaju tzv. MSC tip I (12). Obzirom da Biodentin dolazi u kontak sa periapexnim tkivom u kome nisu u potpunosti suprimirani zapaljenski procesi nakon ekstrakcije PL, nameće se potreba da model kokultivacije eluata (kondicioniranog medijuma) Biodentina sa MSC izolovanih iz PL bude patofiziološki prihvatljiviji nego korišćenje MSC iz zdravog periodontalnog ligamenta. Ovome treba dodati i pretpostavku da i sam Biodentin može da pokrene razvoj PL, uključujući i indikacije kada se ovaj trikalcijum silikatni cement koristi u endodontskom tretmanu. Ovakav pristup do sada nije publikovan pa zato predstavlja originalni model za testiranje hipoteze da Biodentina ima potencijal stimulacije proliferaciju MSC izolovanih iz inflamiranog perapexnog tkiva kao i da indukuje njihovu sposobnost za osteoblastogenezu. U ovom kontekstu sposobnost Biodentina da stimuliše diferencijaciju u MSC u osteoblaste treba procenjivati na osnovu ekspresije velikog broja gena uključenih u ključne signalne puteve diferencijacije osteoblasta, čime bi se dobili i odgovori delovanja Biodentina na molekularnom nivou.

Zbog svega navedenog, ovako koncipiran projekat ima dva osnovna cilja. Primarni cilj je klinička i radiografska procena efikasnosti Biodentina, primenjenog za retrogradno punjenje kanala korena zuba, u zarastanju humanih PL na osnovu randomizovane kliničke studije u kojoj bi kontrolnu grupu činili ispitanici kod kojih je kao kontrolni materijal korišćen amalgam. Drugi cilj je ispitivanje mehanizama kojima Biodentin pospešuje regeneraciju periapexnog tkiva kroz eksperimentalnu studiju *in vitro* sledeći koncept kliničke studije: na osnovu testova biokompatibilnosti na standardnim L929 ćelijama; analize produkcije citokina u kulturi ćelija izolovanih iz periapexnih lezija; poređenjem efikasnosti Biodentina i amalgama da indukuju diferencijaciju osteoblasta u kulturi MSC izolovanih iz PL na osnovu multiple genske ekspresije.

## 2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu definisanog naučnog problema postavljene su sledeće **HIPOTEZE**:

- 1) Biodentin, primenjen za retrogradno punjenja kanala korena zuba, dovodi do uspešnijeg zarastanja PL u odnosu na amalgam, procenjavano na osnovu kliničkih i radioloških pokazatelja.
- 2) Uspešnije zarastanje periapeksnog tkiva pod uticajem Biodentina u odnosu na amalgam je posledica njegove bolje biokompatibilnosti, manje stimulacije produkcije pro-inflamacijskih i osteolitičkih citokina a veće produkcije anti-inflamacijskih i osteoprotektivnih citokina u kulturi ćelija izolovanih iz PL.
- 3) Za razliku od amalgama, Biodentin pospešuje zarastanje PL stimulacijom proliferacije i diferencijacije MSC iz PL u osteoblaste aktivacijom brojnih gena specifičnih za osteoblastogenezu.

U skladu sa opštim ciljevima postavljeni su sledeći specifični **CILJEVI ISTRAŽIVANJA** za proveru postavljenih hipoteza:

- 1) Uporediti efikasnost ekstrakta Biodentina i amalgama na zarastanje PL nakon retrogradne opturacije kanala korena zuba kroz randomizovanu kliničku studiju, praćenjem kliničkih i radiografskih pokazatelja 6 meseci nakon hirurške intervencije.
- 2) Ispitati i uporediti citotoksičnost ekstrakta Biodentina i amalgama na osnovu preporuka ISO-10993-5 na standardnom modelu L929 ćelija, inflamacijskim ćelijama izolovanih iz humanih PL i humanih PL-MSC.
- 3) Ispitati i uporediti efekat ekstrakta Biodentina i amalgama na produkciju pro-inflamacijskih citokina/hemokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ; IL-8; MCP-1), citokina povezanih sa Th1 imunskim odgovorom (IFN- $\gamma$  i IL-12), Th2 odgovorom (IL-4, IL-5, IL-33), Th17 imunskim odgovorom (IL-17A i IL-23), imunoregulatornog (IL-10) citokina, osteodestruktivnog (RANKL) i osteoprotektivnog (OPG) citokina, od strane PL ćelija u kulturi.
- 4) Izolovati, propagirati i okarakterisati PL-MSC na osnovu njihove klonogenosti, fenotipskih svojstava i sposobnosti diferencijacije u osteoblaste, adipocite i hondroblaste.
- 5) Ispitati i uporediti efekat ekstrakta Biodentina i amalgama na proliferativna svojstva PL-MSC.
- 6) Ispitati i uporediti efekat ekstrakta Biodentina i amalgama na potencijal diferencijacije PL-MSC u osteoblaste na osnovu ekspresije seta osteoblastnih gena (*RUNX2*, *SP7*, *WNT2*, *BMP-2*, *BGLAP*, *COL1A1*, *ALP*, *FGF-2* i *TGF- $\beta$* ) i sposobnosti formiranja kalcijumskih mineralnih jezgara u kulturi.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Vrsta studije**

Predloženi projekat je bio kombinacija kliničke randomizovane prospektivne studije i eksperimentalne studije na materijalu humanog porekla.

#### **3.2. Klinička studija**

##### **3.2.1. Ispitanici**

U ovu studiju su bili uključeni pacijenti sa prisustvom jasno ograničenih procesa na vrhu jednokorenih zuba većih dimenzija, okarakterisanih na osnovu kliničkih i radiografskih kriterijuma kao PL, a koje nisu mogle biti rešene klasičnom endodontskom terapijom i kod kojih je bila indikovana apikotomija i sledstvena retrogradna opturacija kanala korena. Kliničko ispitivanje je obavljeno u Odeljenju za oralnu hirurgiju, Klinike za stomatologiju, Vojnomedicinske akademije (VMA) u Beogradu na osnovu odobrenja Etičkog komiteta VMA (Int. br 1/2019 od 27. 06. 2019. god.) i potpisanog informisanog pristanka pacijenata. Ispitanici su bili oba pola, starosti od 35 do 85 godina. Detaljni demografski podaci i karakteristike PL su prikazani u poglavlju Rezultati.

Dijagnoza periapikalnih lezija je postavljana na osnovu standardnih kliničkih i radiografskih parametara koji su prikazani u uvodnom delu ovog rada. Klinički parametri su procenjavani na osnovu anamneze i objektivnih nalaza. Radiografija je bila standardna ciljana intraoralna radiografija (Carestream CS 2200 Roentgen apparatus; Carestream Dental, Atlanta, GA, SAD) i ortopantomografija (Carestream CS 8100 3D).

Veličina PL je određivana analizom standardnih retroalveolarnih snimaka i ortopantomograma merenjem najvećeg meziodistalnog i kраниокаудалног дијаметра, nakon čega je izračunata srednja vrednost. Takođe je notiran položaj i odnos PL prema okolnim strukturama. Na osnovu dobijenih vrednosti PL su podeljene na velike (srednji dijametar jednak i veći od 5 mm) i male (srednji dijametar manji od 5 mm).

Ispitanici su pre apikotomije razvrstani metodom slučajnog izbora u eksperimentalnu i kontrolnu grupu. Eksperimentalnu grupu su činili ispitanici kod kojih je za retrogradno punjenje kanala korena korišćen Biodentin. Kontrolnu grupu su činili ispitanici kod kojih je za opturaciju primenjen amalgam, standardni materijal za retrogradno punjenje kanala korena. Randomizacija u eksperimentalnu i kontrolnu grupu je vršena pomoću tablice slučajnih brojeva koja je napravljena u kompjuterskom programu Microsoft Excel. U ovom istraživanju i pacijentima i istraživačima je bila poznata vrsta primenjenog materijala.

Kriterijumi za isključenje ispitanika iz studije su bili sledeći: PL na dvokorenim zubima i molarima; mogućnost konvencionalne endodontske terapije kod pacijenata; nemogućnost pristupa i loša vidljivost lezija; nepovoljan odnos kliničke krune i korena zuba; teško zdravstveno stanje pacijenta; akutne infektivne bolesti; ekstremno uplašeni i uznemireni pacijenti; akutna oboljenja desni; teške forme parodontopatije; velika resorpcija vilične kosti; izuzetno loša oralna higijena; prisustvo obimnih mekih i tvrdih naslaga. Dodatni kriterijumi za isključenje kada su PL korišćene za *in vitro* eksperimente su bili pacijenti koji su u poslednjih mesec dana primali anti-inflamacijske, imunomodulacijske i antibiotske lekove.

### **3.2.2. Apikotomija i retrogradno punjenje kanala korena**

Apikotomija je rađena u lokalnoj infiltracionoj anesteziji uz pomoć hirurške lupe. Sažeti postupci kod operativnog postupka su bili sledeći. Najpre je izvršena aplikacija lokalnog anestetika (Ubistesin™), koji sadrži Artikain-hidrohlorid 4% i adrenalin-hidrohlorid (1:100 000). Sledilo je podizanje mukoperiostnog režnja po metodi Novak-Peter. Radilo se o dvostrukom ugaonom, trapezastom režnju kod koga su vertikalne incizije napravljene pod uglom od 45° u odnosu na horizontalnu ravan lateralno od donjeg kraja incizije. Prednosti ovog režnja su dobra vidljivost, adekvatna ishrana režnja, primenjiv je kod plitkog forniksa, dobro se reponira i pouzdan je za zarastanje. Nakon trepanacije kosti u projekciji vrha korena zuba vršeno je uklanjanje PL pomoću kirete. Sledilo je odstranjenje vrha korena zuba i retropreparacija apeksa korena zuba do dubine 3 mm pomoću mikrokolenjaka. Radi sprečavanja propustljivosti kanala za mikroorganizme i njihove toksine osim dubine retropreparacije takođe je bitan i ugao zakošenja vrha korena koji je u direktnoj vezi sa dubinom retropreparacije kao i oblik retropreparacije.

Nakon adekvatne retropreparacije vršena je aplikacija sveže pripremljenog materijala (Biodentin ili amalgam), a zatim ispiranje rane fiziološkim rastvorom (kod primene amalgama), uspostavljanje hemostaze i vraćanje mukoperiostnog režnja u prvobitno stanje. Sutura režnja je vršena pojedinačnim šavovima (polipropilen, monofilament hirurški konac 4/0). Nakon završene intervencije pacijenti su dobili instrukcije o ponašanju u postoperativnom periodu, preporuke za oralnu higijenu i ordinirana je antibiotska terapija u trajanju od 7-10 dana.

U postoperativnom periodu narednog dana je vršena ponovna inspekcija operativne regije kao i toaleta rane fiziološkim rastvorom, evidentirani su simptomi tipa otoka, bola i hematoma. Urađena je prva kontrolna standardna intraoralna radiografija. Nakon 7-10 dana vršeno je uklanjanje hirurškog konca kada su ponovo notirane postoperativni simptomi i klinički znaci. Imajući u vidu publikovane podatke da ishod endodontskog hirurškog lečenja presudno zavisi od iskustva kliničara (201), apikotomiju je vršio mentor (MD) uz asistenciju doktoranta (ME).

### **3.2.3. Retrogradno punjenje kanala korena**

Retrogradno punjenje kanala korena je vršeno amalgamom ili Biodentinom. Amalgam (EKSTRACAP® non gama 2), proizvođača Galenika, Beograd, je pripreman prema uputstvu proizvođača mešanjem legure (masa 0.360 g) sa živom (masa 0.400 g) u amalgamatoru. Jedan gram legure EKSTRACAP sadrži srebro (500 mg), kalaj (299 mg) i bakar (201 mg).



Biodentin (Biodentine, SEPTODONT, Saint-Maur-des-fossés Cedex, Francuska) je takođe pripreman prema uputstvu proizvođača mešanjem prah materijala iz kapsule sa tečnošću u amalgamatoru u trajanju od 30 sekundi, brzinom oko 4000 obrtaja u minuti. Posle očvršćivanja u trajanju od 10-12 minuta materijal je vađen iz kalupa i odmah korišćen za punjenje.

### 3.2.4. Praćenje parametara zarastanja PL

Zarastanje PL je procenjivano šest meseci posle apikotomije i retrogradnog punjenja kanala korena na osnovu radiografskih i kliničkih pokazatelja.

Radiografski pokazatelji zarastanja su klasifikovani na osnovu kriterijuma Rud-a i sar. (200).

**Indeks 1.** Kompletno zarastanje koga karakteriše: potpuno formiranje lamine dure oko vrha korena zuba, normalan ili lako proširen prostor periodontalni prostor ali ne više nego dvostruko u odnosu na nezahvaćeni deo korena zuba, potpuna regeneracija kosti, iako njena gustina i strukturisanost ne moraju biti isti kao kod nezahvaćenog dela kosti.

**Indeks 2.** Nekompletno zarastanje koga odlikuje: smanjena rendgenska transparentcija sa znacima koštanog zarastanja na periferiji zone razređenja nepravilnog oblika, ili demarkirana kompletnom koštanom linijom, veza između zone razređenja i periodontalnog prostora je angularna.

**Indeks 3.** Neizvesno zarastanje: smanjena zona rendgenske transparentcije čija je širina dvostruko veća u odnosu na periodontalni prostor, ograničena je čvrstom laminom, ima cirkularnu ili semicirkularnu periferiju. Može biti lokalizovana simetrično oko vrha korena u obliku produžetka periodontalnog prostora.

**Indeks 4.** Neizovoljavajuće zarastanje: nema promena u stepenu rendgenske transparentnosti ili je transparentnost čak povećana u odnosu na radiografije napravljene neposredno posle apikotomije.

Radiografske analize su radili nezavisno mentor i doktorant. U slučaju neslaganja rezultata prednost je data rezultatima mentora. Nije bila konsultacija i trećeg evaluatora (specijalista dentalne radiologije).

Klinički pokazatelji uspeha apikotomije su procenjivani na osnovu kriterijuma Mikkonen-a i sar. (202).

**Indeks 1.** Potpuni uspeh: odsustvo bola, otoka ili fistula.

**Indeks 2.** Neizvesan uspeh: radiografski pokazatelji destrukcije kostiju i prisutvo/odsustvo kliničkih simptoma.

**Indeks 3.** Neuspeh: radiografski pokazatelji destrukcije kostiju, resorpcija korena i prisustvo kliničkih simptoma.

Procena zarastanja PL i uspeha endodontskog hirurškog lečenja na osnovu objedinjenih kliničkih i radiografskih kriterijuma je vršeno na osnovu klasifikacije von Arx-a i Kurt-a (203).

**Indeks 1.** Potpuni uspeh: regeneracija kostiju veća ili jednaka 90%, odsustvo bola, otoka ili fistula.

**Indeks 2.** Poboljšanje: regeneracija kostiju između 50% i 90%, odsustvo bola, otoka ili fistula.

**Indeks 3.** Neuspeh: regeneracija kostiju manja od 50%, prisustvo kliničkih simptoma.

### **3.3. Eksperimentalna studija**

#### **3.3.1. Priprema ekstrakta (kondicioniranog medijuma) amalgama i Biodentina**

Od sveže napravljenog amalgama odnosno Biodentina iz svake kapsule napravljeni su diskovi približnog dijametra oko 10 mm, u sterilnim uslovima. Od ovih uzoraka je pripreman ekstrakt (kondicionirani medijum-KM) prema uputstvu ISO-10993-12 (204) na taj način što su uzorci materijala kultivisani u sterilnom bazalnom medijumu za kulturu MSC ili sa RPMI medijumom (za ostale ćelije) u epruvetama u inkubatoru na 37 °C. KM je pripreman od sveže napravljenih materijala (neposredno nakon polimerizacije ili posle 24 časa držanja u termostatu na 37 °C) kao i od materijala posle 14 dana od pripreme, kada je na osnovu literaturnih podataka proces otvrdnjavanja Biodentina potpun. Do otvrdnjavanja, uzorci materijala su držani na sobnoj temperaturi pod sterilnim uslovima. Odnos mase materijala u odnosu na zapreminu medijuma je iznosio je 0.2 g/mL prema direktivi ISO-10993-12 (204). Kondicioniranje je trajalo 24 sata ili 3 dana. Nakon kondicioniranja medijumi su sakupljeni. U KM Biodentina (B-KM) došlo je do oslobađanja mikročestica i povećanje pH vrednosti u opsegu 11.5-12, za razliku od KM amalgama gde pH nije bio promenjen (pH 7.4). Takođe, ni makroskopskim ni mikroskopski ispitivanjem KM nisu pokazane čestice amalgama. Baznost B-KM je podešena do pH 7.4 pomoću HCl pre korišćenja u biološkim esejima. Do upotrebe držan je kao sterilna suspenzija (Biodentin), odnosno sterilan rastvor (amalgam) u frižideru na +4 °C.

#### **3.3.2. L929 ćelije**

L929 ćelije su korišćene za citotoksični test prema preporuci ISO-10993-5 (162). Ćelije su transformisani mišji fibroblasti koji se čuvaju i propagiraju u Institutu za medicinska istraživanja (IMI) VMA, a dobijeni su iz ADCC, Rockville, MA, SAD.

#### **3.3.3. Izolacija ćelija iz periapeksnih lezija**

Ćelije su izolovane iz PL nakon apikotomije ili ekstrakcije zuba. Posle ekstrakcije PL su odmah odmah prenete u bočice sa medijumom za kuturu (RPMI medijum sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma-FCS i koktela antibiotika i antimikotika). Medijum i serum su komercijalno nabavljeni od PA Laboratories, Beč, Austrija, a antibiotici (penicilin, streptomycin i gentamicin) i antimikotik (amfotericin B) su dobijeni od Sigma-Aldrich, Minhen, Nemačka. Materijal je potom

odmah transportovan u laboratoriju IMI. Izolacija ćelija iz lezija je vršena pomoću koktela enzima kolagenaze i DNA-aze. Ukratko, tkivo PL je stavljeno u Petrijevu šolju, iseckano skalpelom na komade veličine 2-3 cm<sup>3</sup>, a zatim je dodato 5 mL RPMI 1640 medijuma sa 0.05 % kolagenazom tipa IV (Sigma) i 0.02 % DNA-zom (Sigma). Tkivo je zatim inkubirano u termostatu na 37 °C u toku 20 minuta. Oslobođene ćelije iz tkiva su sakupljene, a iz razmekšalog tkiva su dodatno izolovane ćelije laganim pritiskom umetka plastičnog šprica preko mrežice od nerđajućeg čelika. Sve sakupljene ćelije su profiltrirane, a zatim isprane u RPMI 1640 medijumu centrifugiranjem (400 g, 7 minuta). Eritrociti su uklonjeni pomoću komercijalnog rastvora za lizu eritrocita. Posle ponovnog dvostrukog centrifugiranja, određena je vijabilnost ćelija pomoću 1% rastvora Tripan plavog i ona je po pravilu bila veća od 92 %. Od svakog pojedinačnog uzorka ukupnih inflamacijskih ćelija (PL ćelije) napravljeni su citospin preparati, pomoću citocentrifuge (Shandon tip 4). Citospin preparati su bojeni sa May-Grünwald-Giemsom i analizirani pomoću svetlosne mikroskopije. Ćelije su korišćene za: proučavanje citotoksičnosti KM amalgama i Biodentina i ispitivanje produkcije citokina u kulturi pod uticajem ovih KM.

### **3.3.4. Uspostavljanje kultura mezenhimskih stromalnih matičnih ćelija iz periapeksnih lezija**

Kultura MSC je uspostavljena dugotrajnom kultivacijom ćelija iz PL u prisustvu selektivnog komercijalnog medijuma za MSC. Izolacija ćelija se odvijala u nekoliko koraka. U prvoj fazi tkivo PL je držano 2 sata na sobnoj temperaturi u  $\alpha$ MEM medijumu (Sigma) sa dodatkom antibiotika (1% penicilina, gentamicina i streptomcina) i amfotericina B. Tkivo PL je zatim preneto u Petri šolju, iseckano skalpelom na manje komadiće a zatim tretirano tokom 30 minuta rastvorom kolagenaze tip I (1 mg/mL; Sigma) i DNAze (25 mg/mL; Sigma) u medijumu ( $\alpha$ MEM; Sigma) u inkubatoru sa vlažnom atmosferom na temperaturi od 37 °C i pri koncentraciji CO<sub>2</sub> od 5%. Dobijena suspenzija ćelija je isprana u  $\alpha$ MEM centrifugiranjem, nakon čega je 8000 ćelija zasađeno po 1 cm<sup>2</sup> u plastične ploče za ćelijske culture sa 6 bazena mesta (9.5 cm<sup>2</sup> u 2 mL) bazalnog  $\alpha$ MEM medijuma sa dodatkom 10% FCS, gore navedenih antibiotika i 0.1 $\mu$ M L-askorbat-2-fosfata. Posle 3 dana inkubacije u termostatu na 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> neadherentne ćelije su uklonjene pri promeni medijuma za kultivaciju, a nastavljena je kultivacija adherentnih ćelija fibroblastnog izgleda. Nakon dostizanja konfluentnosti od 70% površine bazena za koje je najčešće potrebno 7-10 dana, ćelije su odlepljivane od površine ploče pomoću 0.25% rastvora tripsina (Sigma) i 0.02% NaEDTA u fosfatnom puferu (PBS). Prekid tripsinizacije je vršen dodatkom 1% rastvora FCS u PBS-u. Posle ispiranja centrifugiranjem, adherentne ćelije su dalje propagirane u bočicama za kulturu u istom medijumu po istom modelu. Posle 4 pasaže ćelije su korišćene za fenotipsku i funkcionalnu analizu i ispitivanje klonogenog potencijala. Ukupno su uspostavljene 3 linije od 3 različite asimptomatske PL.

### **3.3.5. Sposobnost formiranja kolonija MSC - CFU-F test**

MSC su kultivisane u malom broju: 25, 50, 100 i 250 ćelija po bazenu ploče sa šest mesta (9.5 cm<sup>2</sup> u 2 mL medijuma). Ćelije su kultivisane tokom 14 dana pri čemu je dva puta nedeljno medijum zamenjivan svežim medijumom. Nakon ovog perioda, kulture su isprane PBS-om, osušene na vazduhu, a zatim obojene May-Grunwald-Giemsom metodom. Preko adherentnih ćelija stavljanje je predmetno stakalce koje je fiksirano Kanada balzomom. Ovako obojene kulture posmatrane su na

svetlosnom mikroskopu. CFU-F, definisane kao grupe od najmanje 50 ćelija, su izbrojane a procenat ćelija koji ima sposobnost formiranja kolonija izračunat je kao (broj kolonija / broj zasađenih ćelija) x 100.

### **3.3.6. Fenotipska analiza MSC**

Nakon 4 pasaže MSC su prvo isprane u PBS-u sa dodatkom 2% FCS i 0.1% Na-azida a nakon toga inkubirane u PBS/FCS/Na-azidu sa dodatkom primarnog antitela konjugovanih fluorescein-izotiocijanatom (FITC), fikoeritrinom (PE), PerCP ili APC u razblaženju koje je savetovano od strane proizvođača tokom 45 minuta na temperaturi od 4 °C. Korišćena su sledeća monoklonska antitela nabavljena komercijalno od kompanije Serotec, Oxford, V. Britanija: anti-CD146- PE, anti-CD90-FITC, anti-CD105-PE, anti-CD166-FITC, anti-CD39- PerCP i -PE kao i anti-CD56-FITC. Anti-CD73-FITC antitelo je dobijeno od kompanije R&D Systems, Mineapolis, SAD a anti-STRO-1-FITC i anti-SSEA4-PE od Millipore/Chemicon, Billerica, MA, SAD. Anti-CD45- PerCP, anti-CD34-APC, anti-CD14-FITC, anti-CD3-PE i anti-CD19-FITC su kupljeni od kompanije Biologend, San Diego, CA, SAD. Posle inkubacije sa antitelima ćelije su isprane u PBS/Na-azidu i analizirane na protočnom citofluorimetru (CellFlow CUBE6, PARTEC, Nemačka). Rezultati su prikazani kao % pozitivnih ćelija i kao srednji intenzitet fluorescence nakon analize bar 5000 ćelija po uzorku. Snimljeni softverski podaci sa rezultatima su obrađeni pomoću FCS Express 6 RUO Edition (6.00.0053) programskog softvera.

### **3.3.7. Diferencijacija MSC iz periapeksnih lezija**

Diferencijacija MSC u osteoblaste je indukovana kultivacijom ćelija u medijumu za osteoblastnu diferencijaciju (Lonza, Basel, Švajcarska) u toku 21 dana u pločama sa 6 bazena. Ćelije su najpe kultivisane dva dana u bazalnom  $\alpha$ MEM medijumu do dostizanja konfluentnosti od oko 70%. Nakon toga medijum je zamenjen komercijanim medijumom za osteoblastnu diferencijaciju (Lonza), a kultivacija je trajala narednih 21 dan. Medijum je zamenjivan svaka 4 dana svežim medijumom. Posle inkubacionog perioda kulture su isprane i obojene sa Alizarin crvenim u cilju identifikacije mineralizovanih jezgara. Diferencijacija MSC u adipocite je vršena kultivacijom MSC u adipogenom medijumu (Lonza) po istom modelu kao i za osteogenu diferencijaciju s tim što je kultivacija trajala 14 dana. Identifikacija adipocita je vršena bojenjem sa Oil crvenim. Za hondrogenu diferencijaciju ćelije su iscentrifugirane u polipropilenskim epruvetama, supernatant je odliven, a na pelet je dodat komercijalni hondrogeni medijum, takođe kupljen od kompanije Lonza. Ćelije su kultivisane 4 nedelje uz promenu medijuma dva puta nedeljno. Posle perioda diferencijacije ćelijski pelet je ukalupljen u medijum za smrzavanje (embedding medium, BioOptica, Milano, Italija) i zamrznut u tečnom azotu. Za potrebe analize na svetlosnom mikroskopu, uzorci debljine od 7  $\mu$ m su isečeni na kriotomu (Leica Cryocut 1850) i obojeni rastvorom Alcian plavog koji boji glikozaminoglikane, sastojak ekstraćelijskog matriksa koji produkuje hondroblasti. Sve boje su dobijene ljubaznošću kolega sa Instituta za patologiju VMA.

### 3.3.8. Testovi citotoksičnosti

Citotoksičnost je procenjivana prema uputstvima važećeg standarda ISO-10993-5: 2009 (205), osnovnog testa biokompatibilnosti za medicinska sredstva u postupku njihove registracije. Varijable koje su merene su procena vijabilnosti i metabolička aktivnost ćelija (L929 ćelija, ćelija ekstrahovanih iz PL i PL-MSK). Vijabilnost je procenjivana na osnovu analize procenta nekrotičnih ćelija u kulturi koje su detektovane pomoću 1% rastvora Tripan plavog. Metabolička aktivnost je određivana pomoću MTT (3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) testa, koji meri aktivnost enzima sukcinat dehidrogenaze u mitohondrijama vijabilnih ćelija. U ovom kolorimetrijskom testu intenzitet bojene reakcije direktno proporcionalan broju vijabilnih ćelija a očitava se na ELISA čitaču. Bojena reakcija potiče od formazana koji se formira dejstvom sukcinat dehidrogenaze iz mitohondrija na MTT supstrat.

Postupak je detaljno propisan gore navedenim ISO standardom. Ukratko, PL ćelije, su kultivisane u pločama od 96 bazena u ( $1 \times 10^5$ /bazenu), u kompletnom svežem RPMI medijumu, ili u medijumu sa različitim razblaženjima KM Biodentina, KM amalgama ili KM kontrolnog polistirenskog materijala. L929 ćelije i MSC ćelije su postavljene na identičan način u ploče ali u manjem broju ( $1-2 \times 10^4$ /bazenu, u zavisnosti od dužine inkubacije) i kultivisane u odgovarajućim medijumima (RPMI 1640 medijum sa dodatkom 10% FCS za L929 ćelije odnosno bazalnom  $\alpha$ MEM medijumu sa dodatkom 10% FCS za MSC), preko noći radi primarne adherence ćelija. Narednog dana, medijumi su zamenjeni odgovarajućim svežim kontrolnim medijumima ili medijumima sa različitim razblaženjima KM materijala. Kulture sa PL ćelijama su kultivisane 24 časa, a kulture sa L929 ćelijama i MSC su zavisno od eksperimenta kultivisane 24 časa, 3 dana ili 7 dana. Po završetku inkubacije, ploče sa kulturama su iscentrifugirane, nakon čega je medijum pažljivo pokupljen pipetiranjem. U bazene ploča je zatim dodato po 100  $\mu$ l rastvora MTT (Sigma), finalna koncentracija (100  $\mu$ g/ml). Bazeni sa MTT bez ćelija su služili kao slepa proba („blank” kontrola). Ploče su zatim inkubirane 4 časa u inkubatoru na 37°C. Stvoreni formazan tokom ovog inkubacionog perioda je rastvoren pomoću 0.1N HCl / 10% SDS (sodium dodecyl sulphate, Sigma) (100 $\mu$ l/bazenu) preko noći. Nakon toga, optička gustina (OD) razvijene boje je određena na ELISA čitaču (Behring II) na talasnoj dužini 570/650 nm. Rezultati su izražavani kao relativna metabolička aktivnost u odnosu na metaboličku aktivnost kontrolnih kultura koja je uzeta kao 100% vrednost.

### 3.3.9. Test apoptoze i nekroze

Apoptoza PL ćelija je određivana pomoću Annexin-V FITC/propidijum jodida (PI) kompleta (BD Bioscience, San Jose, CA, SAD) i protočne citometrije a prema uputstvu proizvođača. U ovom testu PL ćelije su kultivisane 24 časa po istom modelu kao i kod MTT esejja. Nakon toga su pokupljene snažnijim pipetiranjem uz kontrolu pod invertnim mikroskopom radi provere da li su pokupljene sve adherentne ćelije. Pošto su sakupljene, ćelije su isprane u Ca-vezujućem puferu i obojene sa Annexin-V FITC/PI. Ovaj esej se bazira na primeni dvokomponentnog sistema koji ima dva odvojena signala fluorescence. Annexin-V FITC se veže za membranu apoptotskih ćelija koje ispoljavaju fosfatidil serin na spoljašnjoj membrani ćelije. PI boji jedra kada je ćelijska membrana permeabilna (primarna nekroza ili sekundarna nekroza kod odmaklog stadijuma apoptoze). Ovi parametri ćelijske smrti su analizirani na citofluorimetru CellFlow CUBE6,

(PARTEC), a dobijeni digitalni podaci su obrađeni pomoću FCS Express 6 RUO Edition (6.00.0053) programskog softvera. Annexin-V-FITC<sup>+</sup> ćelije su primarno apoptotske ćelije (rana faza apoptoze), PI<sup>+</sup> cells su primarno nekrotične ćelije dok su dvostruko pozitivne (Annexin-V-FITC<sup>+</sup> PI<sup>+</sup>) ćelije u kasnom stadijumu apoptoze kod kojih je nastala sekundarna nekroza.

### **3.3.10. Metode za detekciju citokina**

Za detekciju citokina u supernatantima kultura ćelija izolovanih iz periapexnih lezija (IL-23, RANKL i OPG) korišćeni su komercijalni ELISA kompleti (nabavljeni od kompanije Abcam, Cambridge, V. Britanija) u kojima su za polistirenske ploče vezana odgovarajuća anti-citokinska antitela. Postupak analize je bio prilagođen prema uputstvu proizvođača, pri čemu su koncentracije citokina izračunate na osnovu standardnih krivih koje su konstruisane na osnovu poznatih opadajućih koncentracija citokina. Za detekciju najvećeg broja ispitivanih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17A, IFN- $\gamma$ , MCP-1 and TNF- $\alpha$ ) je korišćena metoda sa imunokuglicama i protočna citometrija pomoću kompleta (Flow Cytomix Microbeads Assay kupljen od kompanije Biolegend). Princip metode se sastoji u inkubaciji mikrokuglica različitih veličina obloženih anti-citokinskim antitelima i različitim flurohromima, sa supernatantima PL ćelijskih kultura, čime je omogućena simultana detekcije gore navedenih citokina iz vrlo malog volumena (50  $\mu$ l) uzorka. Svi postupci detekcije su sprovedeni prema uputstvu proizvođača a analiza je urađena na protočnom citofluorometru (CUBE6, PARTEC). Koncentracija citokina je određena na osnovu softverskog programa uz pomoć poznatih koncentracija citokina u standardu.

### **3.3.11. Modulacijski efekat Biodentina i amalgama na osteoblastnu diferencijaciju MSC**

Efekat Biodentina i amalgama na osteoblastnu diferencijaciju MSC je procenjivan indirektno testiranjem KM ovih materijala. Korišćene su 30% i 10% KM, sakupljenih kondicioniranjem materijala 24 časa od polimerizacije u toku 72 časa. Ove koncentracije KM nisu bile citotoksične a u proliferativnom eseju B-KM su pokazivale stimulaciju rasta MSC u bazalnom medijumu. Negativnu kontrolu su činile PL-MSC kulture bez KM. Kao pozitivna kontrola korišćene su kulture MSC u kompletnom osteogenom diferencijacionom medijumu.

U drugom eksperimentu gore navedene koncentracije KM su dodavane u bazalni medijum ( $\alpha$ MEM +10%FCS) obogaćenim sa 30% komercijalnog osteogenog medijuma a koji je označen kao suboptimalni osteogeni medijum (SOM). Efekat KM materijala na osteogenu diferencijaciju PL-MSC u ovom eksperimentu je procenjivan u odnosu na osteogenu diferencijaciju ćelija kultivisanih u SOM bez KM. Proces osteogene indukcije je trajao 21 dan. PL-MSC, konfluentnosti oko 70%, su kultivisane u plastičnim pločama sa 6 bazena a medijum je zamenjivan svežim medijumom sa ili bez dodataka KM dva puta nedeljno. Prilikom zamene medijuma ćelije su isprane pažljivo od zaostalih mikročestica Biodentina. Radi održavanja identičnih eksperimentalnih uslova isti postupak ispiranja je sproveden i u kulturama sa amalgamom odnosno kod kontrolnih kultura. Na kraju kultivacionog perioda PL-MSC su obojene Alizarin crvenim, radi analize mineralizacije kako je ranije opisano. Kulture su fotografisane pod invertnim mikroskopom (Olympus) za koga je povezana adekvatna kamera.

Stepenovanje mineralizacije je vršeno semikvantitativno na uvećanju 10x a na osnovu sledećih kriterijuma:

**Indeks 0:** nema vidljive pozitivnosti;

**Indeks 1:** Blaga prebojenost pojedinih ćelija i prisustvo 1 do 2 manja mineralizovana jezgra obojenih ružičasto-crveno bar na jednom od 10 analiziranih vidnih polja;

**Indeks 2:** Blaga prebojenost pojedinih ćelija i prisustvo do 5 manjih i srednje velikih mineralizovana jezgara obojenih ružičasto-crveno bar na dva od 10 analiziranih vidnih polja;

**Indeks 3:** Prisustvo do 10 mineralizovana jezgara različitih veličina obojenih ružičasto-crveno bar na 5 od 10 analiziranih vidnih polja;

**Indeks 4:** Prisustvo mineralizovana jezgara svih veličina, nekih i slivenih obojenih ružičasto-crveno na svih 10 analiziranih vidnih polja.

### **3.3.12. Određivanje genske ekspresije pomoću lančanog umnožavanja DNK u realnom vremenu (Real-time PCR)**

U cilju određivanja ekspresije gena uključenih u osteoblastnu diferencijaciju i proliferaciju MSC korišćena je metoda Real-time PCR. Genska ekspresija je određivana u setu paralelnih kultura MSC kako je gore opisano. Ćelije su sakupljene posle 7 dana (rana faza osteoblastogeneze) i 16. dana (kasna faza osteoblastogeneze). Iz ćelijskog peleta, koji je sakupljen centrifugiranjem MSC, izolovana je ukupna RNK pomoću RNAeasy Mini Kit (Qiagen). Komplementarna DNK je sintetisana pomoću komercijalnog kompleta za reverznu transkripcionu reakciju prema uputstvu proizvođača (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Thermo Fisher Scientific). qPCR od cDNA je dobijen pomoću SYBR™ Green PCR Master Mix (2x, Thermo Fisher Scientific), para prajmera specifičnih za svaki od ispitivanih gena a koji su sintetisani od strane Microsynth, Balagach, Švakcarska i prikazani u donjoj tabeli). Ceo postupak je obavljen na 7500 real-time PCR sistemu (Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD). qPCR reakcija je započeta početnom denaturacijom u trajanju od 10 min na 95°C, praćena ciklusom koji se sastojao od koraka denaturacije DNK lanaca 15 s na 95°C i koraka vezivanja prajmera i elongacije lanaca od 1 min na 60°C. Ciklus je ponovljen 40 puta. Nivo ekspresije ispitivanog gena standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin (kontrolni gen) detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2-dCt, gde je dCt razlika između Ct vrednosti gena od interesa i gena za  $\beta$ -aktin. Relativna ekspresija gena od interesa je kasnije normalizovana kao relativno povećanje ili smanjenje (*engl.* fold change) u odnosu na ekspresiju datog gena u odgovarajućoj kontroli (indeks 1). Na primer ako je ekspresija nekog gena pod odgovarajućim eksperimentalnim uslovima iznosila 2.5 to znači da je njegova ekspresija 2.5 puta veća u odnosu na normalizovanu vrednost u kontroli koja je uvek označena indeksom 1.

**Tabela 1.** Lista seta prajmera i njihove sekvence korišćenih u testovima genske ekspresije

	<b>Sekvenca seta prajmera 5'-3'</b>
<b><i>WNT2</i></b>	TTCCAGAGCTAACTCGTGCC ACTGGGCTTGAAGGGTGATG
<b><i>COL1A1</i></b>	TCGGAGGAGAGTCAGGAAGG AACAGAACAGTCTCTCCCGC
<b><i>BMP-2</i></b>	GGGGTGGGGGAAAGGTAATG TCGGGTTATCCAGGTTTTGCT
<b><i>RUNX2</i></b>	GCGGTGCAAAC TTTCTCCAG TCACTGTGCTGAAGAGGCTG
<b><i>SP7</i></b>	TGCTTGAGGAGGAAGTTCAC AGGTCACTGCCACAGAGTA
<b><i>BGLAP</i></b>	GACTGTGACGAGTTGGCTGA CACATCCATAGGGCTGGGAG
<b><i>TGF-β1</i></b>	GGACACCAACTATTGCTTCAGCTCC AGGCTCCAAATGTAGGGGCAGGGCC
<b><i>FGF 2</i></b>	GGGTGCCAGATTAGCGGAC GTTACGGATGGGTGTCTCC
<b><i>ALP</i></b>	GGGCATTGTGACTACCACTC AGTCAGGTTGTTCCGATTCA

### 3.3.13. Testovi proliferacije

Test proliferacije L929 ćelija i MSC pod uticajem različitih koncentracija KM pripremljenih od svežeg i otvrdnutog amalgama i Biodentina je primarno rađen pomoću MTT testa kako je opisano kod citotoksičnosti. Dodatni test je bio baziran na ugradnji <sup>3</sup>H-timidina. U ovom eseju L929 i MSC su kultivisane u polistirenskim pločama od 96 bazena u triplikatima u prisustvu različitih razblaženja KM u toku 3 dana. Step en proliferacije je procenjivan na osnovu metaboličke aktivnosti kultura (kod MTT) ili količine ugrađenog <sup>3</sup>H-timidina (Amersham, V. Britanija, 1μCi/ml culture) u poređenju sa kontrolom (proliferacija ćelija u kontrolnom medijumu). Ugradnja radioaktivnog timidina, koji je dodavan u kulture u poslednjih 8 časova kultivacije je merena standardnim postupkom pomoću scintilacionog β brojača (RAGBETA, Turku, Finska). Rezultati su izražavani kao broj raspada u minuti (*engl.* count per min-cpm).



### 3.4. Statistička obrada podataka

Od metoda deskriptivne statistike su primenjene standardne mere centralne tendencije i varijabiliteta, a procena normalnosti distribucije je vršena pomoću Kolmogorov Smirnov i Shapiro Wilk testom.). U slučaju normalne raspodele korišćen je Studentov T test (Student's t-Test) i jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Bonferonijevom korekcijom za analizu razlika između grupa. Kada je raspodela odstupala od normalne, korišćen je Kraskal-Volisov test (Kruskal-Wallis Test), a za međugrupnu analizu Man Vitnijev U test (Mann Whitney U Test). Korelacija između merenih parametara određivana je pomoću Spirmanovog koeficijenta korelacije (Spearman's rank correlation coefficient). Hi-kvadrat test ( $\chi^2$ , Chi-square Test) je korišćen za poređenje razlika između kategorijskih varijabli. Svi podaci su obrađeni u statističkim programima: SPSS v 21 i GraphPad Prism v 5. Granična vrednost statističke značajnosti je definisana na nivou  $p < 0.05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Klinička studija

#### 4.1.1. Demografski podaci

Klinička studija za procenu efikasnosti Biodentina u endodontskoj hirurgiji indikovanoj u cilju lečenja PL je dizajnirana po modelu prospektivne randomizovane kliničke studije koja je detaljno opisana u poglavlju Materijal i metode. Pacijenti sa PL tretiranih retrogradnom opturacijom kanala korena Biodentinom su činili eksperimentalnu grupu, dok su pacijenti tretirani na isti način amalgamom činili kontrolnu grupu. Na osnovu određene veličine uzorka matematičkim putem u studiju je inicijalno uključeno 60 PL (po 30 u obe grupe), ali je dodatnom korekcijom kriterijuma za uključenje hirurški obrađeno 29 PL sa Biodentinom i 28 uzoraka sa amalgamom. Zbog rane pojave komplikacija, praćene znacima infekcije, jedan pacijent sa jednom PL iz eksperimentalne grupe je isključen iz studije neposredno nakon operativnog zahvata, dok je jedan pacijent sa jednom PL iz ove grupe isključen posle tri meseca zbog uzdužne frakture korena zuba i zbog čega je zub ekstrahovan. Iz studije je takođe isključen jedan pacijent, sa jednom PL, zbog ranih infektivnih komplikacija. Dva pacijenta sa ukupno 3 PL tretirane Biodentinom i dva pacijenta sa ukupno dve PL tretirane amalgamom nisu došli na zakazani kontrolni pregled posle 6 meseci kada je trebalo da se izvrši procena efikasnosti lečenja.

U tabeli 2 su prikazani podaci o ispitanicima i broju PL kao i demografske karakteristike ispitanika koji su ušli u finalnu kliničku evaluaciju. Ukupan broj ispitanika je bio 35, od kojih je njih 16 bilo u eksperimentalnoj grupi a 19 u kontrolnoj grupi. Ukupan broj PL je bio 24 u eksperimentalnoj grupi a 25 u kontrolnoj grupi. Od ukupnog broja ispitanika njih 17 (48.6%) je bilo muškog pola a 18 (51.4%) ženskog pola. Raspodela ispitanika prema polu u zavisnosti od osnovnih grupa je bila sledeća. U grupi sa Biodentinom je bilo 7 (43.7%) ispitanika muškog pola a 9 (56.3%) ispitanica ženskog pola. U grupi sa amalgamom je bilo 10 (52.6%) ispitanika muškog pola i 9 (47.4%) ispitanica ženskog pola. Kada se analizira broj PL u obe grupe, razvrstanih prema polu ispitanika, raspodela je bila sledeća. U grupi sa Biodentinom je bilo 9 (37.5%) PL kod ispitanika muškog pola a 15 (62.5%) PL kod ispitanica ženskog pola. U grupi sa amalgamom je bilo 14 (56.0%) PL kod ispitanika muškog pola i 11 (44.0%) PL kod ispitanica ženskog pola. Statističkom obradom podataka nije nađena razlika između polova u njihovoj zastupljenosti po grupama, niti je nađena razlika u zastupljenosti PL u odnosu na tretman, koja je bila statistički značajna.

Starost ispitanika je bila u rasponu od 35 do 68 godina, samo jedan pacijent je imao 85 godina. Srednja vrednost životne dobi muškaraca  $\pm$  standardna devijacija (SD) je bila  $49.2 \pm 13.5$ , od toga u grupi sa Biodentinom je iznosila  $48.4 \pm 16.5$  a u grupi sa amalgamom je iznosila  $50.1 \pm 9.8$ . Prosečna životna dob žena je bila  $46.2 \pm 6.8$ , od toga u grupi sa Biodentinom je iznosila  $47.4 \pm 8.7$  a u grupi sa amalgamom  $45.0 \pm 5.0$ . Takođe nije nađena statistički značajna razlika između eksperimentalne i kontrolne grupe u pogledu životne dobi u odnosu na sve ispitanike, niti razlike po životnoj dobi analizirane prema polnoj zastupljenosti ispitanika (Tabela 2).

**Tabela 2.** Demografske karakteristike ispitanika podvrgnutih apikotomiji i retrogradnom punjenju korena kanala

Parametri		Biodentin		Amalgam		Ukupno	
		N <sup>0</sup> (%)	N <sup>0</sup> PL (%)	N <sup>0</sup> (%)	N <sup>0</sup> PL (%)	N <sup>0</sup> (%)	N <sup>0</sup> PL (%)
Pol	M	7 (43.7)	9 (37.5)	10 (52.6)	14 (56.0)	17 (48.6)	23 (49.9)
	Ž	9 (56.3)	15 (62.5)	9 (47.4)	11 (44.0)	18 (51.4)	26 (50.1)
	Ukupno	16 (100)	24 (100)	19 (100)	25 (100)	35 (100)	49 (100)
Životna dob		Sred.vred ± SD		Sred.vred ± SD		Sred.vred ± SD	
	M	48.4 ± 16.5		50.1 ± 9.8		49.2 ± 13.5	
	Ž	47.4 ± 8.7		45.0 ± 5.0		46.2 ± 6.8	

M - muškarci; Ž - žene ; PL - periapiksne lezije

#### 4.1.2. Karakteristike periapiksnih lezija lečenih hirurškim putem uz primenu materijala za retrogradnu opturaciju kanala korena

U tabeli 3 su prikazane karakteristike PL, razvrstane u odnosu na nekoliko najvažnijih parametara. U odnosu na veličinu PL su podeljene na veće (srednji prečnik jednak i veći od 5 mm) i manje PL (srednji prečnik manji od 5 mm). Predominirale su veće lezije, tako da je od ukupno 49, njih 34 (69.4%) pripadalo ovoj grupi dok je u grupu manjih lezija svrstano 13 (30.6%) PL. Lezije su skoro podjednako bile raspoređene po veličini u odnosu na grupe ispitanika. U grupi sa Biodentinom bilo je 18 (75%) većih a 6 (25%) manjih a u grupi sa amalgamom bilo je 16 (64.0%) većih i 7 (36.0%) manjih PL. Između grupa nije nađena statistički značajna razlika u pogledu veličine lezija.

Kada je u pitanju tip korena zuba, dominirali su jednokoreni zubi. Samo kod ukupno 7 od 49 PL, patološki procesi su bili na dvokorenim gornjim premolarima. Lezije su takođe bile uniformno raspoređene između grupa u odnosu na tip korena (Tabela 3).

Najveći broj PL je bio praćen simptomatologijom, najčešće bolom u predelu zuba zahvaćenim patološkim procesom uz najčešće jasne radiografske karakteristike lezija. Takvih je ukupno bilo 38 PL. Preostalih 11 PL su bile bez simptoma i po pravilu su otkrivene slučajno nakon rendgenskog snimanja zuba zbog drugih indikacija. Raspodela PL prema prisutnim simptomima pre hirurškog lečenja po grupama je takođe bila približno ista, tako da nije postojala statistički značajna razlika. U grupi sa Biodentinom 20 (83.3%) PL je bilo praćeno simptomatologijom a u grupi sa amalgamom je bilo 18 (72.0%) takvih lezija (Tabela 3).

Većina PL (85.7%) je ranije lečena konvencionalnom endodontskom terapijom sa ili bez reintervencije. Raspodela ranije tretiranih ili ne tretiranih PL po grupama je takođe bila slična tako da i na osnovu ovog parametra nije nađena statistički značajna razlika (Tabela 3).

Na osnovu ovih parametara može se zaključiti da je raspodela PL prema najznačajnijim kliničkim parametrima i demografskim karakteristikama bila uniformna između eksperimentalne i kontrolne grupe naših ispitanika, čime su se stekli adekvatni uslovi za procenu efikasnosti sprovedene terapije.

**Tabela 3.** Karakteristike periapexnih lezija tretiranih hirurški uz primenu materijala za retrogradno punjenje kanala korena zuba

Parametri		Biodentin		Amalgam		Sve PL	
		N <sup>0</sup> PL	(%)	N <sup>0</sup> PL	(%)	N <sup>0</sup> PL	(%)
Veličina PL	Veće	18	(75.0)	16	(64.0)	34	(69.4)
	Manje	6	(25.0)	7	(36.0)	13	(30.6)
	Ukupno	24	(100)	25	(100)	49	(100)
Tip korena	1. koren	21	(87.5)	21	(84.0)	42	(85.7)
	2. korena	3	(12.5)	4	(16.0)	7	(14.3)
	Ukupno	24	(100)	25	(100)	49	(100)
Prisustvo simptoma	DA	20	(83.3)	18	(72.0)	38	(77.6)
	NE	4	(16.7)	7	(28.0)	11	(22.4)
	Ukupno	24	(100)	25	(100)	49	(100)
Preth.endodont. tretman	DA	19	(79.2)	23	(92.0)	42	(85.7)
	NE	5	(20.8)	2	(8.0)	7	(14.3)
	Ukupno	24	(100)	25	(100)	49	(100)

#### 4.1.3. Poređenje efikasnosti Biodentina i amalgama u hirurškom lečenju periapexnih lezija.

Ključni cilj ovog kliničkog istraživanja je bilo testiranje pretpostavke da je Biodentin efikasniji u zarastanju PL nakon hirurškog lečenja i retrogradne opturacije kanala korena zuba. Kao što je već istaknuto, studija je adekvatno sprovedena kako je ranije opisano i posle perioda od 6 meseci evalirani su radiografski i klinički parametri zarastanja, odnosno uspešnost terapije. Rezultati ispitivanja su prikazani u Tabeli 4.

Na osnovu radiografskih kriterijuma u grupi sa Biodentinom identifikovano je 18 od ukupno 24 PL koje su označene indeksom 1 (kompletno zarastanje) što je činilo 75% svih PL iz ove grupe. Sa druge strane procenat PL označenih kao kompletno zarastanje je bio manji u kontrolnoj grupi sa amalgamom i iznosio je 44% (11 PL od 25 PL). Nekompletno zarastanje u grupi sa Biodentinom je nađeno u 20.1% PL (5 od 24 PL) a neizvesno u 4.2% PL (1PL). U grupi sa amalgamom nekompletno zarastanje je bilo u 52% PL (13 od 25 PL) a neizvesno u 1PL (4.0%). Razlike između grupa su bile statistički značajne na nivou  $p < 0.05$ . Potpuno identični rezultati su dobijeni kada su primenjeni objedinjeni radiografski i klinički parametri. Međutim, kada je procena terapije vršena dominantno u odnosu na kliničke parametre, uspeh u obe grupe je bio bolji. U grupi sa

Biodentinom potpuni uspeh je zabeležen kod 83.3%, neizvestan uspeh u 12.5% a neuspeh u 4.2% PL. U grupi sa amalgamom potpuni uspeh je bio kod 64.0%, neizvestan uspeh kod 32.0% a neuspeh kod 4.0% PL. Iako je uspeh u grupi sa Biodentinom bio veći, razlika nije bila statistički značajna.

**Tabela 4.** Radiografska i klinička evaluacija ishoda hirurškog lečenja periapeksnih lezija nakon retrogradnog punjenja kanala korena zuba.

Klinička evaluacija	Indeks	Biodentin N (%)	Amalgam N (%)
Radiografski kriterijumi	Kompletno zarast. (indeks 1)	18*	11
	Nekompletno zarast. (indeks 2)	5	13
	Neizvesno zarast. (indeks 3)	1	1
Klinički kriterijumi	Potpuni uspeh (indeks 1)	20	16
	Neizvestan uspeh (indeks 2)	3	8
	Neuspeh (indeks 3)	1	1
Objedinjeni radiograf i klinički kriterijumi	Potpuni uspeh (indeks 1)	18*	11
	Poboljšanje (indeks 2)	5	13
	Neuspeh (indeks 3)	1	1

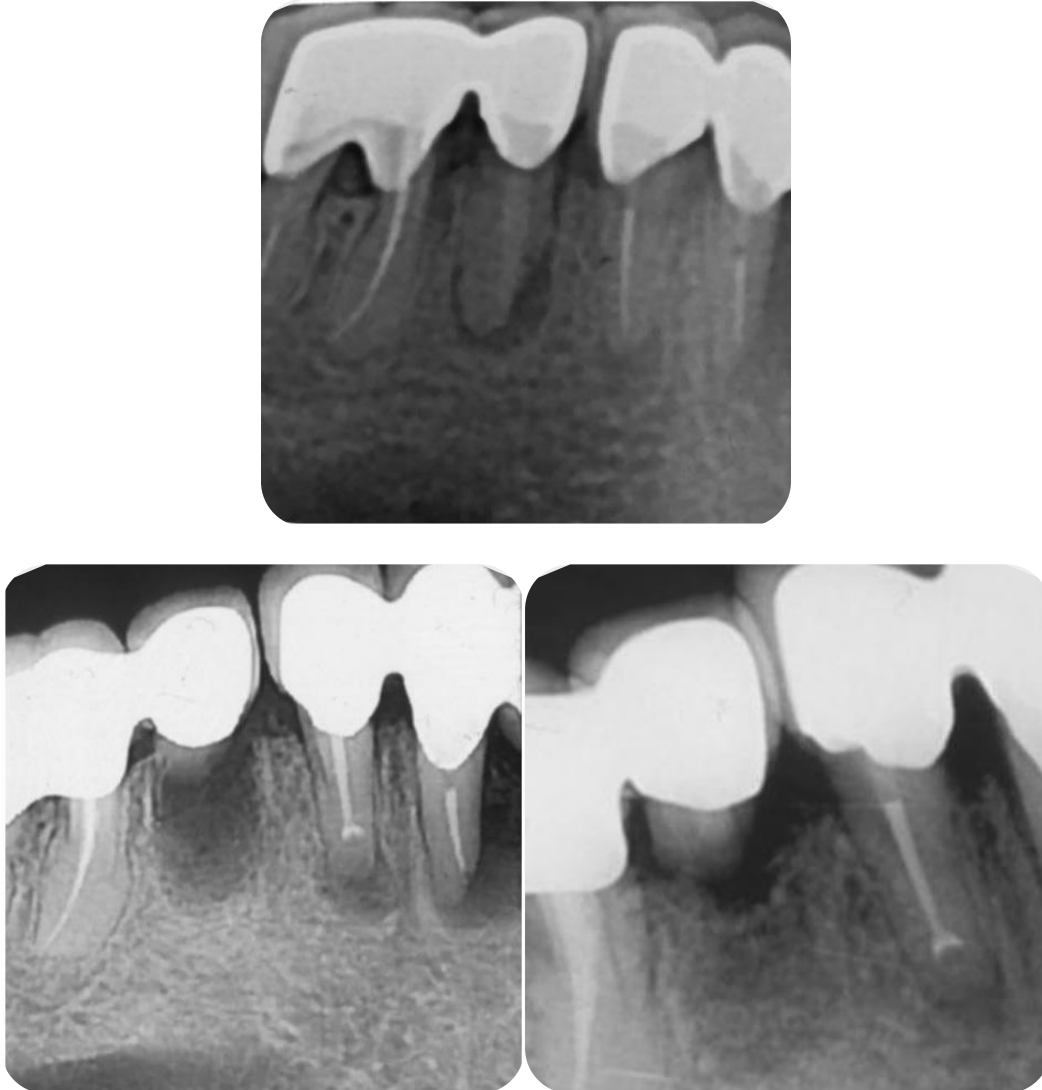
\*=  $p < 0.05$ ; značajnost razlika u uspešnosti lečenja PL između Biodentina i amalgama

Neke od karakterističnih rendgenskih snimaka iz obe grupe su prikazani na slikama 1-4.



**Slika 1.** Kolaž radiografskih snimaka pacijenta MD (M), 40 god. Lezija na zubu 15, prosečne veličine 6.2 mm; Zub prethodno tretiran endodontskim procedurama; Retrogradno punjenje Biodentinom. Gore-pre hirurškog tretmana; Dole levo- neposredno posle tretmana; Dole desno- 6 meseci nakon tretmana.

Radiografski nalaz pokazuje kompletno zarastanje sa jasno vidljivom laminom durum (delimično fragmentisanom) i periodontalnom linijom oko reseciranog vrha korena normalne širine.



**Slika 2.** Kolaž radiografskih snimaka pacijenta UK (Ž), 34 god. Lezija na zubu 34, prosečne veličine 4.1 mm; Zub prethodno tretiran endodontskim procedurama; Retrogradno punjenje Biodentinom. Gore-pre hirurškog tretmana; Dole levo- neposredno posle tretmana; Dole desno-6 meseci nakon tretmana.

Radiografski nalaz pokazuje nekompletno zarastanje bez vidljive lamine dure i rasvetljenjem oko reseciranog vrha korena.





**Slika 3.** Kolaž radiografskih snimaka pacijenta MN (M), 42 god. Lezija na zubu 14, prosečne veličine 6,4 mm; Zub nije prethodno tretiran endodontskim procedurama; Retrogradno punjenje amalgamom. Gore-pre hirurškog tretmana; Dole levo- neposredno posle tretmana; Dole desno- 6 meseci nakon tretmana.

Radiografski nalaz pokazuje kompletno zarastanje sa vidljivom tankom laminom durom sličnih karakteristika kao i kod susednih zuba i jasno vidljivom periodontalnom linijom oko reseciranog vrha korena normalne širine.



**Slika 4.** Kolaž radiografskih snimaka pacijenta UK (Ž), 42 god. Lezija na zubu 23, prosečne veličine 5.5 mm; Zub prethodno tretiran endodontskim procedurama; Retrogradno punjenje amalgamom. Gore-pre hirurškog tretmana; Dole levo- neposredno posle tretmana; Dole desno- 6 meseci nakon tretmana.

Radiografski nalaz pokazuje nekompletno zarastanje bez vidljive lamine dure i rasvetljenjem oko reseciranog vrha korena, asimetričnog u odnosu na leziju neposredno nakon hirurškog tretmana.

#### **4.1.3. Poređenje efikasnosti Biodentina i amalgama u hirurškom lečenju periapeksnih lezija u zavisnosti od veličine lezija**

Rezultati ispitivanja efikasnosti Biodentina i amalgama u hirurškom lečenju PL u zavisnosti od veličine lezija su prikazani u Tabeli 5. Na osnovu analize samo radioloških ili objedinjenih radioloških i kliničkih kriterijuma pokazano je da je kompletno zarastanje/potpuni uspeh u grupi sa Biodentinom bilo kod 15 većih PL i 3 manjih PL. Indeksom 2 (nekompletno zarastanje, odnosno nepotpuni uspeh) je označeno 3 većih i 2 manje PL. Indeksom 3 (neizvesno, odnosno neuspešno lečenje) je okarakterisana samo 1 manja PL.

U grupi sa amalgamom uspešnost lečenja, procenjivanog na osnovu gore navedenih kriterijuma, indeksom 1 je označeno 4 većih PL i 7 manjih PL, indeksom 2 je označeno 12 većih i 1 manja PL. Indeksom 3 je takođe okarakterisana samo 1 manja PL.

Kada je procena vršena dominantno na osnovu kliničkih kriterijuma, u grupi sa Biodentinom je indeksom 1 (potpuni uspeh) označeno 15 većih PL i 5 manjih PL, indeksom 2 (neizvestan uspeh) su označene 2 veće i 1 manja PL, a indeksom 3 (neuspeh) jedna manja PL. U grupi sa amalgamom potpuni uspeh je zabeležen kod 8 većih i 8 manjih PL. Nepotpuni uspeh je bio kod 8 većih PL i nijedne manje PL a neuspeh je bio takođe kod jedne manje PL.

U grupi sa Biodentinom nije nađena statistički značajna razlika u pogledu uspeha lečenja između većih i manjih PL, definisanog ni po jednom od sva tri ispitivana modaliteta. Međutim, u grupi sa amalgamom, nađena je statistički značajna razlika u efektu lečenja, procenjivanog na sva tri načina, tako što je manji uspeh zabeležen kod većih PL. Takođe je nađena statistički značajna razlika između Biodentina i amalgama u pogledu boljeg ishoda terapije većih PL u grupi sa Biodentinom, kada su efekti terapije procenjivani na osnovu radiografskih i objedinjenih radiografskih i kliničkih pokazatelja. Veća razlika je nađena kada je procenjivana efikasnost u grupama označenih indeksom 1 ( $p < 0.001$ ) u odnosu na grupe označene indeksom 2 ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 5.** Procena efikasnosti apikotomije praćene retrogradnim punjenjem kanala korena zuba u zavisnosti od veličine lezije

Uspešnost terapije		Biodentin		Amalgam	
	Indeksi	Veće PL (N)	Manje PL (N)	Veće PL (N)	Manje PL (N)
<b>Radiolološki kriterijumi</b>	Indeks 1	15 ••	3	4	7
	Indeks 2	3•	2	12*	1
	Indeks 3	0	1	0	1
<b>Klinički kriterijumi</b>	Indeks 1	15	5	8	8
	Indeks 2	2	1	8*	0
	Indeks 3	0	1	0	1
<b>Objedinjeni kriterijumi</b>	Indeks 1	15••	3	4	7
	Indeks 2	3•	2	12*	1
	Indeks 3	0	1	0	1

\*=  $p < 0.05$ ; značajnost razlika između većih i manjih PL u grupi sa amalgamom. •=  $p < 0.05$ , značajnost razlika u zastupljenosti PL sa indeksom 2 između Biodentina i amalgama; •• =  $p < 0.001$ , značajnost razlika u zastupljenosti PL sa indeksom 1 između Biodentina i amalgama.

Kada je vršena dalja evaluacija rezultata u odnosu na grupu zuba, inicijalno prisutne ili odsutne kliničke simptome odnosno da li je ranije rađeno ili nije endodontsko lečenje razlike između eksperimentalne i kontrolne grupe nisu nađene (rezultati nisu prikazani).

Na osnovu sprovedenog istraživanja se može zaključiti da je Biodentin bio efikasniji u hirurškom lečenju PL u odnosu na amalgam. U grupi sa amalgamom lošiji terapijski ishod je bio kod većih PL.

## **4.2. Eksperimentalna studija. Deo I: Biokompatibilnost Biodentina i amalgama in vitro.**

### **4.2.1. Karakterizacija ekstrakta Biodentina i amalgama**

Pre započinjanja eksperimentalnog istraživanja bilo je neophodno pripremiti ekstrakt Biodentina i kontrolnog amalgama (kondicioniranog medijuma-KM) i okarakterisati njihova svojstva. Kondicioniranje je pripremljeno prema direktivi ISO 10993-12:2009 koja predlaže da odnos mase materijala u odnosu na zapreminu medijuma za kondicioniranje treba da bude 0.2g/ml. Ovaj standard preporučuje da kondicioniranje traje najmanje 24 časa a u zavisnosti od vrste materijala ekstrakcija može da traje i duže.

U ovom kontekstu mi smo se opredelili da kondicioniranje vršimo 24 časa i 3 dana. Imajući u vidu specifičnosti materijala i njihove do sada poznate osobine, uključujući i vreme otvrdnjavanja, a shodno definisanom naučnom problemu mi smo se opredelili da koristimo sveže pripremljene i otvrdnute materijale. Alternativno, kondicioniranje je rađeno i 24 časa nakon polimerizacije radi komparacije sa studijama gde su drugi autori upravo koristili ovakav pristup.

Posle inkubacionog perioda određena su osnovna svojstva KM.

U ekstraktima Biodentina bio je jasno uočljiv sivo beličasti talog. Mikroskopskom analizom uočene su mikročestice različitih veličina, nepravilnih ili pravilnih ovalnih struktura veličine od oko 3 do 5 mikrona. Takođe merenjem pH vrednosti KM pokazan je njegov izrazito bazni karakter.

Za razliku od Biodentina, u KM amalgama nije bilo vidljivih ni makroskopskih ni mikroskopskih promena i njihov pH je iznosio 7.3-7.4, kao i pH svežeg kontrolnog RPMI medijuma. U cilju određivanja stepena razlaganja Biodentina tokom kondicioniranja, ekstrakti su centrifugirani, supernatanti su odvojeni i dodatno filtrirani kroz filtere od 0.22 mikrona a masa taloga je merena i preračunata u odnosu na ukupnu masu materijala pre kondicioniranja. Rezultati su izraženi u procentima i mg/ml a prikazani su u Tabeli 6.

**Tabela 6.** Stepen degradacije Biodentina u kondicioniranom RPMI medijumu i pH vrednost ekstrakta

Vrsta materijala	pH	Vreme kondicioniranja	% ekstrahovanog materijala	mg/ml ekstrh. materijala
Sveži Biodentin	12.0	24 časa	9.8%	19.6
Sveži Biodentin	12.0	3 dana	11.2%	22.4
Biodentin-24č	11.5	24 časa	7.8%	15.6
Biodentin-24č	11.5	3 dana	9.0%	18.0
Suvi Biodentin	11.0	24 časa	2.3%	4.6
Suvi Biodentin	11.5	3 dana	2.9%	5.8

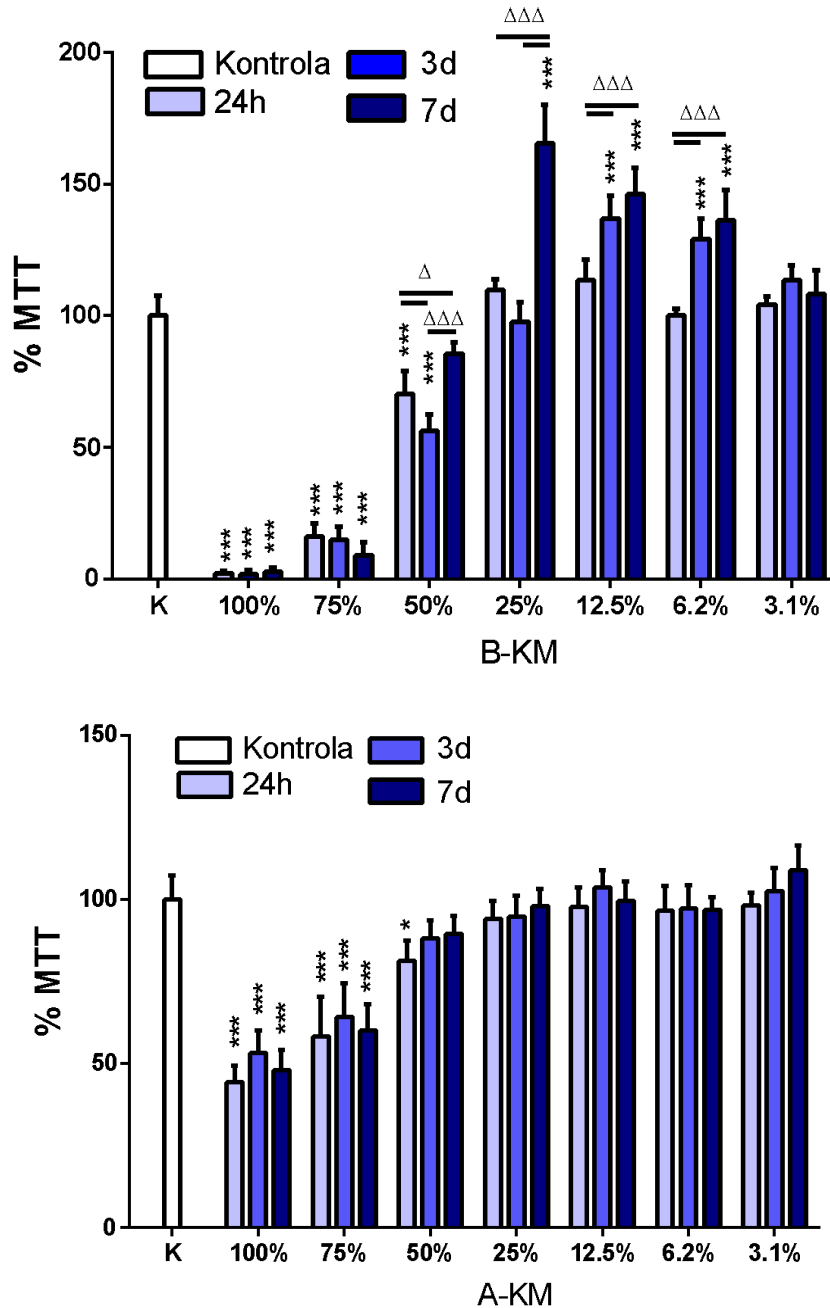
Sveži Biodentin: Biodentin postavljen na kondicioniranje 10 min nakon pripreme; Biodentin-24 časa: Biodentin postavljen na kondicioniranje 24 nakon pripreme; Suvi Biodentin: Biodentin postavljen na kondicioniranje 14 dana nakon pripreme.

#### **4.2.2. Efekat kondicioniranih medijuma, pripremljenih ekstrakcijom sveže polimerizovanog Biodentina i amalgama na metaboličku aktivnost L929 ćelija**

Na osnovu prethodnih rezultata ispitani smo citokompatibilnost KM Biodentina (B-KM) i amalgama (A-KM). U prvom skriningu upoređivana je metabolička aktivnost L929 ćelija u prisustvu koncentrovanog (100%) i 6 opadajućih koncentracija (razblaženja) KM do koncentracije od 3.1%.

Na grafikonu 1 su prikazani uporedni efekti B-KM i A-KM pripremljenih od sveže polimerizovanih materijala koji su kondicionirani 24 časa a metabolička aktivnost je procenjivana posle 24 časa, 3 dana i 7 dana od postavljanja kultura. U tabeli 7 su prikazane statistički značajne razlike između odgovarajućih koncentracija B-KM i A-KM.

Grafikon 1A pokazuje da su koncentracije B-KM od 100%, 75% i 50% inhibirale metaboličku aktivnost L929 ćelija na dozno zavisani način ( $p < 0.005$ ) u svim vremenskim terminima, pri čemu je koncentrovani B-KM doveo do potpune inhibicije MTT aktivnosti. Koncentracije od 25% i manje nisu imale statistički značajnog efekta posle 24 časa, ali je sa produženjem inkubacije došlo do statistički značajnog povećanja metaboličke aktivnosti. Najveća stimulacijska aktivnost je zabeležena u kulturama sa 25% i 12.5% B-KM i to 7. dana kultivacije ( $p < 0.005$ ) u odnosu na kontrolu. A-KM je u tri najveće koncentracije takođe inhibirao metaboličku aktivnost L929 ćelija u sva tri ispitivana vremenska termina ( $p < 0.005$ ), s tim što su koncentracije od 100% i 75% imale manji efekat u odnosu na iste koncentracije B-KM ( $p < 0.005$ ) (Tabela 7). Pri koncentraciji od 50% statistički značajna razlika između dva KM je uočena samo 3 dana ( $p < 0.005$ ). Međutim, za razliku od manjih koncentracija B-KM koje su imale stimulacijski efekat, iste koncentracije A-KM nisu bitnije menjale metaboličku aktivnost L929 ćelija u odnosu na kontrolne kulture (Grafikon 1B), pa su samim tim bile veće u odnosu na odgovarajuće koncentracije B-KM (Tabela 7).



**Grafikon 1.** Uticaj kondicioniranih medijuma (KM), pripremljenih od sveže polimerizovanog Biodentina (slika gore) i amalgama (slika dole) (24 časa kondicioniranje), na vijabilnost L929 ćelija. Vrednosti su date kao % metaboličke aktivnosti (srednje vrednosti  $\pm$  SD; n=3) izračunate u odnosu na kontrolne vrednosti (K) uzete kao 100%.; \*= $p < 0.05$ ; \*\*\*= $p < 0.005$  u odnosu na kontrolu;  $\Delta = p < 0.05$ ;  $\Delta\Delta\Delta = p < 0.005$  u odnosu na odgovarajuća poređenja prema dužini kultivacije ćelija.

**Tabela 7.** Poređenje statističke značajnosti razlika između metaboličke aktivnosti L929 ćelija kultivisanih 24 časa, 3 ili 7 dana sa različitim koncentracijama kondicioniranih medijuma (KM) pripremljenih od sveže polimerizovanog Biodentina (B) i amalgama (A), pri kondicioniranju od 24 časa

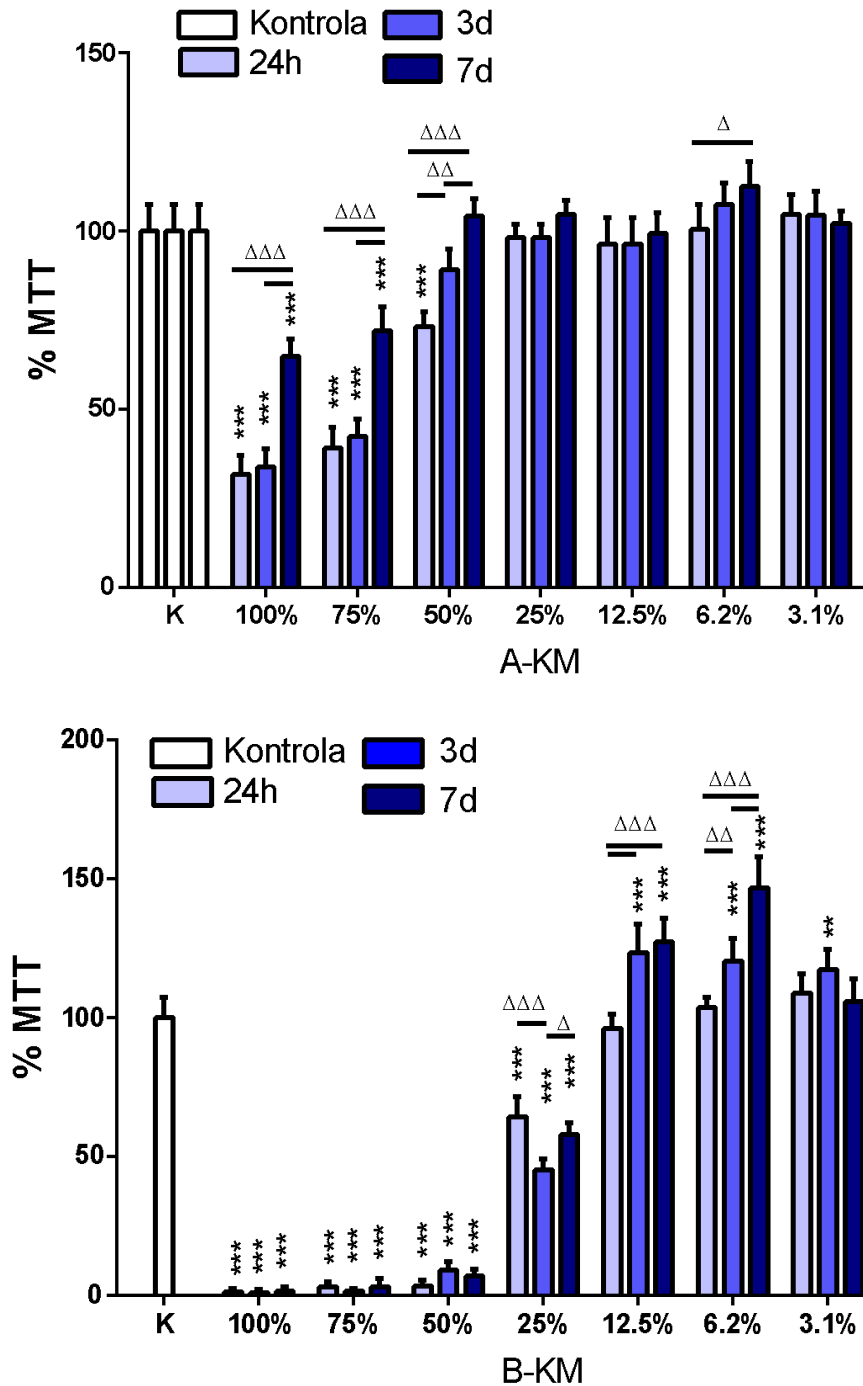
24h	B-KM	B-KM	B-KM	B-KM	B-KM	B-KM	B-KM
3d	100%	75%	50%	25%	12.5%	6.25%	3.1%
7d							
A-KM	***24č						
100%	***3d						
	***7d						
A-KM		***24č					
75%		***3d					
		***7d					
A-KM			3d***				
50%							
A-KM				7d***			
25%							
A-KM					*24č		
12.5%					***3d		
					***7d		
A-KM						***3d	
6.25%						***7d	
A-KM							
3.1%							

Statistička značajnost razlika se odnosi na odgovarajuće vrednosti % MTT (vijabilnosti), prikazane na grafikonu 1. \*=p<0.05; \*\*\*=p<0.005 u odnosu na odgovarajuće koncentracije A-KM, kako je označeno.



Drugi eksperiment se odnosio na poređenje efekata KM kondicioniranog 3 dana na metaboličku aktivnost L929 ćelija. Rezultati prikazani na grafikonu 2A pokazuju izraženiji inhibicijski efekat B-KM u odnosu na kondicioniranje u toku 24 časa, obzirom da su sve tri koncentracije (100%, 75% i 50%) skoro u potpunosti blokirale metaboličku aktivnost L929 ćelija, nezavisno od perioda kultivacije. Inhibicijski efekat je zapažen i sa 25% B-KM ( $p < 0.005$ ). Sve koncentracije B-KM, manje od 25% su stimulisale metaboličku aktivnost posle 3 dana kultivacije. Međutim, najveća stimulacija je uočena 7 dana u kulturama sa 6.2% B-KM.

Inhibicijski efekat A-KM, sakupljenog posle 3 dana kondicioniranja je pokazivao drugačiji obrazac. Naime inhibicijske koncentracije (100%, 75% i 50%), su bile izraženije 24.časa i 3.dana kultivacije L929 ćelija u odnosu na iste koncentracije A-KM sakupljenog kondicioniranjem amalgama u toku 24.časa (Grafikon 2B), ali je efekat bio statistički značajno manji u odnosu na B-KM sve do koncentracije od 25% (Tabela 8). Međutim, posle 7 dana inhibicijski efekat je bio smanjen i vidljiv samo kod dve najveće koncentracije A-KM. Takođe nije zabeležen stimulacijski efekat ni kod jedne koncentracije A-KM, zbog čega su i razlike bile statistički značajne u poređenju sa B-KM (Tabela 8).



**Grafikon 2.** Uticaj kondicioniranih medijuma (KM), pripremljenih od sveže polimerizovanog Biodentina (slika gore) i amalgama (slika dole) (3 dana kondicioniranje), na vijabilnost L929 ćelija. Vrednosti su date kao % metaboličke aktivnosti (srednje vrednosti  $\pm$  SD; n=3) izračunate u odnosu na kontrolne vrednosti (K) uzete kao 100%; \*\*= $p < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.005$  u odnosu na kontrolu;  $\Delta = p < 0.05$ ;  $\Delta\Delta = p < 0.01$ ;  $\Delta\Delta\Delta = p < 0.005$  u odnosu na odgovarajuća poređenja prema dužini kultivacije ćelija.

**Tabela 8.** Poređenje statističke značajnosti razlika između metaboličke aktivnosti L929 ćelija kultivisanih 24 časa, 3 ili 7 dana sa različitim koncentracijama kondicioniranih medijuma (KM) pripremljenih od sveže polimerizovanog Biodentina (B) i amalgama (A) pri kondicioniranju od 3 dana.

24h	B-KM	B-KM	B-KM	B-KM	B-KM	B-KM	B-KM
3d	100%	75%	50%	25%	12.5%	6.25%	3.1%
7d							
A-KM	***24č						
100%	***3d						
	***7d						
A-KM		***24č					
75%		***3d					
		***7d					
A-KM			***24č				
50%			***3d				
			***7d				
A-KM				***24č			
25%				***3d			
				***7d			
A-KM					***3d		
12.5%					***7d		
A-KM						***3d	
6.25%						***7d	
A-KM							**3d
3.1%							

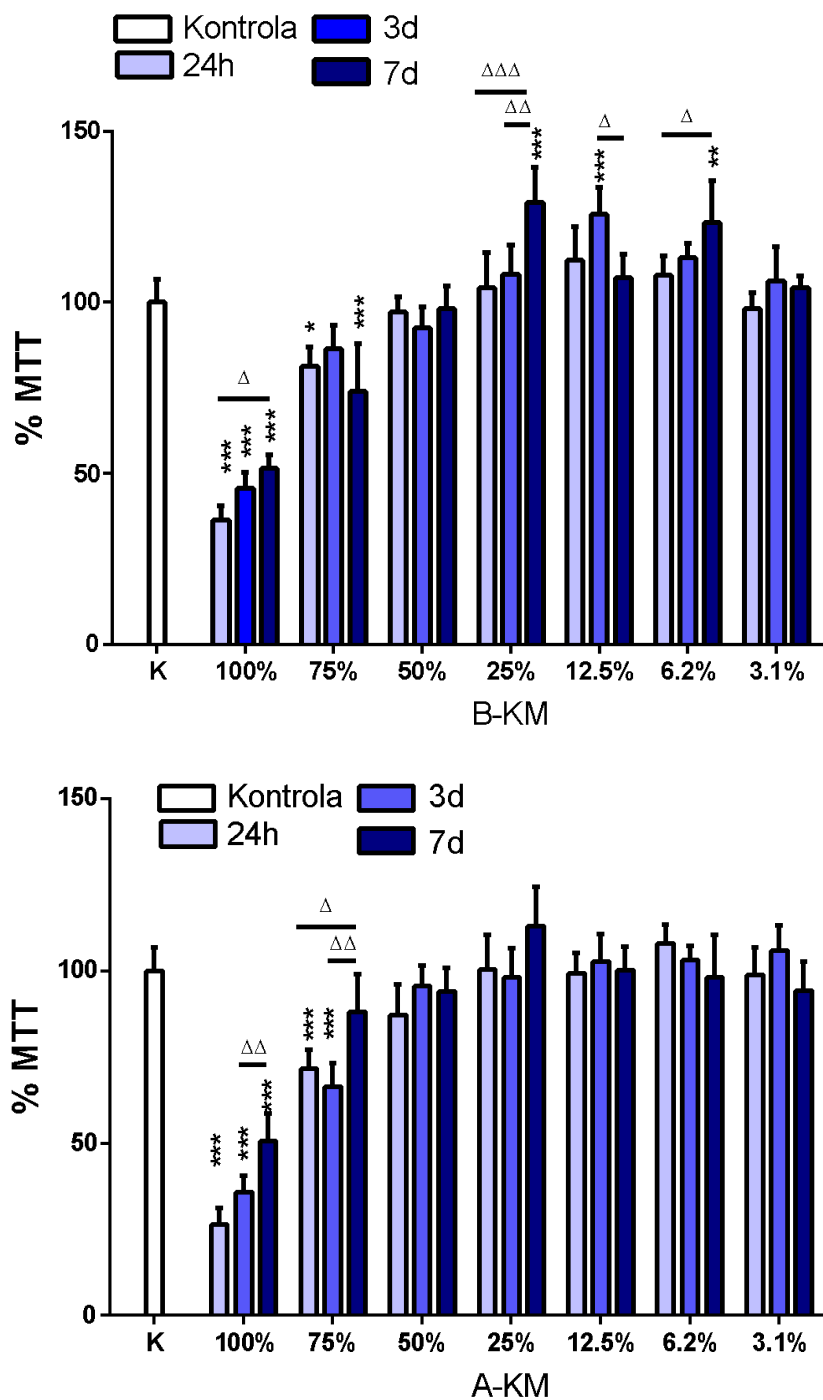
Statistička značajnost razlika se odnosi na odgovarajuće vrednosti % MTT (vijabilnosti), prikazane na grafikonu 2. \* \*=p<0.01; \*\*\*=p<0.005 u odnosu na odgovarajuće koncentracije A-KM, kako je označeno.

#### **4.2.3. Efekat kondicioniranih medijuma, pripremljenih ekstrakcijom otvrdnutog Biodentina i amalgama na metaboličku aktivnost L929 ćelija**

Na osnovu rezultata stepena degradacije Biodentina, gde je pokazano da se iz potpuno polimerizovanog (otvrdnutog) Biodentina oslobađa znatno manji broj mikročestica, moglo se pretpostaviti da je citotoksični efekat ovakvo pripremljenog B-KM na L929 ćelije manji nego efekat B-KM pripremljenog od sveže polimerizovanog Biodentina. U cilju provere ove pretpostavke postavljen je eksperiment po istom modelu kao i prethodni. Rezultati su prikazani na grafikonima 3 i 4 i tabelama 9 i 10.

Grafikon 3A prikazuje efekat B-KM pripremljenog posle 24. časovnog kondicioniranja od otvrdnutog Biodentina na metaboličku aktivnost L929 ćelija u zavisnosti od vremena kultivacije ćelija. Uočava se da najveće koncentracije B-KM (100% i 75%) ispoljavaju inhibitorni efekat, koji je značajno manji nego efekat istih koncentracija B-KM pripremljenog na isti način od sveže polimerizovanog Biodentina (Grafikon 1). Inhibicija se smanjivala sa produžetkom vremena kultivacije ćelija. Stimulacijski efekti manjih koncentracija B-KM su zapaženi nakon 3 dana (12,5%;  $p < 0.005$ ), odnosno nakon 7 dana kultivacije (25%;  $p < 0.005$ ) i (6.25%;  $p < 0.01$ ).

A-KM (pripremljen na identičan način kao i B-KM) je u najvećim koncentracijama (100% i 75%) inhibirao metaboličku aktivnost L929 ćelija, dozno zavisno, posle 24 časa i 3 dana kultivacije ( $p < 0.005$ ). Efekat inhibicije se smanjivao sa dužinom kultivacije ćelija tako da je smanjenje vijabilnosti L929 ćelija posle 7 dana kultivacije zabeležena samo u prisustvu koncentrovanog A-KM. Koncentracije 50% i manje nisu bitnije menjale vijabilnost ćelija. Poređenjem efekta B-KM i A-KM u ovom eksperimentu pokazuje da je inhibicijski efekat na vijabilnost ćelija bio veći kod amalgama pri koncentracijama od 100% i 75% i to prvog i trećeg dana kultivacije. Sa druge strane, niže koncentracije B-KM su statistički značajno povećavale metaboličku aktivnost L929 ćelija kako u odnosu na kontrolu tako i u odnosu na iste koncentracije A-KM (Tabela 9).



**Grafikon 3.** Uticaj KM, pripremljenih od otvrdnutog Biodentina (slika gore) i amalgama (slika dole) (24 časa kondicioniranje), na vijabilnost L929 ćelija. Vrednosti su date kao srednji % metaboličke aktivnosti ± SD; n=3, izračunate u odnosu na kontrolne vrednosti (K) uzete kao 100%.; \*=p<0.05; \*\*=p<0.01; \*\*\*=p<0.005 u odnosu na kontrolu; Δ=p<0.05; ΔΔ=p<0.01; ΔΔΔ=p<0.005 u odnosu na odgovarajuća poređenja prema dužini kultivacije ćelija.

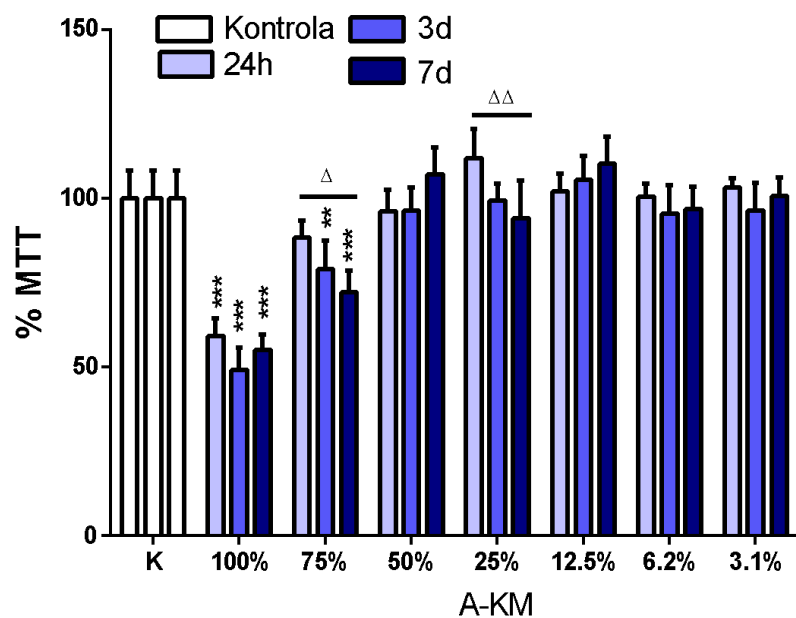
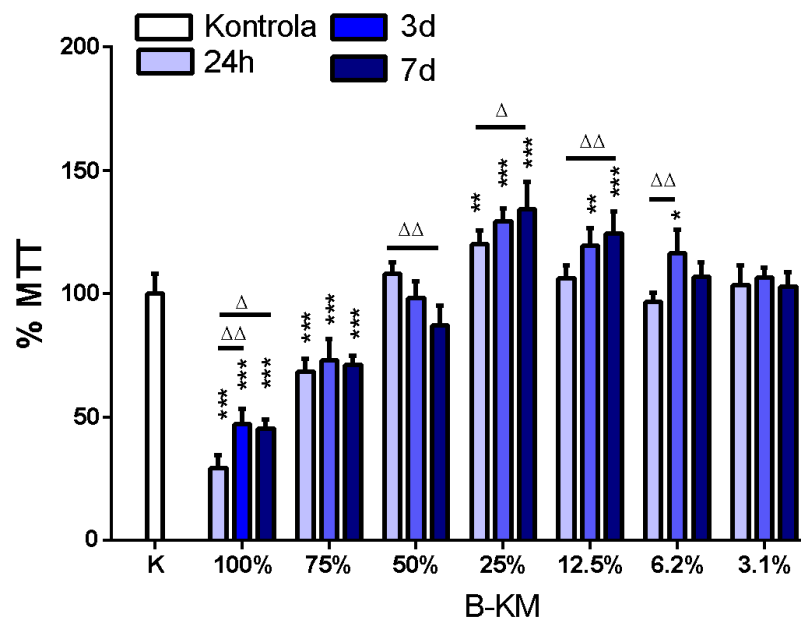
**Tabela 9.** Poređenje statističke značajnosti razlika između metaboličke aktivnosti L929 ćelija kultivisanih 24 časa, 3 ili 7 dana sa različitim koncentracijama kondicioniranih medijuma (KM) pripremljenih od otvrdnutog Biodentina (B) i amalgama (A) pri kondicioniranju od 24 časa

24h 3d 7d	B-KM 100%	B-KM 75%	B-KM 50%	B-KM 25%	B-KM 12.5%	B-KM 6.25%	B-KM 3.1%
A-KM 100%	***24č **3d						
A-KM 75%		***24č **3d					
A-KM 50%							
A-KM 25%				*7d			
A-KM 12.5%					*24č ***3d		
A-KM 6.25%						*7d	
A-KM 3.1%							

Statistička značajnost razlika se odnosi na odgovarajuće vrednosti % MTT (vijabilnosti), prikazane na grafikonu 3. \*= $p < 0.05$ ; \*\*= $p < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.005$  u odnosu na odgovarajuće koncentracije A-KM, kako je označeno.

Na grafikonu 4A su prikazani rezultati efekta B-KM i A-KM pripremljenih od otvrdnutih materijala pri produženom kondicioniranju od 3 dana. Uočava se da veće koncentracije (100% i 75%) deluju inhibitorno na metaboličku aktivnost L929 ćelija ali je njihov efekat manji nego efekat istih koncentracija B-KM pripremljenih pod istim uslovima od sveže polimerizovanog materijala (Grafikon 2). Inhibicijski efekat je bio najveći posle 24 časa kultivacije. Sa druge strane, stimulacijski efekti manjih koncentracija (25% - 6.2%) su bili izraženiji posle 3 i 7 dana kultivacije.

A-KM je pokazivao inhibični efekat u dve najveće koncentracije, dozno zavisno, i on je bio izraženiji pri dužoj kultivaciji. Ni jedna koncentracija A-KM nije stimulisala metaboličku aktivnost L929 ćelija (Grafikon 4B). Slično kao i u prethodnim eksperimentima stimulacijske koncentracije B-KM su pokazivale statistički značajne razlike u odnosu na odgovarajuće koncentracije A-KM. Međutim, inhibični efekat većih koncentracija A-KM je bio manje izražen 24 časa u odnosu na efekat istih koncentracija B-KM (Tabela 10).



**Grafikon 4.** Uticaj KM, pripremljenih od otvrdnutog Biodentina (slika gore) i amalgama (slika dole) (3 dana kondicioniranje), na vijabilnost L929 ćelija. Vrednosti su date kao srednji % metaboličke aktivnosti  $\pm$  SD; n=3, izračunate u odnosu na kontrolne vrednosti (K) uzete kao 100%.; \*=p<0.05; \*\*=p<0.01; \*\*\*=p<0.005 u odnosu na kontrolu; Δ=p<0.05; ΔΔ=p<0.01; u odnosu na odgovarajuća poređenja prema dužini kultivacije ćelija.

**Tabela 10.** Poređenje statističke značajnosti razlika između metaboličke aktivnosti L929 ćelija kultivisanih 24 časa, 3 ili 7 dana sa različitim koncentracijama kondicioniranih medijuma (KM) pripremljenih od otvrdnutog Biodentina (B) i amalgama (A) pri kondicioniranju od 3 dana.

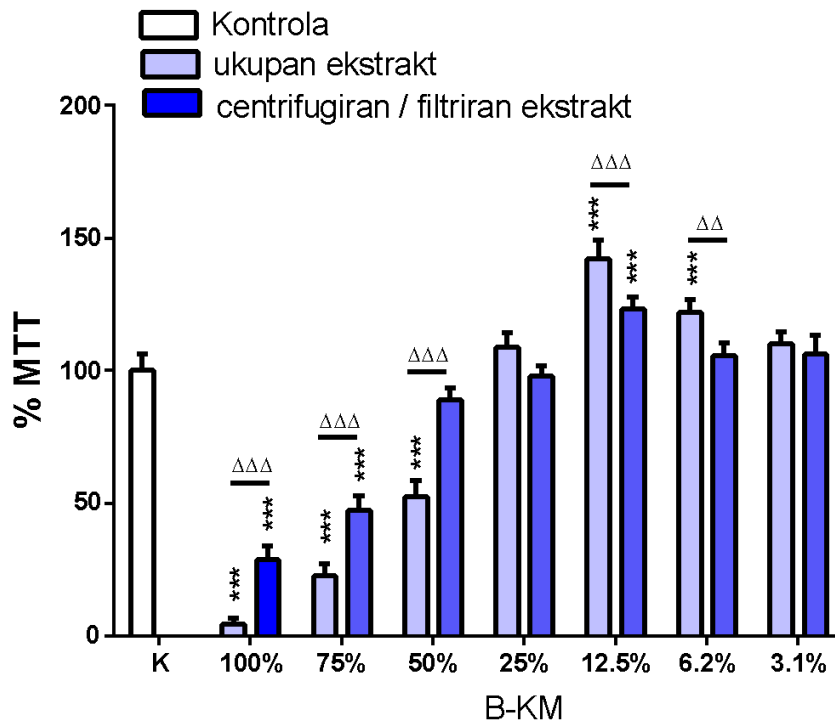
24h 3d 7d	B-KM 100%	B-KM 75%	B-KM 50%	B-KM 25%	B-KM 12.5%	B-KM 6.25%	B-KM 3.1%
A-KM 100%	***24č						
A-KM 75%		*24č					
A-KM 50%			*7d				
A-KM 25%				***3d ***7d			
A-KM 12.5%					**3d ***7d		
A-KM 6.25%						*3d	
A-KM 3.1%							

Statistička značajnost razlika se odnosi na odgovarajuće vrednosti % MTT (vijabilnosti), prikazane na grafikonu 3. \*= $p < 0.05$ ; \* \*= $p < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.005$  u odnosu na odgovarajuće koncentracije A-KM, kako je označeno.

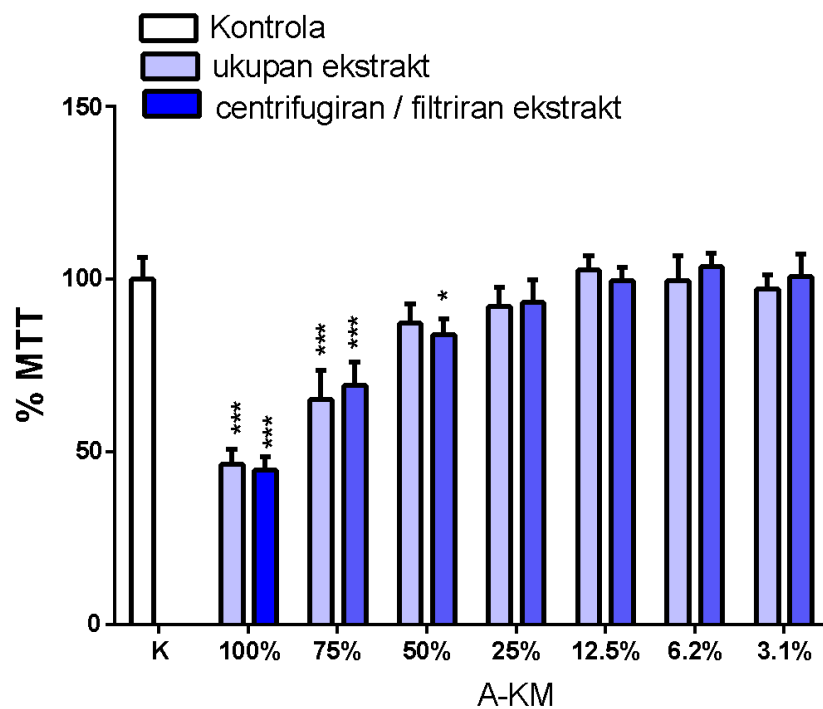
U cilju provere koliko modulaciji metaboličke aktivnosti L929 ćelija doprinose čestice Biodentina a koliko solubilni faktori uporedno je ispitan efekat ukupnog B-KM sa efektom centrifugiranog, a zatim filtriranog B-KM. Paralelno je na isti način pripremljen i A-KM. U ovom eksperimentu kondicioniranje je rađeno 24 časa nakon polimerizacije materijala a kondicioniranje je trajalo 3 dana. Rezultati MTT testa su prikazani na grafikonu 5. Ukupan ekstrakt (B-KM) je pokazivao inhibitorni efekat u većim koncentracijama (100%, 75% i 50%) ( $p < 0.005$ ), na dozno zavisani način dok su koncentracije od 12.5% i 6.25% pokazivale statistički značajno povećanje metaboličke aktivnosti L929 ćelija. U poređenju sa ukupnim B-KM, filtrirani B-KM je u tri najveće koncentracije doveo do statistički značajno manje inhibicije ( $p < 0.005$ ) i manje stimulacije u kulturama sa 12.5% B-KM ( $p < 0.005$ ), odnosno 6.2% B-KM ( $p < 0.01$ ), (Grafikon 5A).

Efekti filtriranog A-KM su bili isti kao i efekti ukupnog A-KM. Inhibicija je pokazana na dozno zavisani način u kulturama sa 100%, 75% i 50% A-KM. Stimulacijski efekat nije uočen. (Grafikon 5B).





**Grafikon 5A.** Uticaj ukupnog i filtriranog KM, pripremljenih od Biodentina posle 24 časa od polimerizacije (3 dana kondicioniranje), na vijabilnost L929 ćelija. Vrednosti su date kao srednji % metaboličke aktivnosti  $\pm$  SD; n=3, izračunate u odnosu na kontrolne vrednosti (K) uzete kao 100%.; \*\*\*= $p < 0.005$  u odnosu na kontrolu;  $\Delta\Delta = p < 0.01$ ;  $\Delta\Delta\Delta = p < 0.005$  u odnosu na odgovarajuća poređenja prema ukupnom ekstraktu.



**Grafikon 5B.** Uticaj ukupnog i filtriranog KM, pripremljenog od amalgama posle 24 časa od polimerizacije (3 dana kondicioniranje), na vijabilnost L929 ćelija. Vrednosti su date kao srednji % metaboličke aktivnosti  $\pm$  SD; n=3, izračunate u odnosu na kontrolne vrednosti (K) uzete kao 100%.; \*= $p < 0.05$ ; \*\*\*= $p < 0.005$  u odnosu na kontrolu.

#### 4.2.4. Efekat kondicioniranih medijuma, pripremljenih ekstrakcijom Biodentina i amalgama na citotoksičnost i proliferaciju L929 ćelija

Na osnovu prethodnih rezultata MTT testa može se zaključiti da visoke koncentracije ekstrakta Biodentina i amalgama ispoljavaju citotoksični i/ ili inhibicijski efekat na proliferaciju L929 ćelija, dok manje koncentracije B-KM stimulišu ćelijsku proliferaciju. U cilju provere ovih hipoteza u kulturama je izbrojan ukupan broj ćelija i određena njihova vijabilnost korišćenjem boje Tripan plavo kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Korišćene su paralelne kulture iz prethodnog eksperimenta. Vijabilnost je određena posle 24 časa a ukupan broj ćelija posle 3 dana kultivacije L929 ćelija. Iz tabele 11 se vidi da su ukupni B-KM (100%, 75% i 50%), filtrirani B-KM (100%, 75%) i dve najveća koncentracija kako ukupnog tako i filtriranog A-KM (100%, 75%) ispoljavale citotoksični efekat. Ostale koncentracije oba KM nisu bile citotoksične.

**Tabela 11.** Efekat ukupnog i filtriranog KM Biodentina i amalgama na citotoksičnost L929 ćelija procenjivane na osnovu bojenja ćelija sa 1% Tripan plavog.

Uzorci KM	Ukupni KM (% cit.)	Filtrirani KM (% cit.)
B-KM 100%	100.0 ± 0.0 ***	82.0 ± 4.2 *** ●●
B-KM 75%	64.0 ± 4.8 ***	38.0 ± 5.4 *** ●●
B-KM 50%	48.0 ± 3.2 ***	4.6 ± 1.6 ●●
B-KM 25%	2.0 ± 1.2	2.0 ± 1.0
B-KM 12.5%	2.6 ± 1.2	1.6 ± 1.1
B-KM 6.25%	2.0 ± 0.5	1.0 ± 0.8
B-KM 3.1%	1.6 ± 0.5	1.6 ± 1.0
A-KM 100%	54.0 ± 6.4 *** ###	51.0 ± 3.8 *** ###
A-KM 75%	21.0 ± 4.0 *** ###	28.0 ± 5.2 *** #
A-KM 50%	2.6 ± 1.4 ###	4.0 ± 1.2
A-KM 25%	2.6 ± 0.2	3.3 ± 1.5
A-KM 12.5%	1.3 ± 0.4	2.0 ± 0.4
A-KM 6.25%	1.3 ± 1.0	2.3 ± 1.4
A-KM 3.1%	2.0 ± 1.4	2.6 ± 0.6
Kontrola	1.6 ± 1.0	1.6 ± 1.0

Citotoksičnost ćelija u kulturi je određena na osnovu bojenja ćelija sa 1% Tripan plavog. Brojevi predstavljaju srednje vrednosti procenta citotoksičnosti triplikata ± SD jednog reprezentativnog od tri urađena eksperimenta.

\*\*\* =  $p < 0.005$  u odnosu na kontrolu; ●● =  $p < 0.005$  u odnosu na iste koncentracije ukupnog KM; # =  $p < 0.05$ ; ### =  $p < 0.005$  u odnosu na odgovarajuće koncentracije B-KM.

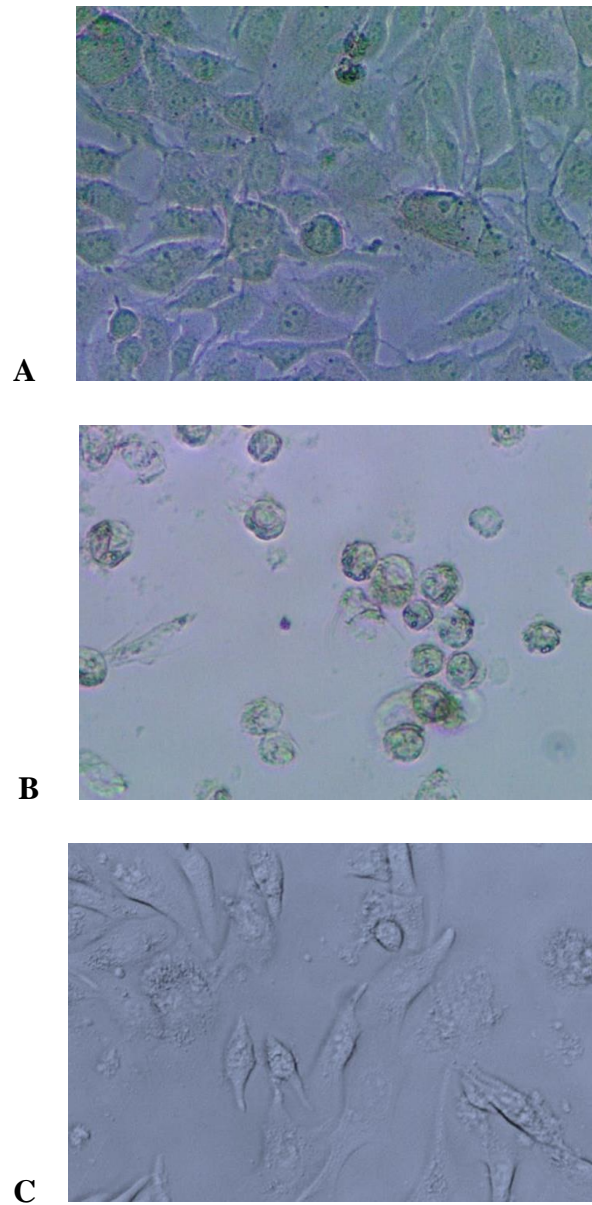
Na osnovu povećanja broja ćelija u odnosu na kontrolu (Tabela 12 ) može se zaključiti da koncentracije ukupnog B-KM od 25%, 12.5% i 6.25% kao i koncentracija filtriranog B-KM od 12.5% stimulišu proliferaciju ćelija. Sa druge strane, na osnovu odsustva razlike u broju ćelija u kulturama sa manjim koncentracijama A-KM može se zaključiti da A-KM nije bitnije menjao proliferaciju L929 ćelija. Poređenjem efekta ukupnog i filtriranog B-KM uočava se da ukupni B-KM u koncentraciji od 12.5% ispoljava veći stimulacijski efekat na proliferaciju L929 ćelija ( $p < 0.05$ ). Iste koncentracije ukupnog i filtriranog A-KM su pokazivale statistički značajno manje vrednosti u odnosu na odgovarajuće koncentracije B-KM ( $p < 0.005$ ).

**Tabela12.** Efekat ukupnog i filtriranog KM Biodentina i amalgama na broj L929 ćelija u kulturi.

Uzorci KM	Ukupni KM (br.ćel. x 10 <sup>4</sup> )	Filtrir. KM (br.ćel. x 10 <sup>4</sup> )
B-KM 50%	3.2 ± 0.4 ***	5.6 ± 0.6 *
B-KM 25%	7.3 ± 0.6 *	6.5 ± 0.4
B-KM 12.5%	9.8 ± 0.8 ***	8.6 ± 0.4 *** #
B-KM 6.25%	7.6 ± 0.4 **	7.2 ± 0.5
B-KM 3.1%	7.0 ± 0.5	6.9 ± 0.3
A-KM 50%	5.4 ± 0.4 ***	4.9 ± 0.4 ***
A-KM 25%	6.8 ± 0.3	6.3 ± 0.6
A-KM 12.5%	5.9 ± 0.6 ***	6.4 ± 0.2 ***
A-KM 6.25%	6.4 ± 0.4	6.9 ± 0.4
A-KM 3.1%	6.2 ± 0.5	6.8 ± 0.3
Kontrola	6.6 ± 0.4	6.6 ± 0.4

Predstavljene su srednje vrednosti broja ćelija (triplikata) ± SD jednog reprezentativnog od tri urađena eksperimenta. \*\*\* = p<0.005 u odnosu na kontrolu; \*\*\* = p<0.005 u odnosu na iste koncentracije ukupnog, odnosno filtriranog B-KM; # = p<0.05 u odnosu na odgovarajuću koncentraciju ukupnog B-KM.

Neki od karakterističnih morfoloških izgleda kultura su prikazani u obliku kolaža na slici 5.



**Slika 5.** Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina (75%) (B) i amalgama (75%) (C) na L929 ćelije. Slike pokazuju izrazit (B) i umeren citotoksični efekat (C) u odnosu na kontrolu (A). Uvećanja x 200.

Na osnovu svih dobijenih rezultata može se izvesti opšti zaključak da veće koncentracije ekstrakta Biodentina i amalgama ispoljavaju citotoksični efekat na L929 ćelije, pri čemu je efekat ekstrakta amalgama manji u odnosu na Biodentin. Za razliku od ekstrakta amalgama, manje koncentracije ekstrakta Biodentina stimulišu proliferaciju L929 ćelija koja je direktno srazmerna periodu kultivacije ćelija. Snažnije citotoksične efekte imaju ekstrakti pripremljenih od sveže polimerizovanih materijala u odnosu na ekstrakte od otvrdnutih materijala i oni su direktno proporcionalni vremenskom trajanju procesa kondicioniranja. Filtrirani ekstrakt Biodentina ispoljava manji citotoksični efekat (veće koncentracije) i manji stimulacijski efekat na proliferaciju ćelija (manje koncentracije) nego ukupni ekstrakt. Ova razlika se ne uočava kod ekstrakta amalgama.

### **4.3. Eksperimentalna studija. Deo II: Modulacijski efekat Biodentina i amalgama na produkciju citokina od strane ćelija iz periapeksnih lezija in vitro**

Drugi deo eksperimentalne studije se odnosio na ispitivanje modulacijskog efekta ekstrakta Biodentina na produkciju pro- i anti-inflamacijskih citokina, kao i citokina koji modulišu regeneraciju kostiju u kulturi ćelija izolovanih iz PL. Poređenje je vršeno sa ekstraktom amalgama kako je definisano hipotezom. Razlog za odabir ovog modela je detaljno objašnjen u poglavlju Naučni problem. U ovom istraživanju odabran je model kondicioniranja materijala 24 časa nakon njihove pripreme za kliničku upotrebu a sam proces ekstrakcije je trajao 3 dana. Korišćeni su ukupni ekstrakti materijala.

#### **4.3.1. Ćelijski sastav periapeksnih lezija**

Pre dizajna eksperimenta na PL ćelijama na kome je proveravana biološka aktivnost ekstrakata ovih materijala bilo je neophodno da se ispita zastupljenost pojedinih populacija u ćelijskim suspenzijama PL kako bi se isključila mogućnost da razlike u odgovoru ćelija na ekstrakte materijala potiču od značajne razlike u ćelijskom sastavu PL. Rezultati prikazani u tabeli 13 pokazuju, da uprkos heterogenosti lezija u odnosu na njihovu veličinu, starost i pol donora, odnosno njihovu kliničku prezentaciju, ćelijski sastav PL je bio prilično uniforman i uglavnom se sastojao od inflamacijskih ćelija. Dominantnu populaciju su činili limfociti (35.88% ± 8.58%), zatim granulociti (24.66% ± 5.69%), makrofagima-slične ćelije (16.22% ± 3.48%) i plazmociti (13.00% ± 3.88%). Mastociti su činili najmanji udeo u ćelijskoj populaciji (2.77% ± 1.47%). Na citospin preparatima su identifikovane i apoptotske ćelije (4.44% ± 1.16%), dok su mali procenat činile ćelije, uglavnom blastoidnog izgleda, čiji identitet se nije mogao odrediti na osnovu morfologije (3.11% ± 1.19%).

**Tabela 13.** Analiza sastava suspenzije ćelija izolovanih iz periapeksnih lezija.

<b>Tip ćelija</b>	<b>Sr.vr. <math>\pm</math> SD (%)</b>	<b>Maks (%) - min (%)</b>
Granulociti	24.66 $\pm$ 5.69	35 - 16
Limfociti	35.88 $\pm$ 8.58	48 - 22
Plazmociti	13.00 $\pm$ 3.88	21 - 9
Makrofagi*	16.22 $\pm$ 3.48	21 - 11
Mastociti	2.77 $\pm$ 1.47	6 - 1
Apoptotske ćelije	4.44 $\pm$ 1.16	6 - 3
Ostale ćelije	3.11 $\pm$ 1.19	5 - 1

Deo ćelija pojedinačnih suspenzija PL je iskorišćen za pripremu citospin preparata na mikroskopskim pločicama koji su obojeni pomoću May-Grunwald-Giemsa a zatim analizirani pomoću svetlosnog mikroskopa. Pojedine populacije ćelija su identifikovane na osnovu jasnih citoloških karakteristika. Apoptotske ćelije su prepoznate na osnovu kondenzovanog i/ ili fragmenisanog jedra. Ćelije koje su svrstane u kategoriju „ostale ćelije” su uglavnom imale izgled krupnih, blastoidnih ćelija.

Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=9). \* U populaciju makrofaga su svrstani monociti, makrofagi i ćelije dendritske morfologije.



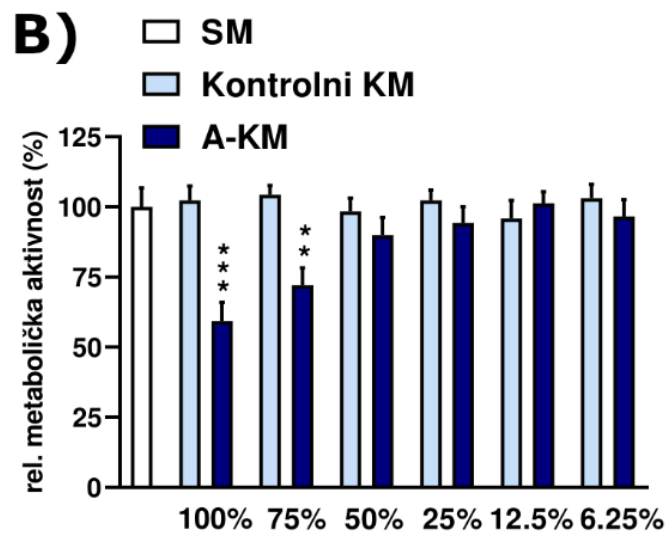
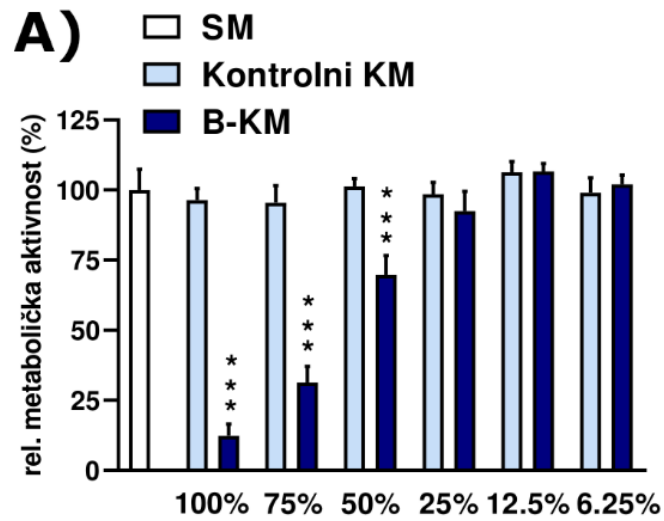
#### **4.3.2. Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na citotoksičnost ćelija iz periapeksnih lezija**

Na osnovu prethodnih rezultata citotoksičnog efekta B-KM i A-KM na L929 ćelije bilo je neophodno da se proveri da li ovi KM deluju i na PL ćelije, kako u daljim funkcionalnim eksperimentima ne bismo uključivali citotoksične koncentracije KM.

Rezultati MTT testa, koji su prikazani na grafikonu 6A, pokazuju da veće koncentracije B-KM (100%, 75% i 50%) značajno smanjuju vijabilnost PL ćelija na dozno zavisani način ( $p < 0.001$ ) u odnosu na kontrolu.

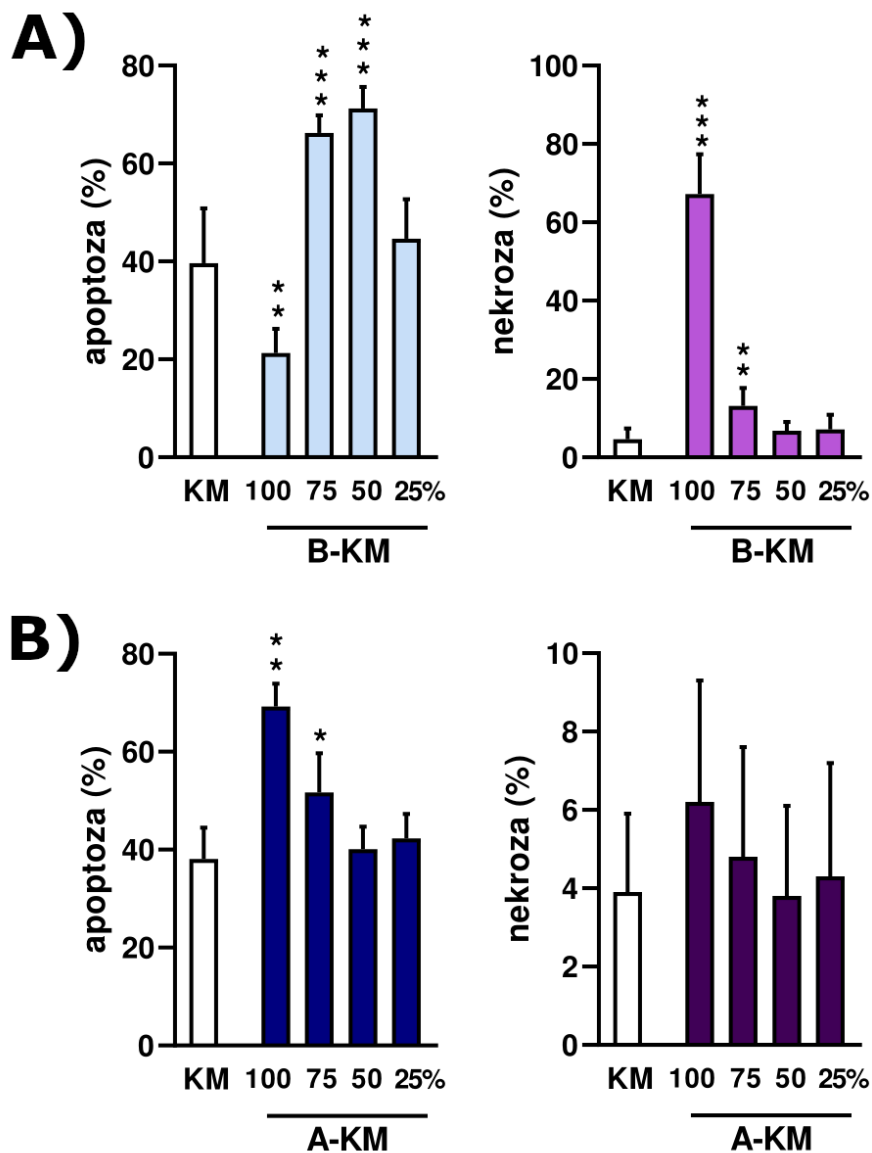
A-KM je smanjivao vijabilnost PL ćelija samo u dve najveće koncentracije ( $p < 0.005$  i  $p < 0.01$ ). Poređenjem ova dva KM, pokazano je da je efekat sve tri inhibitorne koncentracije B-KM bio statistički značajno izraženije nego iste koncentracije A-KM ( $p < 0.01$ ). (Grafikon 6B).

Očekivano, koncentrovani kontrolni KM nije pokazivao nikakav citotoksični efekat. DMSO (10%) koji je korišćen kao pozitivna kontrola je u potpunosti smanjio vijabilnost ćelija (rezultati nisu prikazani).

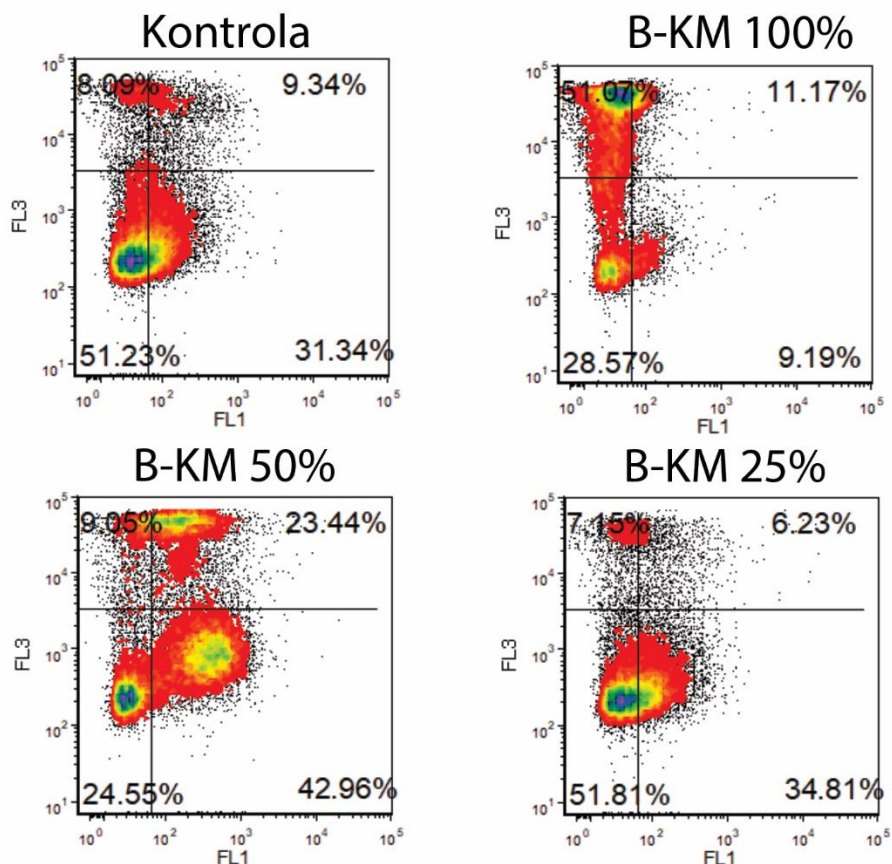


**Grafikon 6.** Efekat kondicioniranih medijuma (KM), pripremljenih od Biodentina (A) i amalgama (B) 24. časa nakon polimerizacije (3 dana kondicioniranje), na vijabilnost PL ćelija. Vrednosti su date kao % metaboličke aktivnosti (srednje vrednosti  $\pm$  SD; n=8) izračunate u odnosu na vrednosti kontrolnog svežeg medijuma (SM) uzete kao 100%.; \*\*= $p < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.005$  u odnosu na kontrolni kondicionirani medijum (KM) pripremljen od kontrolnog materijala, polistirena.

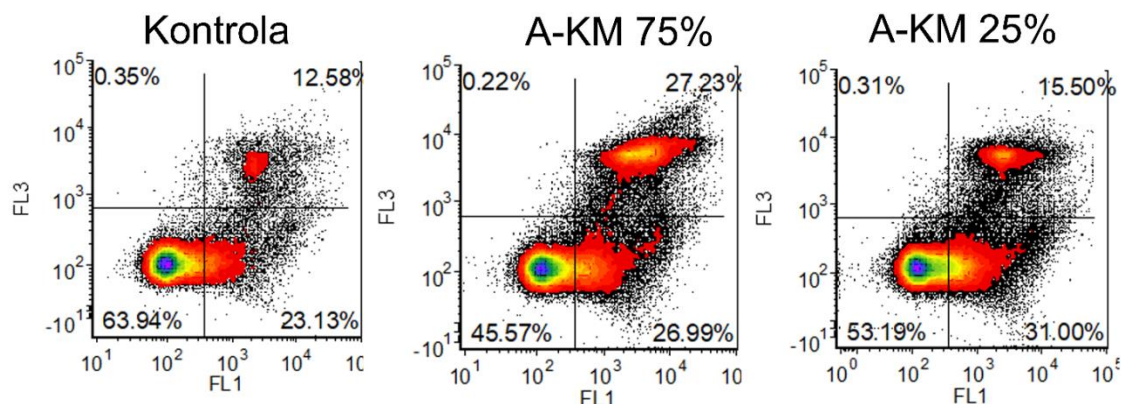
Na grafikonima 7-9 prikazani su rezultati apoptoze i nekroze PL ćelija pod uticajem B-KM i A-KM. Uočava se da su koncentrovani (100%) B-KM indukovali nekrozu ćelija dok su koncentracije od 75% i 50% indukovala apoptozu. Sa druge strane, koncentrovani i 75% A-KM je indukovao apoptozu.



**Grafikon 7.** Efekat kondicioniranih medijuma (KM), pripremljenih od Biodentina (A) i amalgama (B) 24. časa nakon polimerizacije (3 dana kondicioniranje), na apoptozu i nekrozu PL ćelija. Vrednosti su date kao % metaboličke aktivnosti (srednje vrednosti  $\pm$  SD; n=8) izračunate u odnosu na vrednosti kontrolnog svežeg medijuma (SM) uzete kao 100%.; \*=p<0.05; \*\*=p<0.01; \*\*\*=p<0.005 u odnosu na kontrolni kondicionirani medijum (KM) pripremljen od kontrolnog materijala, polistirena.



**Grafikon 8.** Reprezentativni histogrami PL ćelija tretiranih različitim koncentracijama kondicioniranog medijuma (KM) pripremljenog od Biodentina (B). Gornji levi kvadrant predstavljaju primarno nekrotične ćelije, u donjem desnom kvadrantu su ćelije u ranoj apoptozi, u gornjem desnom su ćelije u kasnoj apoptozi/sekundarnoj nekrozi a u donjem levom kvadrantu je prikazan procenat vijabilnih ćelija.



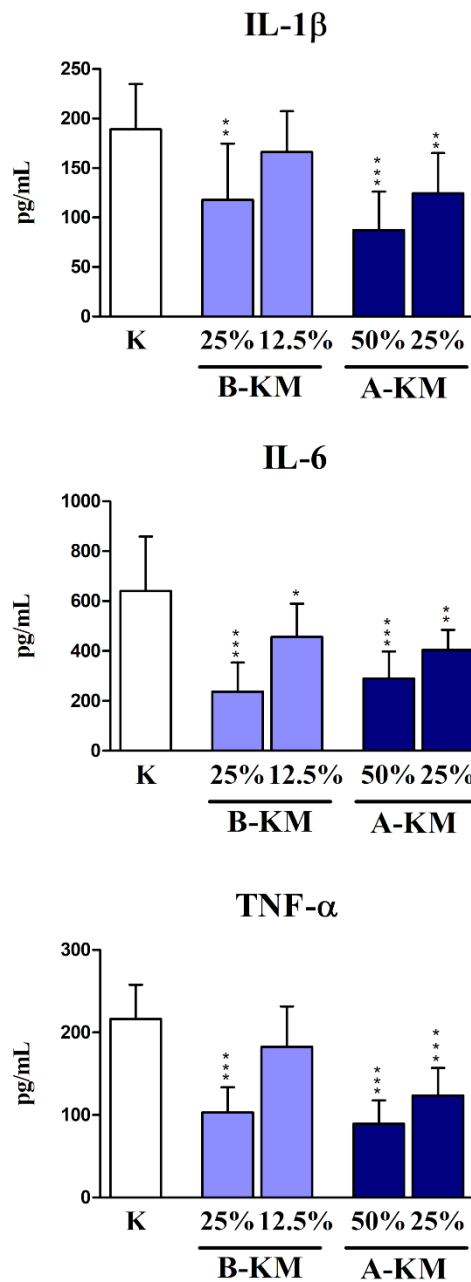
**Grafikon 9.** Reprezentativni histogrami PL ćelija tretiranih različitim koncentracijama kondicioniranog medijuma (KM) pripremljenog od amalgama (A). Gornji levi kvadrant predstavljaju primarno nekrotične ćelije, u donjem desnom kvadrantu su ćelije u ranoj apoptozi, u gornjem desnom su ćelije u kasnoj apoptozi/sekundarnoj nekrozi a u donjem levom kvadrantu je prikazan procenat vijabilnih ćelija.

#### 4.3.3. Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na produkciju pro-inflamacijskih citokina i hemokina od strane PL ćelija u kulturi

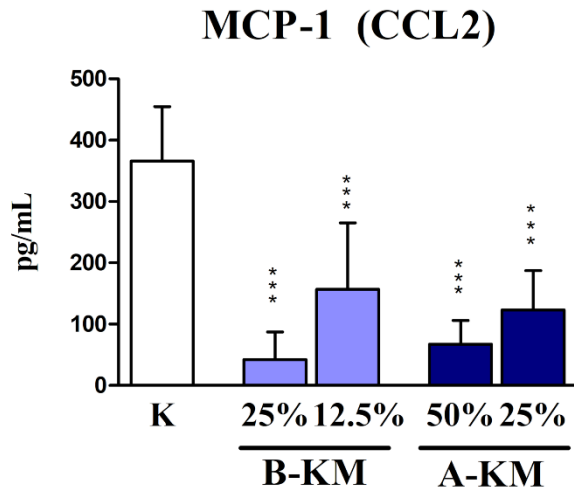
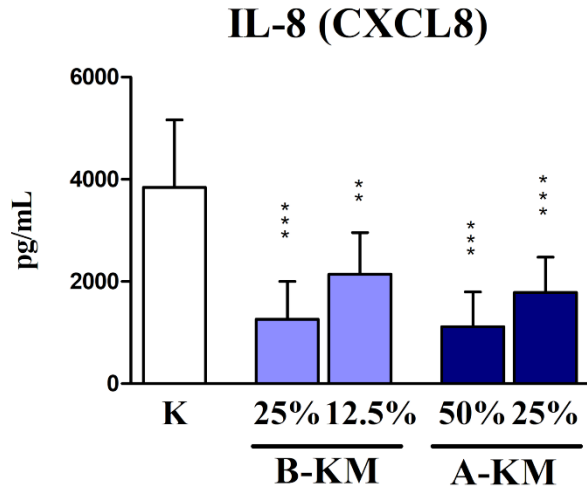
Ključni cilj ovog dela projekta je bio ispivanje bioloških efekta medijuma u kome su ekstrahovane mikročestice i solubilni produkti Biodentina i amalgama a koji nisu citotoksični za PL ćelije. Na osnovu prethodnih rezultata odabrane su koncentracije od 25% i 12.5% B-KM i 50% i 25 % koncentracije A-KM.

Prvo je ispitan i upoređen efekat KM na produkciju pro-inflamacijskih citokina (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) i hemokina (IL-8 and MCP-1) od strane PL ćelija. Rezultati, prikazani na grafikonu 10 pokazuju da obe koncentracije B-KM (25% i 12.5%) inhibiraju produkciju IL-6 na dozno zavisian način ( $p < 0.005$ , odnosno  $p < 0.05$ ) u poređenju sa kontrolnim kulturama. Efekat B-KM na produkciju IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  je bio manje izražen i inhibicija je uočena kod veće koncentracije ( $p < 0.01$ , odnosno  $p < 0.005$ ). Inhibitorni efekat A-KM je bio izraženiji u odnosu na B-KM tako da su obe koncentracije imale supresivni efekat na produkciju sva tri pro-inflamacijska citokina i efekat je takođe bio dozno zavisian. Statistička značajnost razlika u odnosu na kontrolu za sva tri citokina kada su PL ćelijske kulture tretirane sa 50% A-KM i za TNF- $\alpha$  kod 25% A-KM je bila vrlo visoka ( $p < 0.005$ ). Statistički značajna razlika za IL-6 i IL-1 $\beta$  kod manje koncentracije A-KM je bila na nivou  $p < 0.01$ . Kada se međusobno uporede iste koncentracije KM (25%) međusobne razlike nisu bile statistički značajne ( $p > 0.05$ ).

Obe koncentracije B-KM i obe koncentracije A-KM su dovele do statistički visoko značajnog smanjenja nivoa IL-8 i MCP-1 na dozno zavisian način ( $p < 0.005$ ), osim kod manje koncentracije B-KM gde je značajnost razlika u odnosu na kontrolu bila na nivou ( $p < 0.01$ ). Efekat A-KM je bio izraženiji u odnosu na B-KM ali razlika nije bila statistički značajna (Grafikon 11).



**Grafikon 10.** Efekat kondicioniranog medijuma Biodentina (B-KM) i amalgama (A-KM) na produkciju pro-inflamacijskih citokina u kulturi ćelija iz periapexnih lezija. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=8); \*= $p$ <0.05; \*\*= $p$ <0.01; \*\*\*= $p$ <0.005 u poređenju sa kontrolom (K).



**Grafikon 11.** Efekat kondicioniranog medijuma Biodentina (B-KM) i amalgama (A-KM) na produkciju hemokina u kulturi ćelija iz periapexnih lezija. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=8); \*\*= $p < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.005$  u poređenju sa kontrolom (K).

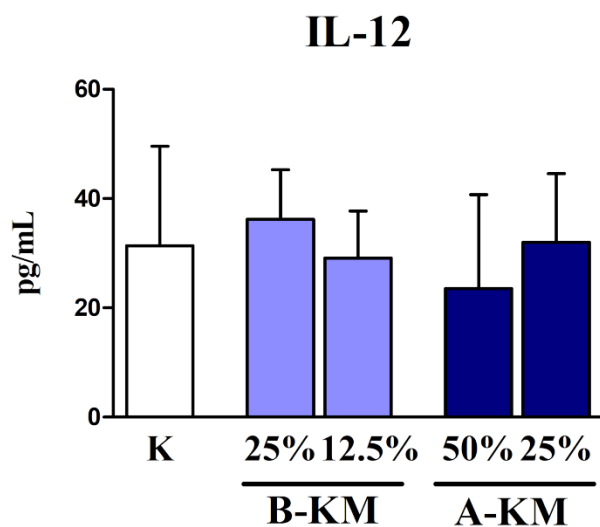
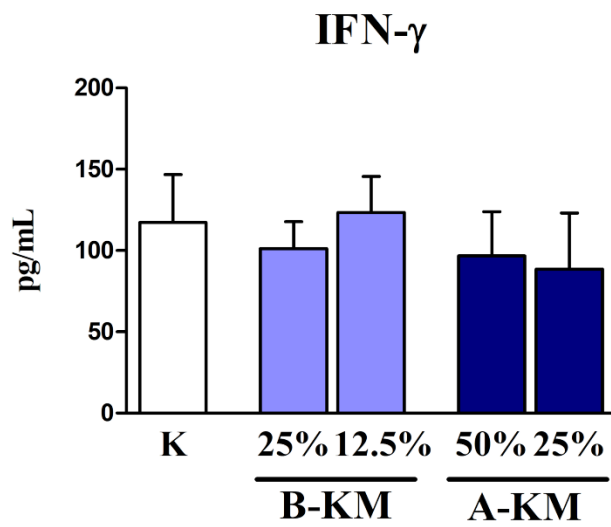
#### **4.3.4. Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na produkciju Th citokina od strane PL ćelija u kulturi**

Ni jedna od koncentracija B-KM i A-KM nije statistički značajno uticala na produkciju IFN- $\gamma$  (ključnog Th1 citokina) ni IL-12 (ključnog citokina koji indukuje diferencijaciju Th1 ćelija) (Grafikon 12).

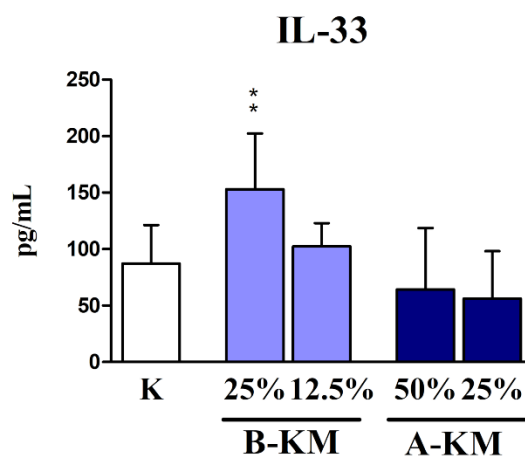
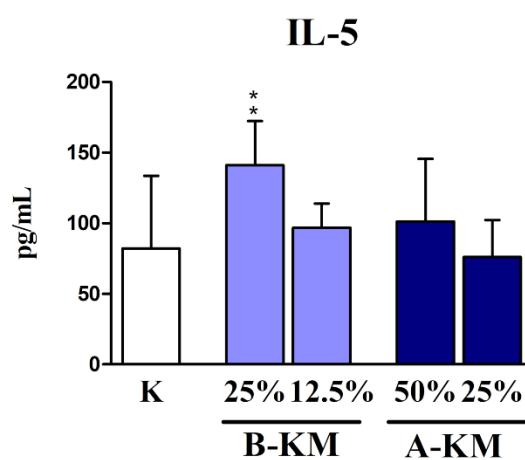
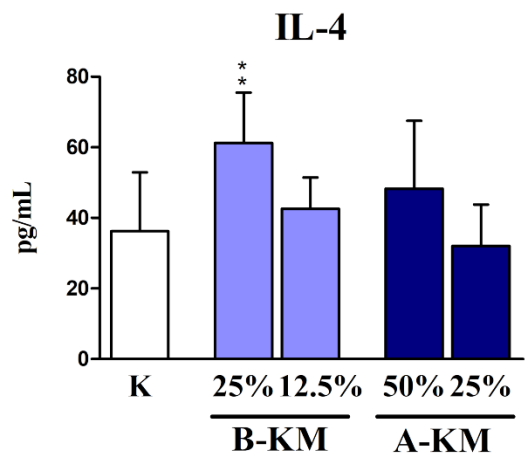
Veće koncentracije (25%) B-KM su dovele do statistički značajnog povećanja Th2 citokina (IL-4 i IL-5) kao i IL-33, citokina koji je značajno povezan sa Th2 funkcijama ( $p < 0.01$ ). Međutim, A-KM ni u jednoj koncentraciji nije statistički značajno menjao produkciju ovih citokina u odnosu na kontrolu (Grafikon 13).

Obe koncentracije B-KM, za razliku od A-KM, su povećale koncentraciju IL-10 u odnosu na kontrolu ( $p < 0.005$ , odnosno  $p < 0.05$ ). Veća koncentracija B-KM je dovela do povećanja produkcije IL-17A ( $p < 0.01$ ) bez značajnog uticaja na produkciju IL-23. Ni jedna od koncentracija A-KM nije bitnije menjala produkciju ova tri citokina (Grafikon 14).

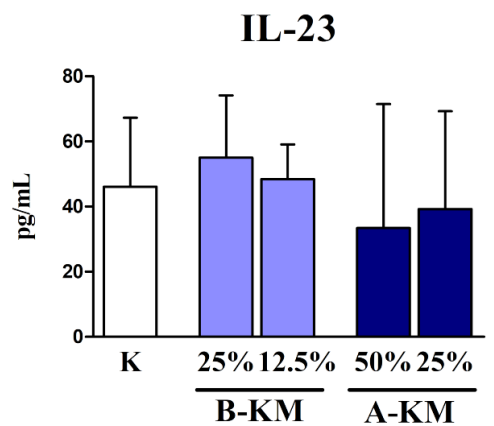
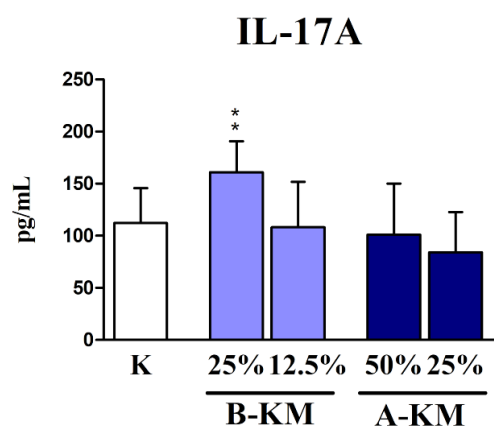
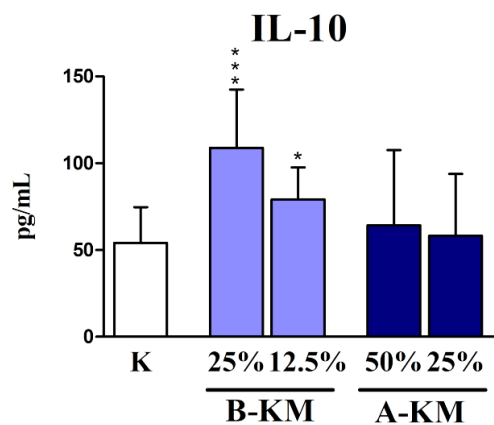




**Grafikon 12.** Efekat kondicioniranog medijuma Biodentina (B-KM) i amalgama (A-KM) na produkciju Th1 citokina u kulturi ćelija iz periapexnih lezija. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=8); Rezultati nisu statistički značajni.



**Grafikon 13.** Efekat kondicioniranog medijuma Biodentina (B-KM) i amalgama (A-KM) na produkciju Th2 citokina u kulturi ćelija iz periapexnih lezija. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=8); \*\*= $p < 0.01$  u poređenju sa kontrolom (K).

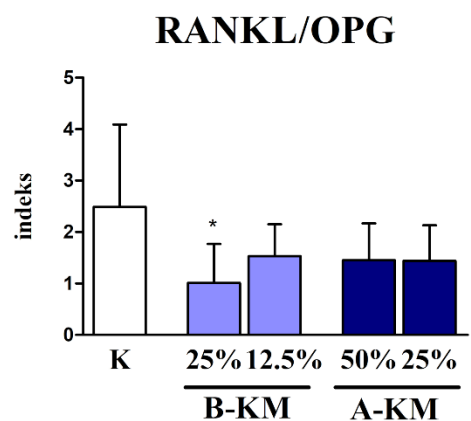
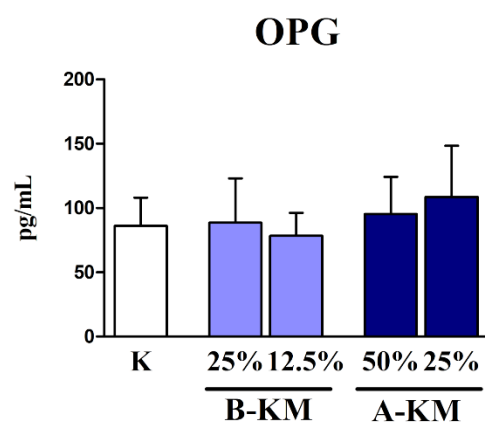
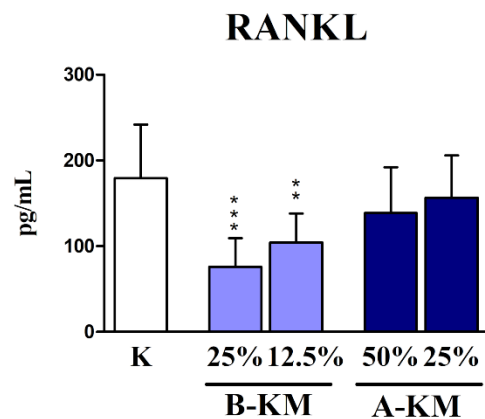


**Grafikon 14.** Efekat kondicioniranog medijuma Biodentina (B-KM) i amalgama (A-KM) na produkciju IL-10, IL-17A i IL-23 u kulturi ćelija iz periapeksnih lezija. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=8); \*\*= $p < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.005$  u poređenju sa kontrolom (K).

#### **4.3.5. Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na produkciju RANKL i OPG od strane PL ćelija u kulturi**

Obe koncentracije B-KM su smanjile nivo RANKL u supernatantima PL ćelijskih kultura, na dozno zavisani način ( $p < 0.005$  odnosno  $p < 0.01$ ), ali bez znatnog uticaja na produkciju OPG. Zbog smanjenja produkcije RANKL došlo je do statistički značajnog smanjenja RANKL/OPG odnosa u kulturama sa 25% B-KM u odnosu na kontrolu ( $p < 0.05$ ). Za razliku od B-KM, A-KM nije bitnije modifikovao produkciju RANKL i OPG, niti je bitnije menjao njihov odnos (Grafikon 15).

Na osnovu prikazanih rezultata se može zaključiti da ekstrakti Biodentina i amalgama u većim koncentracijama ispoljavaju citotoksični efekat na PL ćelije u kulturi, pri čemu je efekat Biodentina izraženiji. Necitotoksične koncentracije ekstrakta oba materijala ispoljavaju snažno anti-inflamacijsko dejstvo, procenjivano na osnovu smanjenja koncentracija IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 i MCP-1. U istim koncentracijama ekstrakt Biodentina pokazuje imunomodulacijski efekat, dovodeći do povećanja produkcije IL-10, Th2 citokina i IL-17A, a bez bitnijeg uticaja na Th1 citokine. Biodentin ispoljava osteoprotektivno svojstvo koje se manifestuje smanjenjem produkcije RANKL i odnosa RANKL/OPG. Za razliku od Biodentina, ekstrakt amalgama nema imunomodulacijsko svojstvo niti bitnije utiče na produkciju osteolititičkih i osteoprotektivnih medijatora.



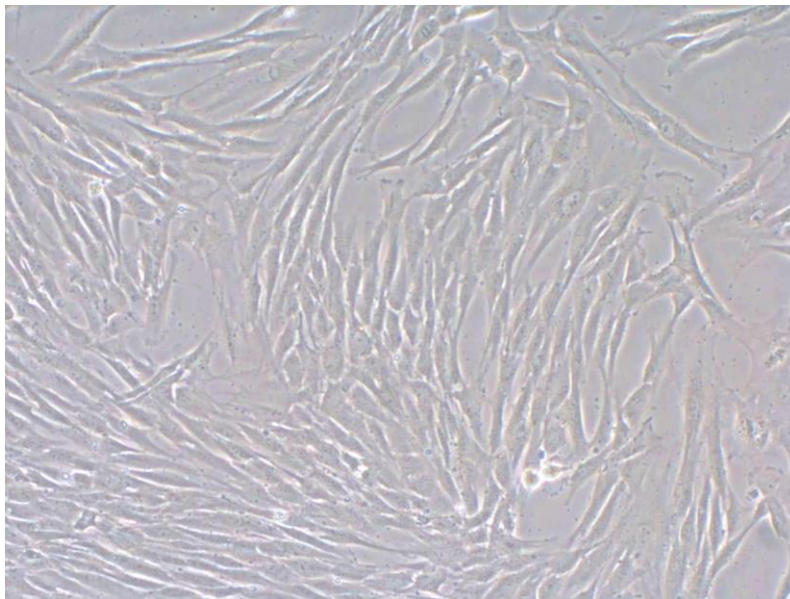
**Grafikon 15.** Efekat kondicioniranog medijuma Biodentina i amalgama na produkciju RANKL, OPG i na njihov odnos u kulturama PL ćelija. \*= $p < 0.05$ ; \*\*= $p < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.005$  u poređenju sa kontrolom (K).

#### **4.4. Eksperimentalna studija. Deo III: Uticaj kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na osteogenu diferencijaciju mezenhimskih stromalnih matičnih ćelija uspostavljenih iz periapeksnih lezija**

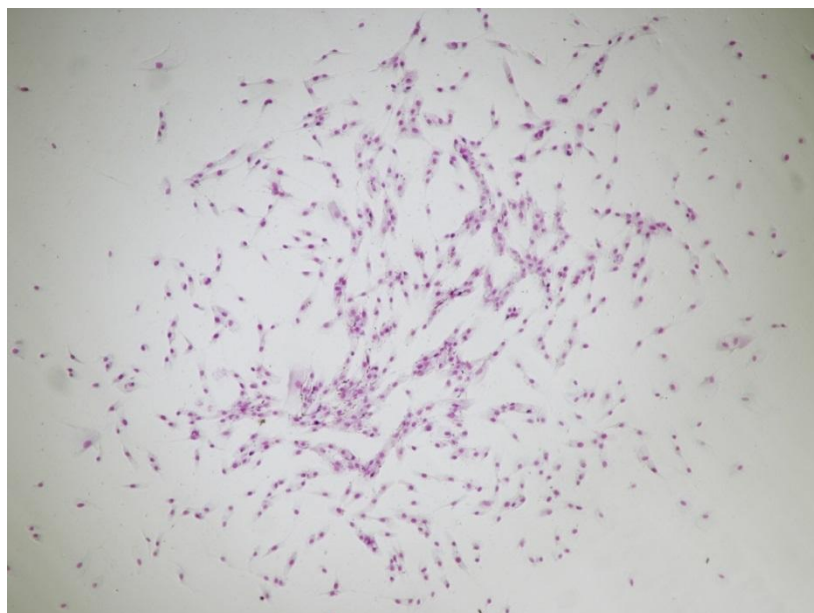
##### **4.4.1. Uspostavljanje PL-MSC kultura**

U okviru ovog projekta uspostavljene su tri PL-MSC ćelijske linije iz tri različite asimptomatske PL. Svaka od njih je analizirana u pogledu klonogenosti, rasta u kulturi i praćenja morfoloških karakteristika u kulturi tokom pasažiranja. Posle 4 pasaže urađen je fenotipski profil i sposobnost diferencijacije u osteoblaste, hondroblaste i adipocite. Jedna ćelijska linija je korišćena za ispitivanje citotoksičnosti KM Biodentina i amalgama. Dve ćelijske linije su korišćene za procenu uticaja KM na osteoblastnu diferencijaciju.

Kao što je prikazano na slici 6, PL-MSC su imale fibroblastoidni izgled, tipičan za MSC iz drugih tkiva. Takođe su imale klonogeni potencijal, tj sposobnost formiranja CSU kolonija, kao što je prikazano na slici 7.



**Slika 6.** Fibroblastoidni izgled PL-MSC linije u kulturi. Invertna mikroskopija. Originalno uvećanje: x 100.



**Slika 7.** Morfološki izgled jedne kolonije (CFU) iz kulture PL-MSC (treća pasaža) obojene sa hematoksilin-eozinom. Originalno uvećanje: x 100.

#### **4.4.2. Fenotipska analiza PL-MSC**

Fenotipske karakteristike PL-MSC, objedinjene iz sve tri linije su prikazane u Tabeli 14 a histogrami fluorescence jedne od linija su prikazani na grafikonu 16.

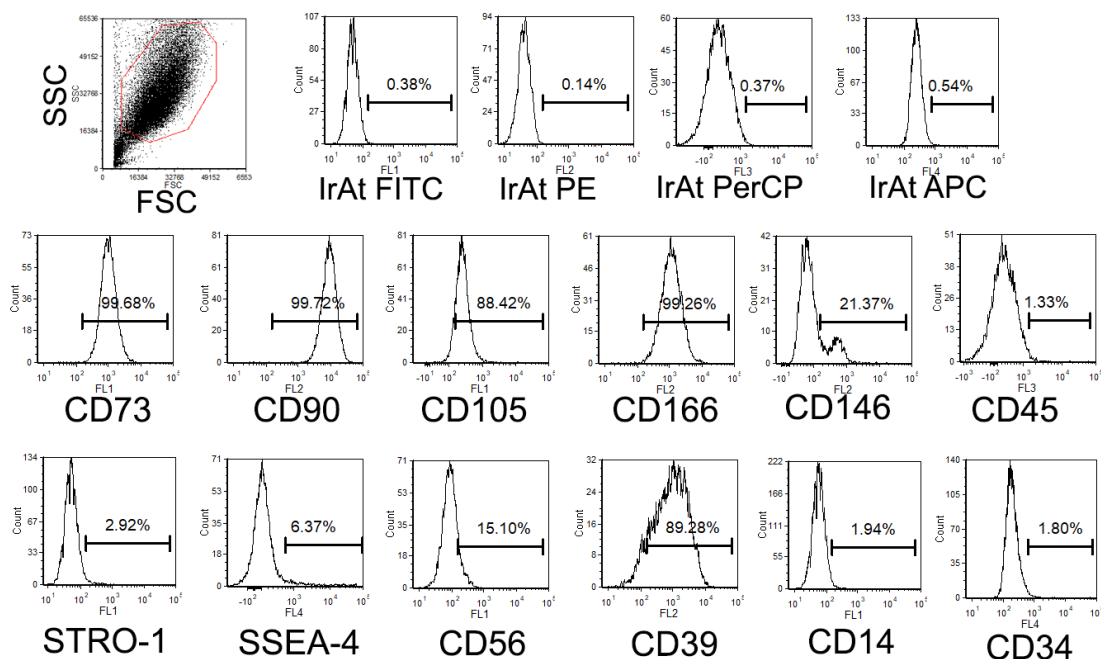
Uvidom u prikazane rezultate može se uočiti da su sve ćelije u okviru PL-MSC linija ispoljavale CD73, CD90 i CD 166, oko 90% ćelija je bilo pozitivno na CD105 i CD39. Znatno manji procenat ćelija je ispoljavao CD146 ( $28.18 \pm 6.25$ ) i CD56 ( $20.04 \pm 4.88$ ). Najmanja pozitivnost je detektovana korišćenjem antitela za STRO-1 ( $8.06 \pm 4.60$ ) i SSEA4 ( $12.12 \pm 5.56$ ). Shodno očekivanju, PL-MSC nisu ispoljavale markere hematopoetskih matičnih ćelija (CD34), ukupnih hematopoetskih ćelija (CD45), monocita (CD14), T limfocita (CD3) i B limfocita (CD19), pošto pozitivnost za ove markere nije prelazila 2%.

**Tabela 14.** Fenotipska analiza PL-MSK

Markeri	% pozitivnih ćelija
CD73	99.43 ± 0.34
CD90	99.52 ± 0.30
CD105	91.23 ± 3.24
CD166	99.02 ± 0.28
CD39	90.50 ± 3.64
CD146	28.18 ± 6.25
CD56	20.04 ± 4.88
SRTR0-1	8.06 ± 4.60
SSEA4	12.12 ± 5.56
CD45	1.12 ± 0.46
CD34	1.24 ± 0.37
CD14	1.50 ± 0.24
CD3	0.54 ± 0.14
CD19	0.48 ± 0.22

Fenotipska analiza PL-MSK ćelijske linije posle 4 pasaže u kulturi je urađena kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti % pozitivnih ćelija tri različite PL-MSK ćelijske linije ± SD.

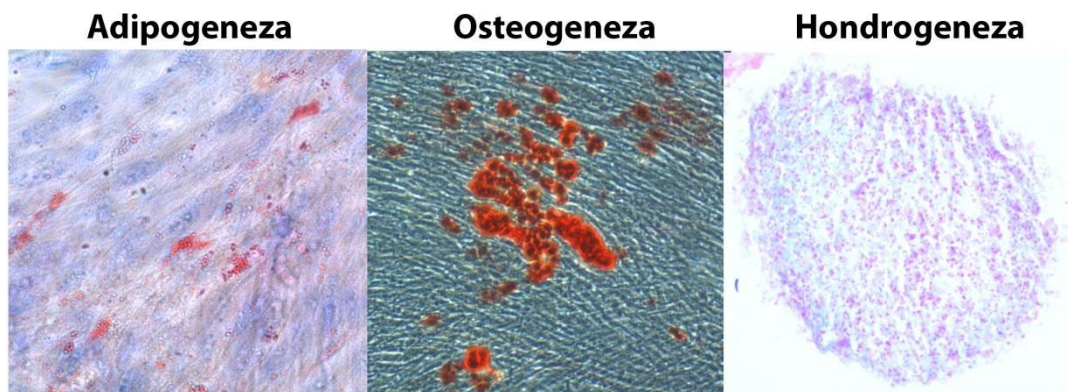




**Grafikon 16.** Prikaz histograma fluorescencije jedne od 3 PL-MSC linije. Prikazani su % pozitivnih ćelija nakon obeležavanja sa specifičnim monoklonskim antitelima obeleženih fluoro-hromima u okviru označenog FSC/SSC profila analiziranih ćelija. Graničnici označavaju nivo specifične fluorescencije a postavljeni su na osnovu kontrola sa odgovarajućim irelevantnim monoklonskim antitelima (IrAt).

#### 4.4.3. Osteoblastogena, hondrogena i adipogena diferencijacija PL-MSC

Sve tri PL-MSC linije su imale sposobnost diferencijacije u osteoblaste, hondroblaste i adipocite nakon kultivacije u odgovarajućim medijumima za indukciju specifične ćelijske diferencijacije. Ćelije su pokazivale veći potencijal diferencijacije u osteoblaste i hondroblaste u odnosu na adipocite. Histo-hemijski izgled odgovarajućih kultura je prikazan na slici 8.



**Slika 8.** Potencijal diferencijacije PL-MSC u adipocite, osteoblaste i hondrocite

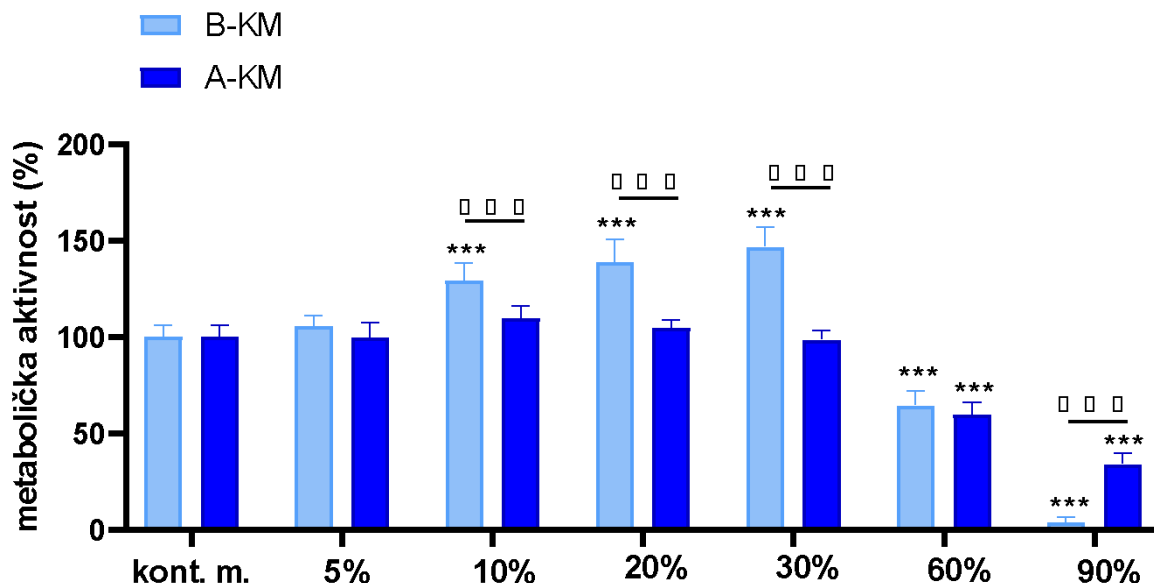
PL-MSC su kultivisane u selektivnim medijumima za adipogenezu, osteogenezu i hondrogenezu nakon četvrte pasaže u kulturi. Prikazane su reprezentativne slike adipogeneze, osteogeneze i hondrogeneze jedne od tri ćelijskih linija.

Na osnovu navedenih morfoloških karakteristika, sposobnosti formiranja kolonija, fenotipskih karakteristika i diferencijacionog potencijala u gore navedene ćelijske linije PL-MSC su zadovoljavale i više od minimalnih kriterijuma za definisanje matičnosti a koji su definisani od strane Dominici i sar. (185).

#### **4.4.4. Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na citotoksičnost i proliferativna svojstva PL-MSC**

U okviru ovog dela eksperimentalne studije ispitivanja KM na PL-MSC bilo je neophodno proveriti njihovu citotoksičnost kako bi se u daljim ispitivanjima koristile necitotoksične koncentracije KM. Priprema ukupnih KM od Biodentina i kontrolnog amalgama je bila ista kao i u prethodnim eksperimentima s tim što je kondicioniranje vršeno u bazalnom medijumu za kultivaciju PL-MSC ( $\alpha$ MEM + 10%FCS).

Citotoksičnost je procenjivana na osnovu MTT testa a rezultati su prikazani na grafikonu 17. Uočava se da veće koncentracije B-KM (90% i 60%) smanjuju vijabilnost PL-MSC na dozno zavisani način, slično kao i iste koncentracije A-KM. Međutim, veća koncentracija B-KM je ispoljavala snažniji inhibicioni efekat u odnosu na A-KM zbog indukcije ćelijske smrti obzirom da u tim kulturama nije nađena ni jedna vijabilna ćelija nakon bojenja sa 1% rastvorom Tripan plavog. U odgovarajućim kontrolnim kulturama sa A-KM, PL-MSC su ostale vijabilne ali je njihov rast bio usporen. Manje koncentracije B-KM (30%, 20% i 10%) su stimulisale metaboličku aktivnost ćelija, za razliku od istih koncentracija A-KM koje nisu bitnije menjale MTT aktivnost.

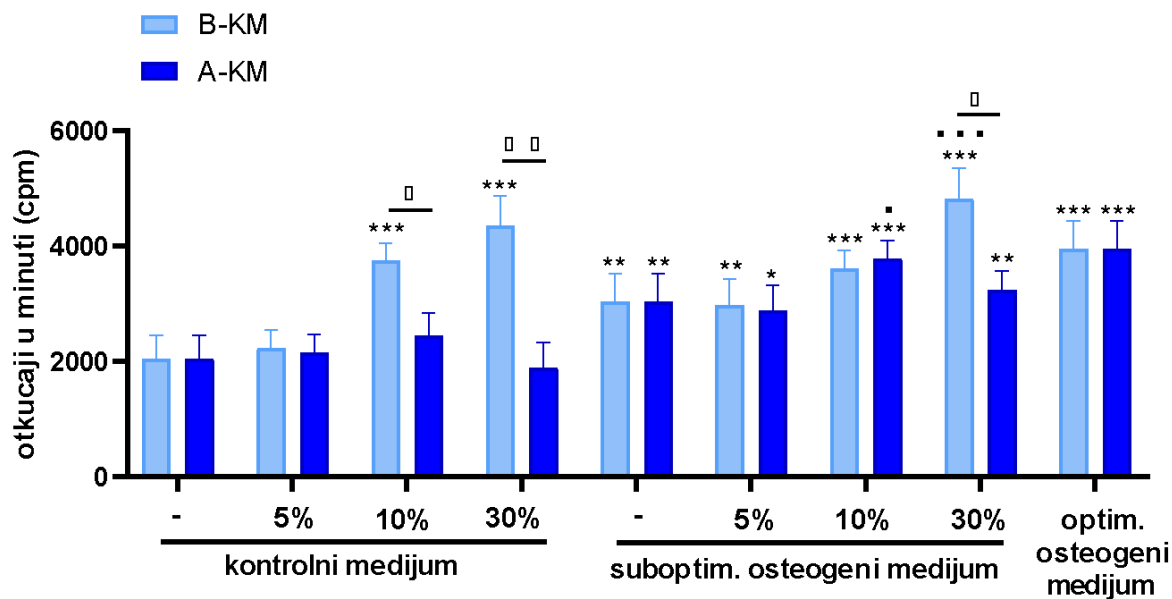


**Grafikon 17.** Efekat KM Biodentina i amalgama na metaboličku aktivnost PL-MSC. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=6); \*\*\*= $p < 0.005$  u poređenju sa kontrolom (K). Tri trougla =  $p < 0.005$  u odnosu na odgovarajuću koncentraciju amalgama.

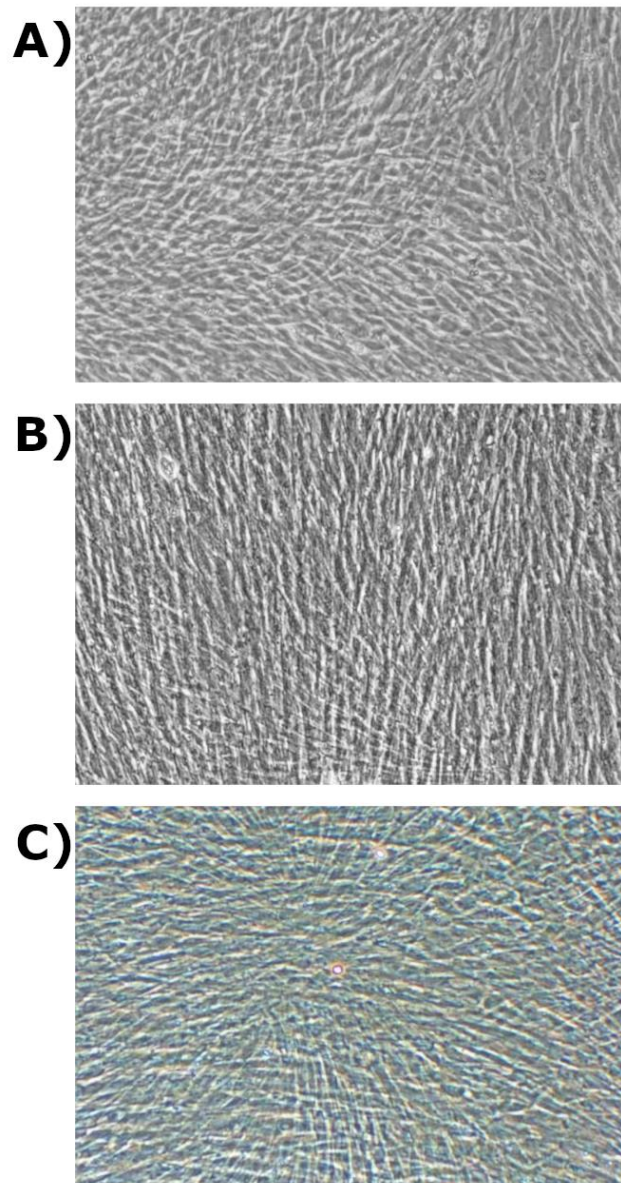
Povećana metabolička aktivnost PL-MSC u prisustvu manjih koncentracija B-KM (30% i 10%), za razliku od istih koncentracija A-KM, je bila posledica povećane proliferacije ćelija što je dodatno potvrđeno primenom senzitivnog eseja sa radioaktivnim  $^3\text{H}$  timidinom (Grafikon 18). Međutim, ta razlika se nije mogla jasno uočiti posmatranjem kultura pod invertnim mikroskopom (slika 9).

U proliferativnom eseju, koji je trajao 7 dana, korišćene su i dve dodatne kontrole kako bi dobijeni rezultati bili komparabilni sa istom eksperimentalnom postavkom kod osteoblastogene diferencijacije PL-MSC. Dodatna kontrola su bile PL-MSC kultivisane u suboptimalnom (30%) medijumu za osteoindukciju (SOM) a pozitivna kontrola su bile PL-MSC kultivisane u kompletnom (100%), optimalnom osteoinduktivnom medijumu (OOM).

Kao što se sa grafikona 18 uočava osteogeni medijumi su na dozno zavisian način stimulisali proliferaciju PL-MSC ćelija. Veća koncentracija B-KM ( $p < 0.005$ ) i manja koncentracija A-KM ( $p < 0.05$ ) su stimulisale proliferaciju PL-MSC u SOM kulturama.



**Grafikon 18.** Efekat KM Biodentina i amalgama na proliferativnu aktivnost PL-MSK. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=6); \*= $p$ <0.05; \*\*= $p$ <0.01; \*\*\*= $p$ <0.005 u poređenju sa kontrolom (K). Jedan trougao =  $p$ <0.05; Dva trougla =  $p$ <0.01 u odnosu na odgovarajuće koncentracije KM amalgama. Jedan kvadrat =  $p$ <0.05; tri kvadrata =  $p$ <0.005 u odnosu na kontrolni suboptimalni medijum.



**Slika 9.** Morfološki izgled PL-MSC u kulturama; A) Kontrola; B) 30% B-KM; C) 30% A-KM. Invertni mikroskop. Uvećanja x 100.

#### **4.4.5. Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na osteogenu diferencijaciju PL-MSC procenjivanu na osnovu bojenja sa Alizarin crvenim**

Na osnovu prethodnih rezultata odabrano je da u modelu modulacijskog efekta KM na indukciju osteoblastne diferencijacije budu kulture dve ćelijske linije PL-MSC kultivisane u bazalnom medijumu (BM) za MSC, SOM i OOM (pozitivna kontrola). Odabrane su dve koncentracije KM Biodentina i amalgama (30% i 10%). Čelije su kultivisane u toku 21 dan na providnim plastičnim diskovima postavljenih u bazene ploča od 24 bazena, nakon čega su kulture obojene Alizarin

crvenim, a analiza mineralizacije je procenjena semikvantitativno kako je opisano u Poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani u Tabeli 15 i potkrepljeni kolažom fotografija (slike 10 i 11).

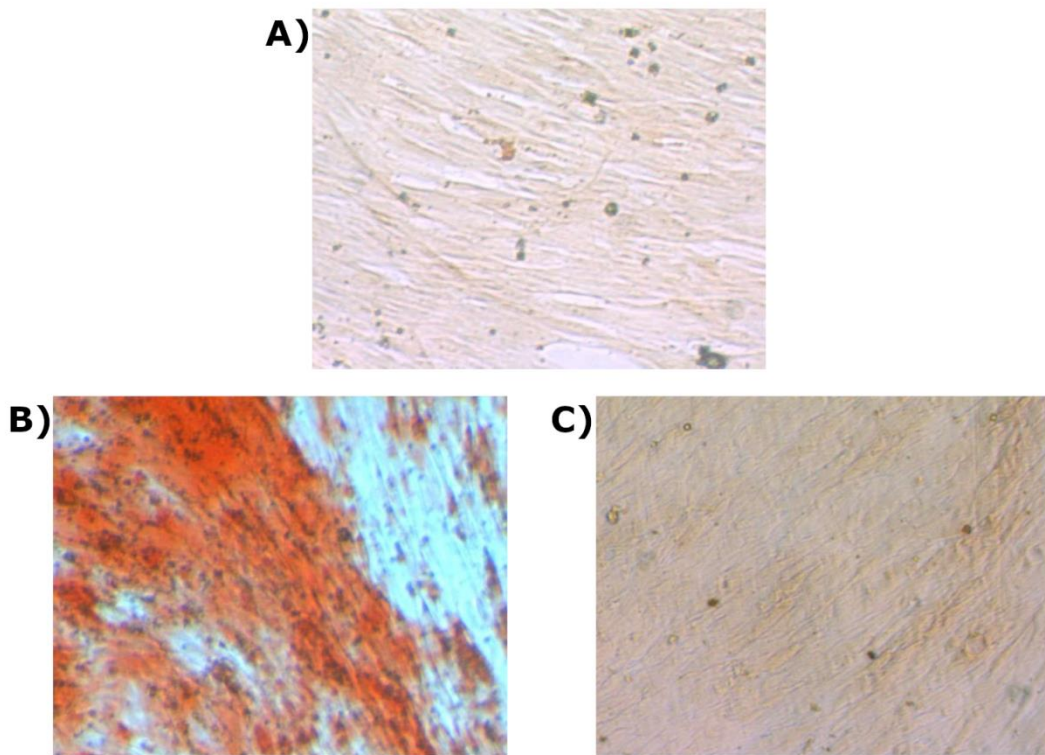
Sam BM nije dovodio do osteoblastne indukcije. Sa druge strane, 30% B-KM je indukovao snažnu mineralizaciju u PL-MSK kulturama u BM, koja je po stepenu efikasnosti bila slična efektu OOM. Efekat 30% B-KM je bio dodatno izraženiji u SOM kulturama. Manja koncentracija B-KM nije imala bitnijeg uticaja na mineralizaciju u kulturama sa BM i neznatno je povećala mineralizaciju u SOM kulturama. Za razliku od B-KM, ni jedna koncentracija A-KM nije indukovala osteoblastnu diferencijaciju u kulturama sa BM, niti je bitnije modulirala mineralizaciju u SOM kulturama.

**Tabela 15.** Uticaj kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na osteogenu diferencijaciju procenjivanu na osnovu bojenja sa Alizarin crvenim.

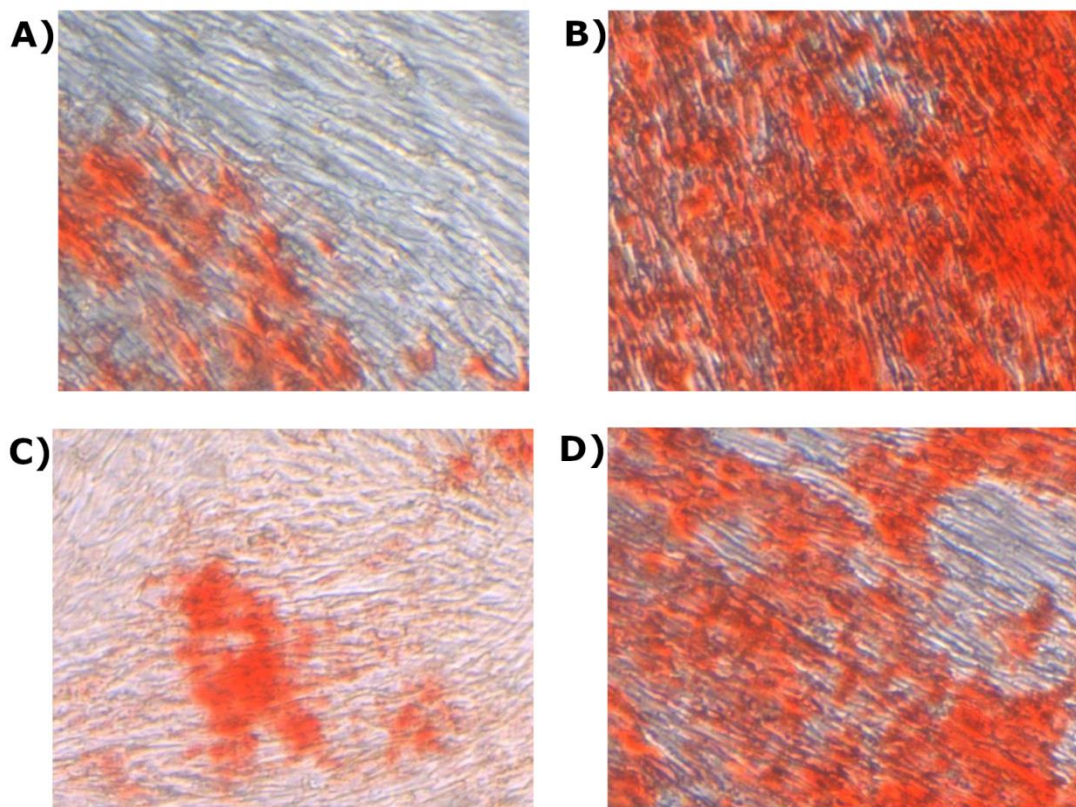
Uslovi kultivisanja PL-MSK	Indeks mineralizacije
Bazalni medijum-negativna kontrola	0.00 ± 0.00
Bazalni medijum + 10% B-KM	0.16 ± 0.00
Bazalni medijum + 30% B-KM	3.16 ± 0.37 * #
Bazalni medijum + 10% A-KM	0.00 ± 0.00
Bazalni medijum + 30% A- KM	0.00 ± 0.00
SOM-kontrola	1.66 ± 0.47
SOM + 10% B-KM	1.83 ± 0.37
SOM + 30% B-KM	3.66 ± 0.47 • Δ
SOM + 10% A-KM	1.50 ± 0.50
SOM + 30% A- KM	1.66 ± 0.47
OOM-pozitivna kontrola	3.50 ± 0.50*

PL-MSK su kultivisane u bazalnom medijumu za MSC (negativna kontrola), suboptimalnom osteogenom medijumu (SOM: 70% bazalni medijum + 30% osteogeni medijum) sa ili bez dodatka 10% i 30% kondicioniranog medijuma (KM) Biodentina (B), odnosno amalgama (A) na plastičnim providnim diskovima (dijametra 10 mm, promera 0.4 mm). Posle 21 dana kultivacije diskovi su obojene pomoću Alizarin crvenog. Brojevi predstavljaju srednje vrednosti indeksa mineralizacije ± SD (n=6; triplikati kultura iz dva eksperimenta).

\*=p<0.001 u odnosu na negativnu kontrolu; •=p<0.001 u odnosu na SOM-kontrolu; #=p<0.001 u odnosu na odgovarajući A-KM (bazalni medijum +30%A-KM); Δ=p<0.001 u odnosu na odgovarajući A-KM (SOM+30%A-KM).



**Slika 10.** Kolaž fotografija koji prikazuju efekat kondicioniranog medijuma Biodentina (B) i amalgama (C) na osteogenu diferencijaciju PL-MSC u bazalnom medijumu. Zapaža se izrazita indukcija formiranja mineralizovanih jezgara pod uticajem B-KM i odsustvo mineralizacije u prisustvu A-KM koja je slična kao u kontroli (A).



**Slika 11.** Kolaž fotografija koji prikazuju efekat kondicioniranog medijuma Biodentina (B) i amalgama (C) na osteogenu diferencijaciju PL-MSC u suboptimalnom osteogenom medijumu. Slika A predstavlja mineralizaciju u kontrolnom suboptimalnom osteogenom medijumu u kome je deponovanje Ca značajno manje u poređenju sa potpunim osteogenim medijumom (D). Zapaža se potencijacija indukcija formiranja mineralizovanih jezgara pod uticajem B-KM, koja je veća nego u kontrolama A i D i odsustvo podsticanja mineralizacije u prisustvu A-KM koja je slična kao u kontroli (A).

#### **4.4.6. Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na osteogenu diferencijaciju PL-MSC procenivanu na osnovu ekspresije transkripcionih faktora RUNX2, SP7 i WNT2**

Glavni cilj ovog dela eksperimentalne studije je bio ispitivanje uticaja KM Biodentina na ekspresiju gena koji su uključeni u procese osteoblastne diferencijacije PL-MSC i sa tim u vezi najznačajnijih funkcija osteoblasta. Odabrana su dva termina za procenu genske ekspresije na osnovu analize mRNA pomoću RT-PCR: rana faza, posle 7 dana osteoindukcije i kasna faza, 16. dana osteoindukcije, na osnovu podataka u literaturi da se ekspresija pojedinih gena značajno menja tokom procesa osteoblastne diferencijacije. Promena u ekspresiji je ocenjivana deskriptivno kao izrazito povećanje kada je faktor povećanja (f.p.) u odnosu na ekspresiju datog gena u kontrolnom BM, koja je normalizovana na indeks 1 bio veći od 5 puta; umereno povećanje (f.p.



između 2.5 i 5) i blago povećanje (f.p.do 2.5 puta). Slična gradacija se odnosila na smanjenje genske ekspresije.

Prvi set gena je uključivao ispitivanje ekspresije *RUNX2*, *SP7* i *WNT2* gena. Ovi geni su odabrani na osnovu podataka da je *RUNX2* glavni osteoblastni transkripcioni faktor koji, između ostalog, stimuliše ekspresiju Osterixa (*SP7*). Ovi faktori zajedno sa *WNT2/β* kateninskim signalnim putem indukuju diferencijaciju MSC u nezrele osteoblaste i blokiraju diferencijaciju MSC u hondroblaste.

Rezultati su prikazani na grafikonima 19, 20 i 21. Kada su PL-MSC kultivisane u OOM (pozitivna kontrola), veoma izrazito povećanje ekspresije *RUNX2* ( $44.6 \pm 8.5$  f.p.) (Grafikon 19), umereno povećanje ekspresije *SP7* ( $4.64 \pm 0.50$  f.p.) (Grafikon 20) i *WNT2* ( $2.64 \pm 0.34$  f.p.) (Grafikon 21) je detektovano u ranoj fazi diferencijacije. U kasnoj fazi diferencijacije, ekspresija *RUNX2* i *SP7* je bila značajno smanjena ( $16.3 \pm 3.2$  f.p. odnosno  $2.60 \pm 0.32$  f.p.) u odnosu na ranu fazu ili u potpunosti blokirana (*WNT2*).

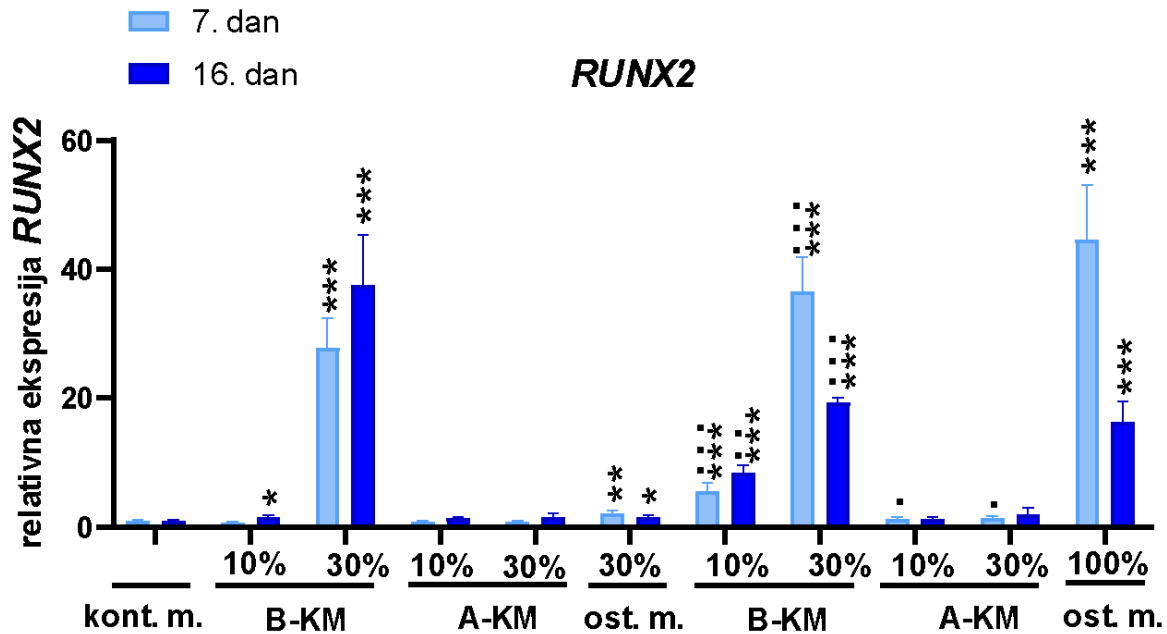
U PL-MSC kulturama sa SOM došlo je do blagog povećanja *RUNX2* ekspresije ( $2.11 \pm 0.4$  f.p.) i *SP7* ( $1.59 \pm 0.31$  f.p.) u ranoj fazi osteoblastogene diferencijacije dok se ekspresija *WNT2* nije bitnije menjala. U kasnijoj fazi ekspresija *RUNX2* i *WNT2* se smanjivala u odnosu na kontrolu (Grafikoni 19, 20 i 21).

Veća koncentracija B-KM (30%) je snažno stimulisala ekspresiju *RUNX2* u ranoj fazi PL-MSC kultura u BM ( $27.8 \pm 4.6$  f.p.) i potencirala ekspresiju *RUNX2* u SOM kulturama ( $36.6 \pm 5.3$  f.p.) (Grafikon 19). Ekspresija *SP7* je bila umereno povećana u oba tipa PL-MSC kultura ( $2.64 \pm 0.34$  f.p. odnosno  $2.52 \pm 0.36$  f.p.) (Grafikon 20). Za razliku od kultura bez B-KM, ekspresija oba ova gena se dalje povećavala u kasnoj fazi osteoblastne diferencijacije u BM ( $37.5 \pm 7.9$  f.p. odnosno  $2.92 \pm 0.42$  f.p.). Međutim, suprotan efekat je zabeležen u SOM kulturama: smanjenje ekspresije *RUNX2* od  $36.6 \pm 5.3$  f.p u ranoj fazi diferencijacije na  $19.3 \pm 0.81$  f.p. u kasnoj fazi diferencijacije (Grafikon 19). Smanjenje ekspresije *SP7* je bilo znatno manje: od  $2.52 \pm 0.36$  f.p. u ranoj fazi na  $2.26 \pm 0.18$  f. p. u kasnoj fazi (Grafikon 20).

Manja koncentracija B-KM je imala značajno manji modulacijski efekat. U BM kulturama zabeleženo je blago povećanje ekspresije *RUNX2* i to samo u kasnoj fazi. Povećanje ekspresije ovog gena u SOM kulturama je bilo izraženije u odnosu na BM kulture ( $5.62 \pm 1.2$  f.p. - rana faza;  $8.42 \pm 1.2$  f.p. - kasna faza) (Grafikon 19). Sa druge strane, nije nađena bitnija modulacija ekspresije *SP7* nezavisno od uslova kultivacije (Grafikon 20).

Ekspresija *WNT2* je bila značajno smanjena u BM kulturama u obe faze osteoblastne diferencijacije u prisustvu B-KM. Veća koncentracija je imala izraženiji inhibitorni efekat u ranoj fazi dok je manja koncentracija imala veći efekat u kasnijoj fazi (Grafikon 21).

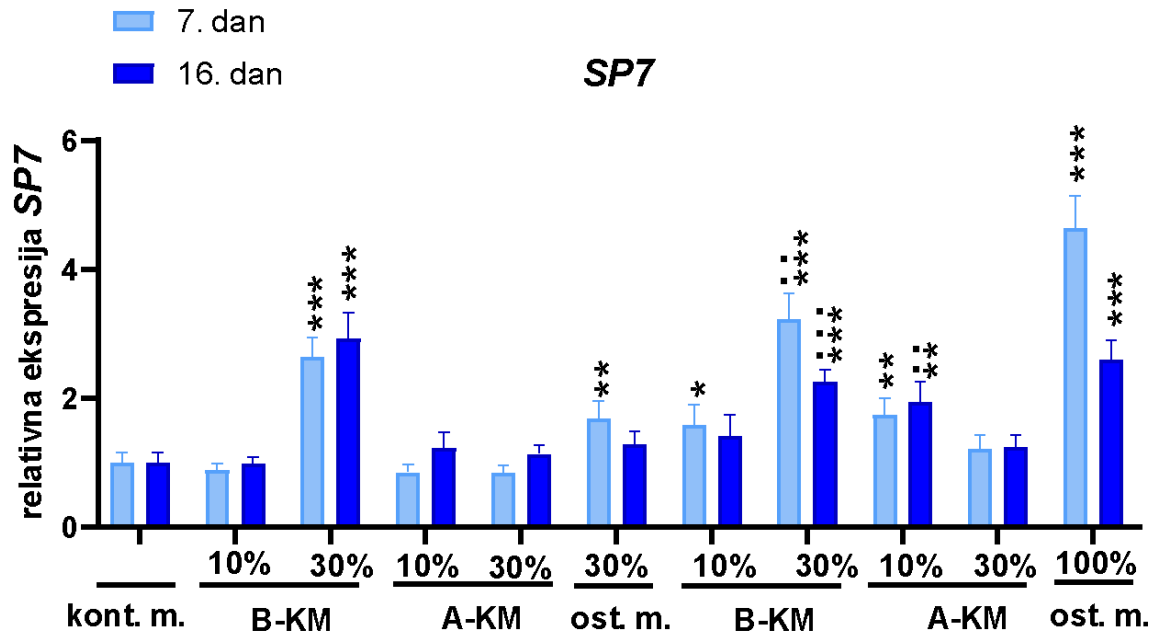
A-KM nije pokazivao modulacijski efekat na ekspresiju ovih gena u BM kulturama, osim smanjenja ekspresije *WNT2* u kasnoj fazi ( $0.37 \pm 0.12$  f.p.). Međutim, obe koncentracije A-KM su inhibirale ekspresiju *RUNX2* u SOM kulturama. Pod istim uslovima, manja koncentracija A-KM je blago povećavala ekspresiju *SP7* u kasnoj fazi a *WNT2* u obe faze (Grafikoni 19, 20, 21).



**Grafikon 19.** Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na ekspresiju *RUNX2* u PL-MSK tokom osteoblastne diferencijacije.

Rezultati su prikazani kao relativna genska ekspresija u odnosu na kontrolu (PL-MSK kultivisanih u kontrolnom bazalnom medijumu za MSC) gde je bazalna ekspresija normalizovana na indeks 1, kako je opisano u poglavlju Materijal i metode.

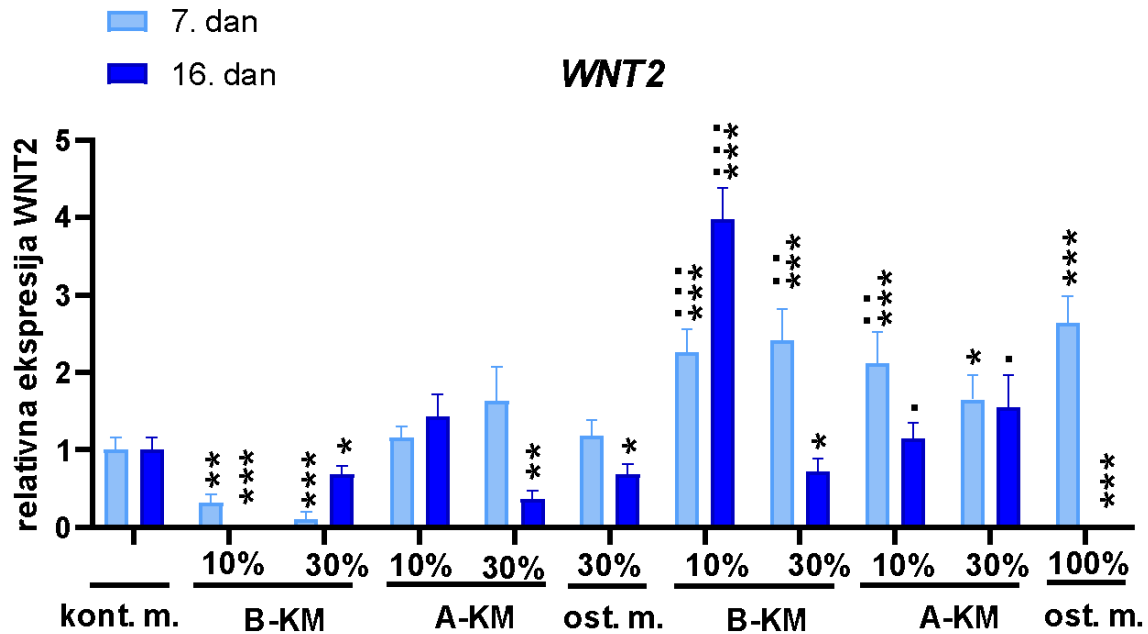
\*= $p < 0.05$ ; \*\*= $P < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.001$  u odnosu na kontrolu. ■= $p < 0.05$ ; ■■= $p < 0.01$ ; ■■■= $p < 0.001$  u odnosu na suboptimalni (30%) osteogeni medijum.



**Grafikon 20.** Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na ekspresiju *SP7* u PL-*MSC* tokom osteoblastne diferencijacije.

Rezultati su prikazani kao relativna genska ekspresija u odnosu na kontrolu (PL-*MSC* kultivisanih u kontrolnom bazalnom medijumu za *MSC*) gde je bazalna ekspresija normalizovana na indeks 1, kako je opisano u poglavlju Materijal i metode.

\*= $p < 0.05$ ; \*\*= $P < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.001$  u odnosu na kontrolu. ■= $p < 0.05$ ; ■■= $p < 0.01$ ; u odnosu na suboptimalni (30%) osteogeni medijum.



**Grafikon 21.** Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na ekspresiju *WNT2* u PL-MSK tokom osteoblastne diferencijacije.

Rezultati su prikazani kao relativna genska ekspresija u odnosu na kontrolu (PL-MSK kultivisanih u kontrolnom bazalnom medijumu za MSC) gde je bazalna ekspresija normalizovana na indeks 1, kako je opisano u poglavlju Materijal i metode.

\*= $p < 0.05$ ; \*\*= $P < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.001$  u odnosu na kontrolu. ◻= $p < 0.05$ ; ◻◻= $p < 0.01$ ; ◻◻◻= $p < 0.001$  u odnosu na suboptimalni (30%) osteogeni medijum.

#### 4.4.7. Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na osteogenu diferencijaciju PL-MSC procenjivanu na osnovu ekspresije gena matriksne mineralizacije, BGLAP, COL1A1 i ALP

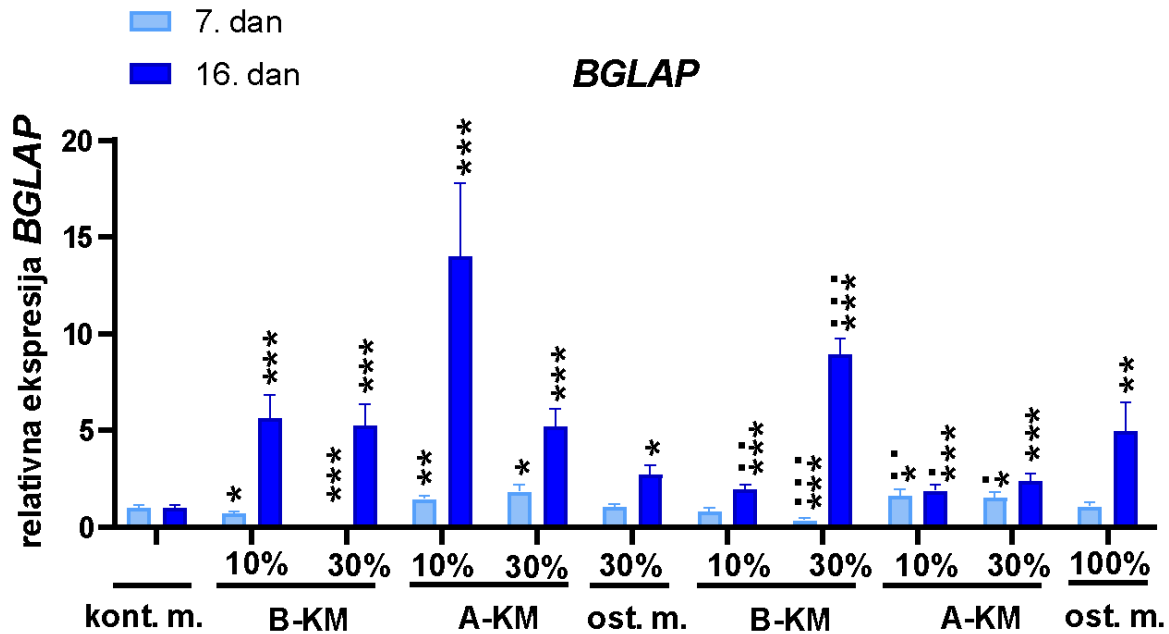
Analiza tri gena koji su povezani sa mineralizacijom matriksa u toku osteoblastne diferencijacije PL-MSC (*BGLAP*, *COL1A1* i *ALP*) je prikazana na grafikonima 22, 23 i 24.

U kontrolnim medijumima za osteogenu diferencijaciju *BGLAP* (*engl.* Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein) ili osteocalcin (OCN) je bio ekspimiran u kasnijoj fazi diferencijacije ( $4.96 \pm 1.50$  f.p.- OOM;  $2.70 \pm 0.5$  f.p. - SOM). Dodavanjem 30% B-KM u BM ili SOM, doveo je do dodatne stimulacije mRNA ekspresije *BGLAP* u kasnoj fazi ( $5.28 \pm 1.1$  f.p. - BM;  $8.96 \pm 0.8$  f.p. - SOM), dok je u ranoj fazi došlo do smanjenja ekspresije. Manja koncentracija B-KM je takođe dovela do snažne stimulacije ekspresije *BGLAP* u kasnoj fazi diferencijacije ( $5.66 \pm 1.2$  f.p.). Neočekivano, obe koncentracije A-KM su čak snažnije povećavale ekspresiju ovog gena u odnosu na B-KM. Povećanje je iznosilo  $14.0 \pm 3.8$  f.p. (10% A-CM) i  $5.21 \pm 0.92$  f.p. (30% A-KM). Takođe, za razliku od B-KM, obe koncentracije A-KM su povećavale ekspresiju *BGLAP* i u ranoj fazi diferencijacije kako u BM tako i u SOM PL-MSC kulturama. Manja koncentracija A-KM, dodata u SOM kulture, je smanjivala ekspresiju *BGLAP* u kasnoj fazi diferencijacije u odnosu na kontrolu (SOM kulture bez KM) (Grafikon 22).

Ekspresija *COL1A1* u OOM kulturama je pokazivala drugačiji obrazac ekspresije u odnosu na *BGLAP*. Naime, ekspresija je bila umereno povećana u ranoj fazi ( $3.64 \pm 0.3$  f.p.) a znatno inhibirana u kasnoj fazi ( $0.42 \pm 0.10$  f.p.). Veća koncentracija B-KM je indukovala blago povećanje ekspresije *COL1A1* u BM kulturama u kasnoj fazi, a u SOM kulturama povećanje je bilo u obe faze. Manja koncentracija A-KM je dovela do smanjenja *COL1A1* ekspresije u SOM kulturama u kasnoj fazi, dok je veća koncentracija imala suprotan, blagi inhibicioni efekat (Grafikon 23).

Ekspresija *ALP* u OOM kulturama je bila izrazito povećana u ranoj fazi ( $5.42 \pm 1.8$  f.p.) i nastavila se sa povećanjem u kasnoj fazi osteoblastne diferencijacije ( $8.31 \pm 2.2$  f.p.). U SOM kulturama povećanje ekspresije *ALP* je zabeleženo u kasnoj fazi ( $3.51 \pm 0.4$  f.p.). Sličan fenomen je uočen u BM kulturama u prisustvu 10% B-KM. Veća koncentracija B-KM, dodata u SOM kulture, je dovela do sličnog obrasca ekspresije kao u pozitivnoj kontroli (OOM kulture) ( $2.98 \pm 0.5$  f.p. - rana faza i  $7.5 \pm 1.9$  f.p. - kasna faza, BM) ( $3.64 \pm 0.4$  f.p. - rana faza;  $6.32 \pm 0.8$  f.p. - kasna faza, SOM).

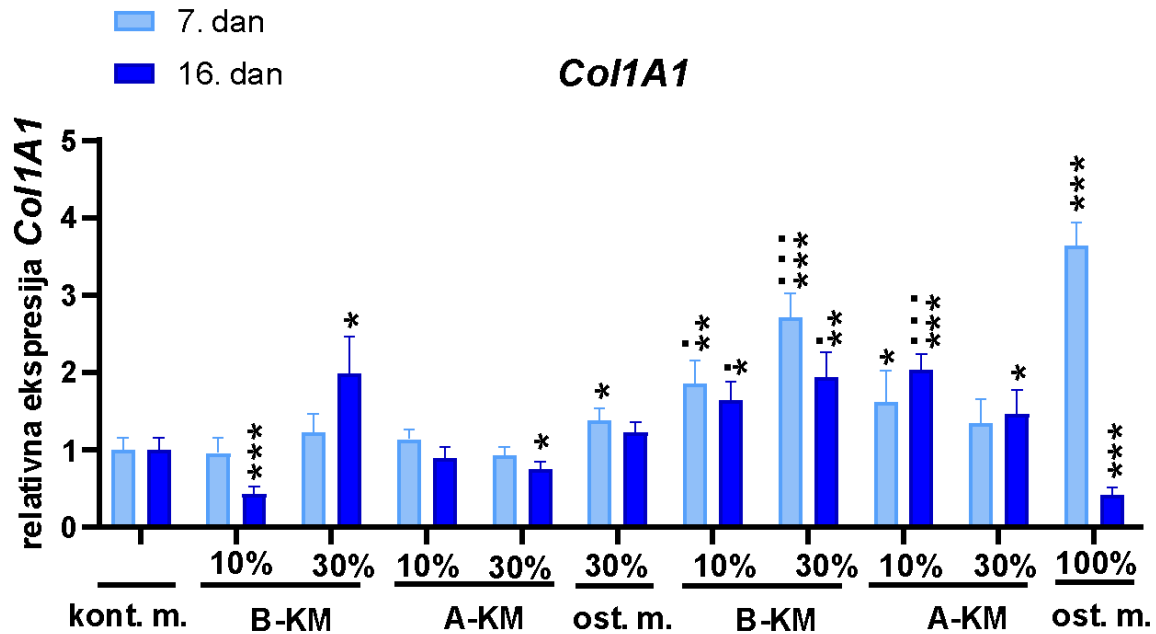
Nijedna koncentracija A-KM nije značajno modifikovala ekspresiju *ALP* u BM kulturama, ali su obe koncentracije A-KM pospešile ekspresiju *ALP* u kasnoj fazi diferencijacije u SOM kulturama (Grafikon 24).



**Grafikon 22.** Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na ekspresiju *BGLAP* u PL-MSK tokom osteoblastne diferencijacije.

Rezultati su prikazani kao relativna genska ekspresija u odnosu na kontrolu (PL-MSK kultivisanih u kontrolnom bazalnom medijumu za MSC) gde je bazalna ekspresija normalizovana na indeks 1, kako je opisano u poglavlju Materijal i metode.

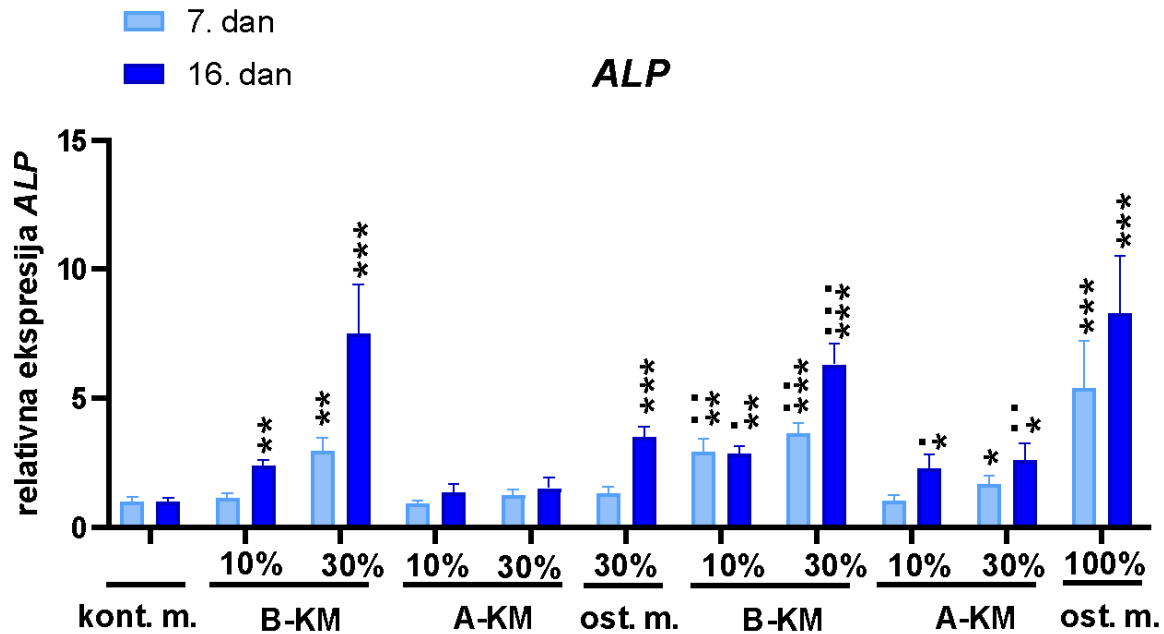
\*= $p < 0.05$ ; \*\*= $P < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.001$  u odnosu na kontrolu. ▣= $p < 0.05$ ; ▨= $p < 0.01$ ; ▩= $p < 0.001$  u odnosu na suboptimalni (30%) osteogeni medijum.



**Grafikon 23.** Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na ekspresiju *COL1A1* u PL-MSK tokom osteoblastne diferencijacije.

Rezultati su prikazani kao relativna genska ekspresija u odnosu na kontrolu (PL-MSK kultivisanih u kontrolnom bazalnom medijumu za MSC) gde je bazalna ekspresija normalizovana na indeks 1, kako je opisano u poglavlju Materijal i metode.

\*= $p < 0.05$ ; \*\*= $P < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.001$  u odnosu na kontrolu. ◻= $p < 0.05$ ; ◻◻= $p < 0.001$  u odnosu na suboptimalni (30%) osteogeni medijum.



**Grafikon 24.** Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na ekspresiju *ALP* u PL-*MSC* tokom osteoblastne diferencijacije.

Rezultati su prikazani kao relativna genska ekspresija u odnosu na kontrolu (PL-*MSC* kultivisanih u kontrolnom bazalnom medijumu za *MSC*) gde je bazalna ekspresija normalizovana na indeks 1, kako je opisano u poglavlju Materijal i metode.

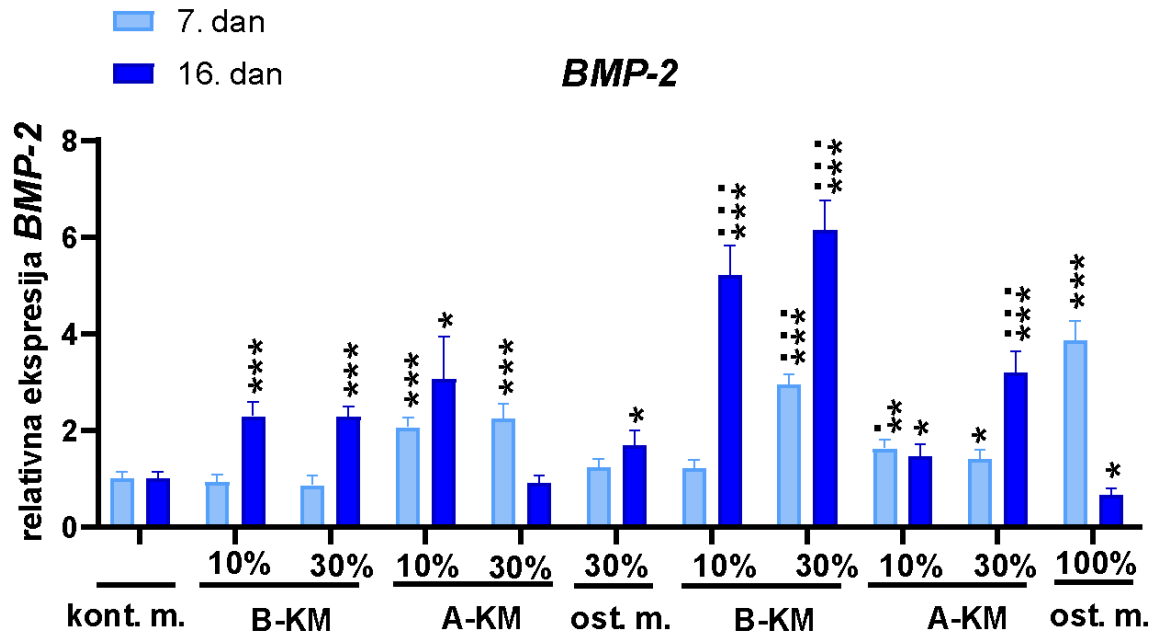
\*= $p < 0.05$ ; \*\*= $P < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.001$  u odnosu na kontrolu. ◻= $p < 0.05$ ; ◼= $p < 0.01$ ; u odnosu na suboptimalni (30%) osteogeni medijum; (n=4; po dva uzorka iz dva različita eksperimenta).



#### 4.4.8. Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na osteogenu diferencijaciju PL-MSC procenjivanu na osnovu ekspresije gena karakterističnih za osteoblastne i fibroblastne citokine BMP-2, TGF- $\beta$ 1 i FGF-2

Osteogena diferencijacija PL-MSC u OOM je bila praćena indukcijom ekspresije mRNK za *BMP-2* u ranoj fazi diferencijacije ( $3.86 \pm 0.42$  f.p.), nakon čega je došlo do značajne inhibicije u kasnijoj fazi diferencijacije ( $0.66 \pm 0.14$  f.p.). U SOM kulturama zabeležena je blaga stimulacija ekspresije *BMP-2* samo u kasnoj fazi diferencijacije PL-MSC ( $1.70 \pm 0.31$  f.p.). B-KM nije imao uticaj na ekspresiju ovog gena u ranoj fazi ali je doveo do umerenog povećanja ekspresije u kasnoj fazi diferencijacije u BM kulturama, nezavisno od primenjene koncentracije. Suprotno ovim nalazima, veća koncentracija B-KM je povećala ekspresiju *BMP-2* u SOM kulturama na vremenski zavisani način ( $2.96 \pm 0.24$  f.p. – rana faza;  $6.15 \pm 0.62$  f.p. – kasna faza). U ovim kulturama, manja koncentracija B-KM je povećala ekspresiju ovog gena samo u kasnoj fazi ( $5.22 \pm 0.61$  f.p.).

Manja koncentracija A-KM je stimulisala ekspresiju *BMP-2* u obe faze diferencijacije ( $2.07 \pm 0.21$  f.p. i  $3.07 \pm 0.88$  f.p.). Međutim, u SOM kulturama manja koncentracija je blago povećala *BMP-2* ekspresiju u ranoj fazi u odnosu na odgovarajuću kontrolu ( $1.63 \pm 0.19$  f.p.), dok je veća koncentracija dovela do povećanja ekspresije ovog gena u kasnijoj fazi ćelijske diferencijacije ( $3.20 \pm 0.44$  f.p.) (Grafikon 25).



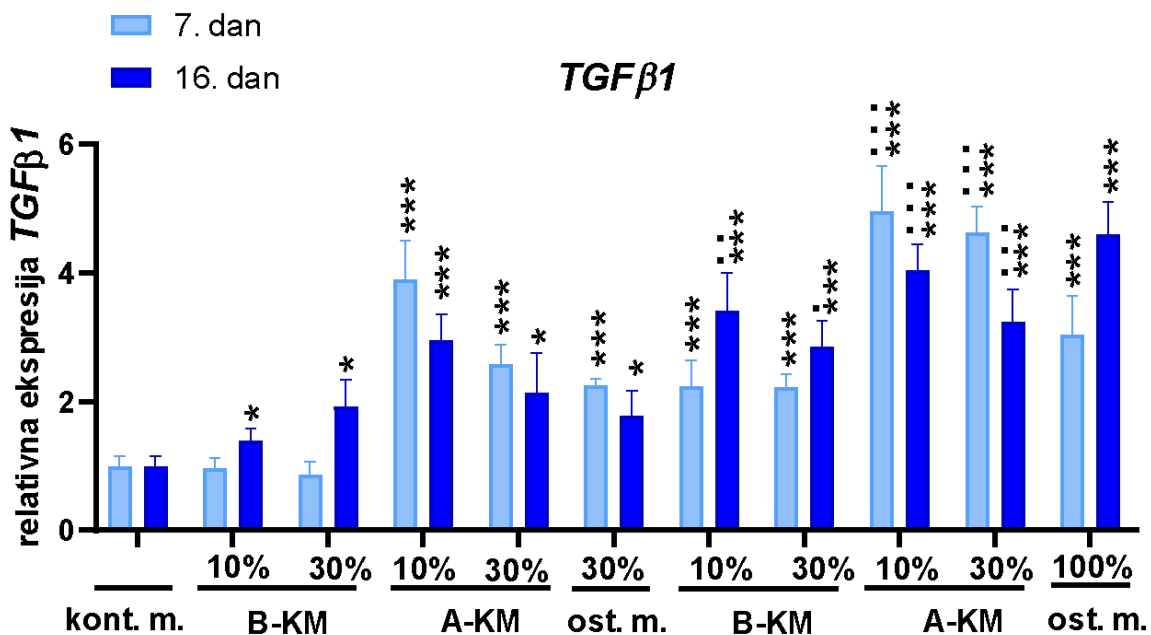
**Grafikon 25.** Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na ekspresiju *BMP-2* u PL-MSC tokom osteoblastne diferencijacije.

Rezultati su prikazani kao relativna genska ekspresija u odnosu na kontrolu (PL-MSC kultivisanih u kontrolnom bazalnom medijumu za MSC) gde je bazalna ekspresija normalizovana na indeks 1, kako je opisano u poglavlju Materijal i metode.

\*= $p < 0.05$ ; \*\*= $P < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.001$  u odnosu na kontrolu. ◻= $p < 0.05$ ; ◼= $p < 0.001$  u odnosu na suboptimalni (30%) osteogeni medijum; (n=4; po dva uzorka iz dva različita eksperimenta).

Ekspresija *TGF-β1* u OOM kulturama PL-MSC je bila značajno indukovana posle 7 dana ( $3.04 \pm 0.62$  f.p.) i porast ekspresije je nastavljen i u kasnoj fazi ( $4.60 \pm 0.54$  f.p.). B-KM nije uticao na ekspresiju *TGF-β1* u ranoj fazi u kulturama sa BM ali je blago povećao ekspresiju u kasnoj fazi ( $p < 0.05$  u odnosu na kontrolu). Suprotno ovim rezultatima, obe koncentracije A-KM su stimulisale ekspresiju *TGF-β1* u obe faze osteoblastne diferencijacije, pri čemu je efekat manje koncentracije bio izraženiji ( $3.90 \pm 0.63$  f.p. - rana faza;  $2.95 \pm 0.42$  f.p. - kasna faza).

Obe koncentracije B-KM su dovele do povećanja ekspresije *TGF-β1* u kasnoj fazi diferencijacije u SOM kulturama ( $3.41 \pm 0.60$  f.p. - 10% B-KM;  $2.86 \pm 0.40$  f.p. - 30% B-KM). Potencirajući efekat A-KM u SOM kulturama je bio izraženiji u odnosu na B-KM i registrovan je u obe faze diferencijacije: rana faza-  $4.96 \pm 0.71$  f.p. - 10% A-KM;  $4.63 \pm 0.42$  f.p. - 30% A-KM; kasna faza -  $4.04 \pm 0.042$  f.p. - 10% A-KM;  $3.24 \pm 0.52$  f.p. - 30% A-KM.



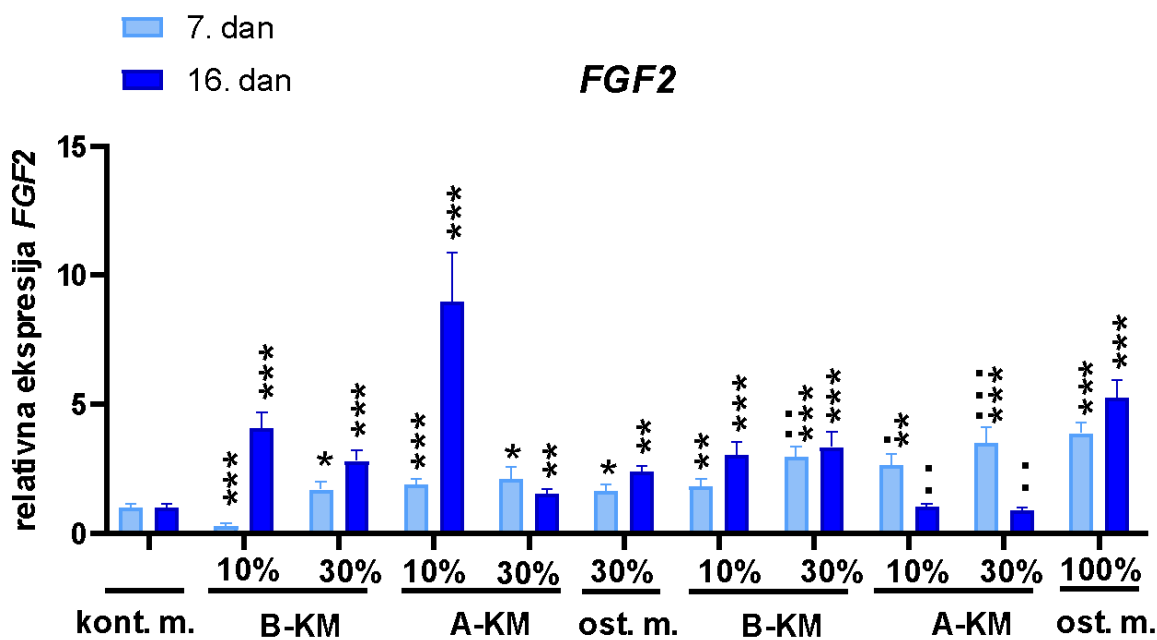
**Grafikon 26.** Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na ekspresiju *TGF-β1* u PL-MSC tokom osteoblastne diferencijacije.

Rezultati su prikazani kao relativna genska ekspresija u odnosu na kontrolu (PL-MSC kultivisanih u kontrolnom bazalnom medijumu za MSC) gde je bazalna ekspresija normalizovana na indeks 1, kako je opisano u poglavlju Materijal i metode.

\*= $p < 0.05$ ; \*\*\*= $p < 0.001$  u odnosu na kontrolu. ■= $p < 0.05$ ; ■■■= $p < 0.001$  u odnosu na suboptimalni (30%) osteogeni medijum; (n=4; po dva uzorka iz dva različita eksperimenta)

Ekspresija *FGF-2* u OOM kulturama PL-MSC je bila značajno indukovana posle 7 dana ( $3.88 \pm 0.44$  f.p.) i porast ekspresije je nastavljen i u kasnoj fazi ( $5.26 \pm 0.72$  f.p.). Sličan, ali znatno manji stimulacijski efekat, je zabeležen u kontrolnim SOM kulturama kao i u BM kulturama PL-MSC u prisustvu 30% B-KM. Manja koncentracija B-KM je je inhibirala ekspresiju *FGF-2* gena u BM ( $0.28 \pm 0.1$ ), ali je u kasnoj fazi snažno stimulisala ekspresiju ovog gena ( $4.07 \pm 0.6$  f.p.), značajno više nego veća koncentracija B-KM ( $2.81 \pm 0.38$  f.p.). Modulacijski efekat B-KM u SOM kulturama je bio značajno manji. Jedino je veća koncentracija blago stimulisala ekspresiju *FGF2* u ranoj fazi kultivacije PL-MSC (Grafikon 27).

A-KM je pokazivao značajno veći stimulacijski efekat na ekspresiju *FGF-2* u odnosu na B-KM. Kao što se vidi sa grafikona 27, manja koncentracija A-KM dodata u BM je najsnaznije stimulisala ekspresiju *FGF-2* u kasnoj fazi ( $8.99 \pm 1.88$  f.p.) i ova indukcija je bila najveća u poređenju sa svim drugim uslovima kultivisanja ćelija. Interesantan je nalaz efekta veće koncentracije A-KM, koja je blago stimulisala ekspresiju *FGF-2* u BM kulturama, u kasnoj fazi SOM kultura je inhibirala ekspresiju ovog gena.



**Grafikon 27.** Efekat kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na ekspresiju *FGF-2* u PL-MSC tokom osteoblastne diferencijacije.

Rezultati su prikazani kao relativna genska ekspresija u odnosu na kontrolu (PL-MSC kultivisanih u kontrolnom bazalnom medijumu za MSC) gde je bazalna ekspresija normalizovana na indeks 1, kako je opisano u poglavlju Materijal i metode.

\*= $p < 0.05$ ; \*\*= $P < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.001$  u odnosu na kontrolu. ◻= $p < 0.05$ ; ◻◻= $p < 0.01$ ; ◻◻◻= $p < 0.001$  u odnosu na suboptimalni (30%) osteogeni medijum.

Na osnovu ispitivanja modulacijskog efekta necitotoksičnih koncentracija KM Biodentina može se zaključiti da osim stimulacije proliferacije PL-MSC, koji je dozno zavisna, B-KM snažno stimuliše osteoblastnu diferencijaciju PL-MSC, bez dodatnih faktora osteoindukcije i potencira ove procese u prisustvu 30% osteogenog medijuma koji je suboptimalan za osteoblastnu diferencijaciju PL-MSC. Osteoinduktivni potencijal B-KM, koji je takođe dozno zavisna, je dokazan na osnovu formiranja mineralizovanih kalcijumovih jezgara obojenih sa Alizarin crvenim i ekspresije seta osteoblastnih gena. B-KM je snažno stimulisao *RUNX2*, *ALP* i *BGLAP*, umereno stimulisao *COL1A1*, *SP7*, *BMP-2*, *TGF- $\beta$ 1* i *FGF-2*, a inhibirao *WNT2* gensku ekspresiju. Stimulacijski efekat B-KM na ispitivane gene je bio veći u kasnoj fazi diferencijacije što se za većinu gena nije poklapalo sa dinamikom genske ekspresije u ćelijskim kulturama sa osteogenim medijumima. B-KM je stimulisao ekspresiju svih ispitivanih gena u SOM kulturama uključujući i *WNT2*.

Za razliku od Biodentina, iste necitotoksične koncentracije medijuma, pripremljene kondicioniranjem amalgama, nisu stimulisale proliferaciju PL-MSC, niti su indukovale osteoblastnu diferencijaciju PL-MSC, procenjivanu na osnovu bojenja kultura sa Alizarin crvenim. Međutim, osim odsustva efekta na ekspresiju *RUNX2*, *SP7*, *ALP* i *COL1A1*, A-KM je snažnije stimulisao ekspresiju *BGLAP*, *BMP-2*, *TGF- $\beta$ 1* i *FGF-2* nego B-KM, pri čemu je efekat manje koncentracije bio veći nego efekat veće koncentracije A-KM. Modulacijski efekat A-KM je pokazivao drugačiji obrazac u SOM kulturama u kojima je povećavao ekspresiju *COL1A1*, *SP7*, *WNT2*, *BGLAP*, *BMP-2* i *TGF- $\beta$ 1* a inhibirao ekspresiju *RUNX2*, *ALP* i *FGF-2*.

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Klinička studija

Osnovni cilj ovog projekta je bio testiranje hipoteze da je Biodentin efikasniji u zarastanju PL u endodontskoj hirurgiji nakon retrogradnog punjenja kanala korena zuba u odnosu na tradicionalno korišćeni amalgam. Kao što se moglo i očekivati postoji veliki broj podataka o efikasnosti amalgama u ovoj indikaciji, obzirom na dugi period njegovog korišćenja a najznačajnije reference su objavljene u poslednjih trideset godina prošlog veka. Do sada nisu publikovani slični podaci o Biodentinu osim prikaza 4 slučaja kroz tri publikacije (150-152).

Naša studija je bila koncipirana po svim principima kliničkog naučno-istraživačkog rada gde je odabir pacijenata vršen na osnovu jasnih kriterijuma za uključivanje i isključivanje, (prikazanih u poglavlju Materija i metode) a randomizacija je vršena na osnovu tablice slučajnih brojeva kreiranih pomoću kompjuterskog programa za ovu namenu. U istraživanje je inicijalno bilo uključeno 60 PL raspoređenih podjednako u dve grupe na osnovu određivanja veličine uzorka. Međutim, u finalnu analizu je uključeno 49 PL (24 u grupi sa Biodentinom i 25 u grupi sa amalgamom) jer se izvestan broj pacijenata nije pojavio na kontrolni pregled posle 6 meseci. Uprkos tome, dobijeni rezultati pokazuju da je veličina uzorka bila dovoljna za adekvatno izvođenje zaključaka.

Ključni rezultat ove studije je potvrda hipoteze da je Biodentin efikasniji u zarastanju PL u odnosu na amalgam, procenjivano posle 6 meseci od hiruške intervencije na osnovu standardnih radiografskih i kliničkih pokazatelja a koji su široko prihvaćeni u ovoj oblasti (200-203). Kada su analizirani samo radiografski pokazatelji, kompletno zarastanje (indeks 1) je u grupi sa Biodentinom iznosilo 75%, dok je istim indeksom ocenjeno samo 45% PL u grupi sa amalgamom i ova razlika je bila statistički značajna ( $p < 0.05$ ). Do istih rezultata se došlo primenom objedinjenih radioloških i kliničkih pokazatelja. Međutim, kada se analiziraju samo dominantni klinički kriterijumi (202) razlika nije bila statistički značajna jer je u jednoj i drugoj grupi ocena uspeha terapije prema predloženim kriterijumima bila drugačija.

Ovakav klinički nalaz je bio očekivan obzirom na publikovane podatke o efikasnosti MTA tipa cementa u zarastanju PL koja je posledica, sa jedne strane njihovih svojstava dobre opturacije korena kanala, a sa druge strane, njihovim bioregenerativnim potencijalima (114, 115, 119, 129, 144, 195, 196). Međutim, pred nama, oralnim hirurzima koji smo dizajnirali i sproveli ovu kliničku studiju, priprema i rukovanje Biodentinom je bila potpuna nepoznanica. Ovome treba dodati i poznate činjenice o relativno lošoj radiotransparentnosti ovog cementa. Sve je to moglo uticati na konačan terapijski uspeh. Teškoće u komparaciji naših nalaza o efikasnosti Biodentina sa objavljenim rezultatima, kao i sa drugim kliničkim studijama u kojima je korišćena ista grupa trikalcijum silikatnih cemenata, je kratak vremenski period od 6 meseci do kada je uspeh endodontske hirurgije praćen. Iako je ovaj period relativno dovoljan za inicijalnu procenu uspeha terapije u hirurškom lečenju PL, obzirom na metodološki korektnu sprovedenu randomizaciju i korišćenja kontrolne grupe ispitanika sa amalgamom, značajno objektivniji rezultati se mogu očekivati tek posle 12 meseci (108-111). Uprkos tome, trend regeneracije periapexnog tkiva u

ranoj fazi se generalno poklapa za fazom zarastanja u periodu od godinu dana pa je u tom kontekstu opravdana i diskusija naših rezultata. Takođe, u značajnom broju radova promene su praćene i nakon 6 meseci, posebno kod primene amalgama (119-121), pa su takvi podaci takođe vrlo značajni za komparaciju.

Prvi rad o kliničkoj primeni Biodentina kao materijala za retrogradno punjenje su objavili Pawar i sar. 2013 (150) a koji se odnosio na hirurško lečenje velike PL ciste kod mlađeg pacijenta, nastale posle traume a koja je bila lokalizovana između desnih gornjih sekutića. Koreni oba sekutića su resecirana po 3mm, a nakon preparacije kanala pomoću ultrazvučne mikrobušilice vršeno je retrogradno punjenje kanala. Pacijent je klinički i radiografski praćen do 18 meseci kada je notirano kompletno zarastanje na osnovu kliničkih i radiografskih pokazatelja. Pošto se radilo o velikoj posttraumatskoj cisti regeneracija je zapažena i posle 6 meseci ali se ona na osnovu prikazanog radiografskog snimka može okarakterisati indeksom 3 što je daleko lošije u odnosu na naše rezultate. Međutim, očito da rezultati u ovom vremenskom terminu ne mogu biti uporedivi sa našim jer se radilo o velikoj posletraumatskoj cisti. Imajući u obzir da je kompletno zarastanje zapaženo tek posle 18 meseci, jasno se nameće potreba neophodnosti dužeg vremenskog praćenja procesa zarastanja radi definitivne procene efikasnosti primenjenog materijala. Ubrzo nakon toga, Caron i sar. 2014 (151) su publikovali prikaz dva slučaja uspešnog zarastanja PL nakon apikotomije i retrogradnog punjenja kanala korena sa Biodentinom. Prema radiografskim i kliničkim pokazateljima radilo se o kompletnom zarastanju koje je procenjivano posle godinu dana što se održavalo i posle dve godine. U prvom slučaju se radilo o PL bez simptomatologije na zubu 25 a u drugom slučaju o leziji sa blažim kliničkim simptomima, takođe na zubu 25. Nisu prikazani podaci o veličinama PL. U okviru hirurškog postupka korišćena je ultrazvučna mikrobušilica za pripremu kanala i operacioni mikroskop sa velikim uvećanjem. Punjenje kanala je vršeno pomoću mikroapikalnog aplikatora.

Treći rad se zapravo odnosi na prikaz slučaja lečenja reverzibilnog pulpitisa pri čemu je u postupku finalnog endodontskog zahvata vršeno ortogradno punjenje kanala zuba Biodentinom. Nakon praćenja pacijenta u posletretmanskome periodu do godinu dana pokazana je funkcionalnost zuba, neosetljivost na perkusiju uz negativan test na hladno (152). Ista grupa autora (205) je u skorašnjem radu prikazala slučaj uspešnog endodontskog lečenja sterilne PL nastale zbog nekroze tkiva nakon prethodne traume u kome je korišćen fibrin obogaćen trombocitima i Biodentin. Iako autori nisu detaljno opisali dinamiku zarastanja u vremenskom periodu praćenja od 3, 6 i 12 meseci, na prikazanim radiografskim snimcima se vidi kompletno zarastanje sa jasno izraženom periodontalnom linijom već posle 6 meseci. Naravno, ovaj rad ne može biti striktno komparabilan sa našim jer se radi o dvostrukom efektu primenjenih materijala i ortogradnom pristupu nezapaljenske PL. Ova grupa autora je takođe prikazala i slučaj hirurškog lečenja PL infektivne etiologije pomoću Biodentina zaključivši da je došlo do kompletnog zarastanja posle 9 meseci. Međutim, obzirom da se radi o loše napisanom radu koji je publikovan u časopisu koji nije na SCI listi i gde nije dat nikakav opis promena, ovaj rad nije citiran niti detaljno evaluiran.

Obzirom na odsustvo radova o kliničkim studijama vezanih za efikasnosti Biodentina u apeksnoj hirurgiji, opravdano je analizirati studije u kojima su za retrogradno punjenje kanala korena zuba korišćeni MTA i drugi materijali iz grupe trikalcijum silikatnih cemenata. U ovoj oblasti objavljen je veliki broj studija. Zato smo se u ovoj analizi opredelili za sažeti prikaz nekih karakterističnih radova i meta analiza.

U okviru prospektivne kliničke studije koja je trajala od 2001-2007, godine von Arx i sar. (206) su analizirali 357 ispitanika podvrgnutih apikalnoj hirurgiji i retrogradnom punjenju sa MTA (178 pacijenata) ili kompozitnom smolom (Retroplast) (175 ispitanika). Procena efekta korišćenih materijala je vršena na osnovu standardnih radioloških i kliničkih kriterijuma, koje smo i mi koristili. Procenat lezija kod kojih je detektovano kompletno zarastanje je u MTA grupi bio 85.5%, nekompletno je zaraslo 5.8% lezija, koliko je bilo i pacijenata sa kriterijumima za neizvesno zarastanje. U grupi sa Retroplastom rezultati su bili lošiji (75.9% - kompletno; 3.6% - nekompletno; 15.1% - neizvesno zarastanje).

Kada se procenjuje zarastanje kao uspešno (kompletno + nekompletno zarastanje uz normalan klinički nalaz) uspešnim zarastanjem je ocenjeno 91.3% lezija u MTT grupi što je statistički bilo značajno veće nego u grupi sa Retroplastom (uspešno zarastanje u 79.5% lezija). Neuspeh u grupi sa Retroplastom je bio najveći kod lečenja mandibularnih kutnjaka.

U randomizovanoj kliničkoj studiji na 108 ispitanika, u kojoj su poređeni efekti MTA i IRM i u koju nisu bile uključene PL na molarima, pokazani su slični rezultati posle 2 godine praćenja. Uspešnim je ocenjeno zarastanje kod 92% lezija, što je bilo statistički značajno bolje nego u IRM grupi u kojoj je zarastanje bilo uspešno kod 87% slučajeva (207). Skoro identične rezultate su pokazali Lindeboom i sar. (208) na ukupno 100 PL, posle godinu dana od hirurškog zahvata, kao i Kim i saradnici (209) na retrospektivnoj studiji na 188 ispitanika. U poslednjem radu uspeh u MTA i superEBA grupi je bio identičan (92%).

Vrlo je interesantan rad koji su objavili Rapp i sar. 1991 na 424 ispitanika u okviru retrospektivne studije (197) a koji se odnosio na odnos uspeha i neuspeha apikotomije. Zarastanje je praćeno na osnovu radiografskih kriterijuma. Materijali za retrogradno punjenje su bili amalgam, IRM i EBA. Kontrolne radiografije su rađene posle 6 meseci do dve godine ali su grubo podeljene na one od 6 meseci do godinu dana, od godinu dana do dve godine i preko dve godine. U prvoj grupi je bilo 38.1% ispitanika ali su podaci o uspehu/neuspehu objedinjeni, što otežava komparaciju sa našim rezultatima. Prema ovom istraživanju u objedinjenoj grupi kompletno zarastanje je nađeno u 65% pacijenata, nekompletno u 29.4% a neizvesno u 5.6% slučajeva. Kada je analiza vršena u odnosu na primenjeni materijal, kompletno zarastanje je bilo najveće u grupi sa amalgamom (70.83%) a najmanje u grupi sa EBA (65.43%). Kompletno zarastanje je bilo izraženije u pacijenata starijih od 60 godina. Mi smo imali samo 4 pacijenta (dva sa Biodentinom i dva sa amalgamom) ove životne dobi.

Interesantno je da je kod oba pacijenta sa amalgamom detekovano nekompletno zarastanje a kod oba pacijenta sa amalgamom kompletno zarastanje. Naravno da je mali broj ispitanika u našoj studiji neadekvatan za poređenje. Nije nađena razlika u zarastanju između maksilarnih i mandibularnih lezija. U našoj studiji mi smo imali samo 3 mandibularne PL, dve tretirane sa Biodentinom kod kojih je bilo nekompletno zarastanje i jedne tretirane amalgamom, sa kompletnim zarastanjem. U studiji Rappa i sar. (197) nije bilo statistički značajne razlike u zarastanju između lezija koje su pre apikotomije tretirane endodontski u odnosu na one koje nisu prethodno tretirane ovim postupkom. Mi smo u grupi sa Biodentinom imali samo 4 PL a u grupi sa amalgamom samo dve PL, koje prethodno nisu endodontski tretirane i kod svih je zarastanje bilo kompletno.



Nekoliko radova koji se odnosi na amalgam kao materijal za retrogradnu opturaciju je uporedivo sa našim rezultatima u pogledu uspeha hirurškog lečenja praćenog u ranom periodu posle 6 meseci. Penarrocha i sar. (210) su prikazali rezultate prospektivne kliničke studije na 235 pacijenata (333 zuba) u lečenju PL, pri čemu je nakon ultrazvučne instrumentacije vršeno punjenje kanala korena amalgamom. PL su bile podjednako zastupljene na jednokorenim zubima i dvo-odnosno trokorenim molarima. Na osnovu objedinjenih radiografskih i kliničkih kriterijuma, identične onima koje smo mi koristili, autori su pokazali da je nakon 6 meseci 50.4% PL lečenih hirurški označeno uspešno zaraslim, 33.1% PL je identifikovano kao poboljšanje a 16.5% kao neuspešno.

Ovi nalazi su vrlo slični našim rezultatima na značajno manjem uzorku, iako smo mi koristili za preparaciju kanala mikrokolenjak umesto ultrazvučnih mikrobušilica. Veći broj radova koje su analizirani kroz pojedinačne studija ili meta analize (211-215) su saglasni da je efikasnost endodontske hirurgije značajno unapređen korišćenjem ultrazvučne instrumentacije kanala i operacionog mikroskopa. Obzirom da mi nismo koristili ovu naprednu tehnologiju dobijeni zadovoljavajući rezultati se mogu tumačiti velikim iskustvom hirurga u ovoj patologiji. Penarrocha i sar. (210) su u svojoj studiji takođe analizirali uspeh hirurškog lečenja PL u odnosu na veličinu lezije. Pokazali su da je zarastanje većih lezija (> 5mm) manje uspešno u odnosu na manje lezije (< 5mm) što smo i mi pokazali u našoj studiji koristeći iste kriterijume za klasifikaciju veličine lezija. Međutim, ovakva razlika u našem istraživanju nije uočena u grupi sa Biodentinom. Ova razlika se može tumačiti razlikama u bioregenerativnom potencijalu korišćenih materijala. Naime, Biodentin, kao bioregenerativni materijal, čije je svojstvo stimulacije osteoblastogeneze PL-MSC potvrđeno u ovoj studiji, ima potencijal brže regeneracije koštanog tkiva. Sa druge strane, amalgam, koji nema osteogeni regenerativni potencijal, a stimuliše gene povezanih sa aktivacijom fibroblasta i meko-tkivne mineralizacije, može pospešivati firozno zarastanje, koje je izraženije ako su lezije veće.

Naši rezultati, koji se odnose na amalgam, su takođe komparabilni sa istraživanjima Dorn i Gartner (216). Ovi autori su kroz retrospektivnu studiju na 488 slučajeva (u dva različita klinička centra) analizirali efikasnost amalgama Super EBA i IRM u zarastanju periapexnog tkiva nakon hirurškog tretmana. Kontrolne radiografije su rađene uglavnom najmanje 6 meseci nakon tretmana ali su u radu svi podaci objedinjeni. U jednom centru kompletno zarastanje je bilo u 49% slučajeva a nekompletno u 26% slučajeva. U drugom centru uspeh je bio nešto bolji (65% - kompletno; 10% nekompletno zarastanje). Super EBA i IRM su pokazivali bolje, skoro identične rezultate (kompletno zarastanje u 75% odnosno 76% slučajeva). Autori objašnjavaju razlike boljim efektom ovih materijala u odnosu na amalgam u pogledu boljeg sprečavanja mikrocurenja. Ovaj podatak se može analogno primeniti i na bolju uspešnost Biodentina u našoj studiji.

Neki od prognostičkih faktora koji su značajni za uspeh periapexne hirurgije i retrogradne opturacije a koji su prikazani u meta analizi von Arh i sar. 2010 (196) mogu se primeniti i na našu studiju. Analizom je bilo obuhvaćeno 38 radova koji su zadovoljavali zadate kriterijume a koji su objavljeni pre 2008 godine. Ključni rezultati pokazuju da je od faktora koji su vezani za stanje zuba, uspešnije zarastanje se postiže kod pacijenata koji imaju kliničku simptomatologiju, kod pacijenata gde je gustina punjenja kanala dobra a PL su manje od 5 mm. Od faktora koji su vezani za tretman, jedino je pokazana bolja uspešnost kod primene endoskopa u odnosu na klasičnu apikotomiju i retropreparaciju kanala korena zuba. Kao što se može videti, autori ne spominju vrstu materijala

najverovatnije zbog njihove heterogenosti, relativno dugog vremena praćenja i odabira onih referenci koje se odnose prvenstveno na procenu prognostičkih faktora. Do sličnih zaključaka su došli Setzer i sar. 2010 (213) analizom 21 publikacije da je pokazano da je uspešnost apikalne hirurģije statistički značajno veća kada se koriste mikrohirurģske tehnike u odnosu na konvencionalne. Kada je urađena meta analiza kroz evaluaciju 10 članaka, koji se odnose na prognostičke faktore samo kod apikalne mikrohirurģije, pokazano je da smanjenje nivoa koštanog grebena veće od 3 mm, tip materijala za retrogradno punjenje, prisustvo kliničkih simptoma pre hirurģske intervencije kao i prisustvo dentinskih defekata u korenu zuba predstavljaju značajne faktore rizika za neuspeh. Ova studija se, međutim, ne bavi koji je materijal bolji ili lošiji u pogledu ishoda ovog hirurģskog tretmana. Sa druge strane, neki drugi faktori poput starosti, pola, statusa pušnja, veličine lezije ili tipa zuba nisu identifikovani kao značajni prediktivni faktori (217).

Mehanizmi kojima Biodentin, primenjen za retrogradno punjenje kanala korena zuba, pokazuje bolji efekat u procesu zarastanja nakon hirurģskog lećenja PL u poređenju sa amalgamom biće detaljno analizirani kroz diskusiju eksperimentalnih rezultata. U ovom poglavlju vredno je dati kritički osvrt na metodologiju koja je korišćena za procenu uspešnosti primenjene terapije.

Procena zarastanja periapeksnog tkiva nakon hirurģskog zahvata i sledstvene opturacije kanala korena je već dugo godina predmet intenzivnog razmatranja i na ovu temu je objavljeno na hiljade stručnih i naučnih radova. Uprkos svemu, saglasnost oko izbora najadekvatnije kvantitativne metodologije ne postoji, pa se najveći broj autora opredeljuje za kriterijume koji se temelje na semikvantitativnim pokazateljima a koji su uspostavljeni još pre 40-50 godina (218). Ti pokazatelji se odnose na procenu radiografskih karakteristika i kliničke simptomatologije. Iako je pozitivan klinički nalaz visoko indikativan da se radi o neuspehu, negativan nalaz ne mora da bude u korelaciji sa stepenom zarastanja i definisanjem uspeha. Mnogi klinički negativni nalazi (odsustvo simptoma) su praćeni nekompletnim ili neizvesnim zarastanjem, čak i dve godine nakon hirurģskog tretmana. Zbog toga se za procenu uvek uključuje komparativna radiografska analiza. I u okviru ove problematike napisan je ogroman broj radova koji su veoma sistematično analizirani u revijskom radu dvojice eminentnih kliničara, Ørstavik-a i Huuonen-a (219). Radiografska analiza se po pravilu vrši pre, neposredno posle i u određenim vremenskim terminima posle terapije. Vrlo često se dodatno dopunjava i kompjuterskom analizom radiografskih snimaka (220) ili kompjuterizovanim tomografskim slikanjem (106, 107).

Postavlja se pitanje da li tačno znamo kada se proces regeneracije tkiva, prethodno zahvaćenog PL, završava posle apikotomije i opturacije kanala korena zuba. Ogroman broj studija jasno pokazuje da to tačno ne znamo jer na zarastanje utiče, pojedinačno ili sinergistički, veliki broj faktora. Oni se mogu grubo podeliti na one koje su vezane za karakteristike lezije i one koje su vezane za operativni postupak (215). Za sada su se iskristalisali stavovi da je vremenski period od 12 meseci dovoljan za procenu efekta terapije jer se u tom periodu kod velikog broja slučajeva jasno uočavaju znaci zarastanja PL (200, 203, 215). Međutim, u mnogim slučajevima procesi regeneracije se mogu videti u periodu od 2-4 meseca, ali je prvi ozbiljniji period za evaluaciju svakako period od 6 meseci (221, 222). Neretko je period zarastanja jako dug tako da traje i više od 7 godina (223). Za multicentrične studije koje se rade na velikom broju ispitanika predloženo je da period od 4 godine bude standard za poređenja (219). Na osnovu naših rezultata smatramo da je period evaluacije od 6 meseci sasvim adekvatan za inicijalnu procenu zarastanja PL, s tim što je veoma opravdano da se rezultati publikuju u relevantnom časopisu nakon novog preseka

posle godinu dana, kada se očekuje da će efekti Biodentina biti još bolje ocenjeni i da će se statistička značajnost razlika u odnosu na amalgam i dalje zadržati.

Značajno pitanje koje traži odgovor je kako se analiziraju i interpretiraju rezultati radiografskih snimaka periapeksnog zarastanja i koliko je takva procena adekvatna. Odgovor se može naći u jasno poznatim ključnim parametrima koje treba evaluirati na rendgenskim mikrofilmovima. Po nekim autorima čak ih je više od 10 (214, 219, 220). Međutim, ključna analiza se može svesti na procenu izgleda periapeksnog rasvetljenja u pogledu veličine, stepena radiotransparentnosti, izgleda kontura lezije i simetrije u odnosu na postoperativni nalaz. Takođe je bitan izgled koštane linije alveole zuba u predelu resećiranog korena, odnosno veličina koštanog defekta u tom regionu. Drugi ključni parametar je izgled koštane regeneracije u pogledu regeneracije koštanih trabekula u spongioznom delu kosti i pravilnost njihove orijentacije. Paralelno sa ovim procesima procenjuje se izgled lamine dure, posebnog segmenta kortikalnog dela kosti, pre svega u pogledu njene prisutnosti ili odsutnosti u predelu apeksa, njen izgled i kontinuitet. Treći bitan parametar je regeneracija periodontalnog ligamenta koji se na rendgenskim snimcima prikazuje kao tamnija periodontalna linija. Osim prisustva ove linije, važna je i procena širine periodontalnog prostora i njen izgled u predelu resećiranog korena. Po pravilu proširenje periodontalnog prostora veće od dvostruke širine se smatra neizvesnim zarastanjem (200, 219). Često puta to može biti i zbog prepunjenosti vrha korena materijalom za opturaciju (219). Svi ovi najvažniji kriterijumi su objedinjeni u klasifikaciji koji su dali Rudd i sar (200) i na osnovu kojih je izvršeno indeksiranje rezultata u ovoj studiji.

Uprkos svemu, interpretacija radioloških nalaza je subjektivna i prvenstveno zavisi od iskustva kliničara stomatologa. Da bi ona bila što objektivnija neophodan je dobar rendgenski snimak kako u pogledu kvaliteta slike tako i u pogledu ugla snimanja. Suviše koso postavljen snop rendgenskih zraka ne omogućava jasan prikaz lamine dure, kada se često i ne vidi periodontalni prostor u predelu vrha korena. Na to utiče i tip zuba i njegova lokalizacija, starosna dob i opšta koštana gustina ali i druge individualne anatomske varijacije (219). Po pravilu lamina dura je teško vidljiva kod maksilarnih očnjaka (219, 220). Teškoće može predstavljati i linija maksilarnog sinusa koja može otežavati interpretaciju izgleda lamine dure kod drugog premolara i prvog molara. Od ne manjeg značaja su i prekrivanja PL drugim anatomske strukturama. Zbog svega navedenog, vrlo često postoje neslaganja u interpretaciji nalaza između dva ili više edukovanih posmatrača (224, 225), pa se po pravilu rezultati ovakvih studija objavljuju nakon usaglašavanja stavova najmanje dva autora i često puta se navode stepeni neslaganja. U našoj studiji stepen neslaganja između mentora i doktoranta je kod obe grupe iznosio 0.92%, što je vrlo dobar rezultat. Ovakav rezultat je postignut prethodnim usaglašavanjem stavova na velikom broju snimaka zdravih i patoloških zuba iz kolekcije radiografija u Odeljenju za oralnu hirurgiju VMA.

Na kraju bih izneo neka naša zapažanja u vezi rada sa Biodentinom. Iako se Biodentin deklarira kao materijal koji je lak za rukovanje, to se pokazalo da nije sasvim tačno, što se slaže i sa zapažanjima Caron-a i sar. (151). Komplikovanost za upotrebu, koja je bila posebno izražena na početku njegove primene, se pre svega odnosila na pripremu materijala adekvatne konzistencije, uprkos striktnog pridržavanja uputstva da se u prah dodaje 5 kapi tečnosti. Preporuka je da se nakon pripreme sačeka 10 min. koliko je inače vreme njegove polimerizacije. Često puta otvrdnjavanje se dešava ranije, verovatno zbog inicijalne čvršće konzistencije, pa se postupak

mora ponoviti. Sve to dodatno poskupljuje lečenje a može prouzrokovati povećanje rizika od razvoja postoperativnog edema zbog produžetka intervencije.

Drugi krupan nedostatak je slaba radiotransparentnost Biodentina koja se dodatno vremenom smanjuje pa je teško vizualizovati ispunjeni kanal. Ovaj nedostatak je već dobro poznat (141, 142) a posebno može predstavljati problem kod retrogradne opturacije. Ne treba zanemariti cenu ovog trikalcijum silikatnog cementa i činjenicu da se od pripremljene kapsule praha iskoristi samo mala porcija za jednog pacijenta. Posle primene Biodentina nije preporučeno ispiranje hirurškog polja, što je obavezno indikovano kod amalgama radi uklanjanja zaostalih čestica. Ispiranjem bi došlo do razmekšavanja Biodentina što bi moglo da ima negativne posledice. Zbog čega se retrogradno punjenje Biodentinom mora vršiti veoma pažljivo i precizno. Sve ove teškoće se postepeno prevazilaze kroz praksu, a povoljni terapijski ishodi sugerišu da Biodentin može biti ne samo alternative drugim MTA cementima već imati i prednost zbog specifičnih fizičko-hemijskih karakteristika koje mu omogućuju odlično rubno zaptivanje, kao i anti-inflamacijskog i osteoregenerativnog potencijala.

#### Ekperimentalna studija: Citokompatibilnost ekstrakata Biodentina i amalgama

Biokompatibilnost materijala koji se koriste u stomatologiji je od ključnog značaja radi očuvanja oralnog i opšteg zdravlja. U tom cilju su uvedeni strogi kriterijumi koje materijali moraju da ispune da bi bili bezbedni, kako za pacijenta tako i osoblje koje sa njima rukuje a propisani su ISO-10993 standardima (158) i dodatno ISO- 7405 (159), koji su specifični za pojedine testove stomatoloških materijala. Od brojnih *in vitro* i *in vivo* testova, testovi citotoksičnosti su osnovni i prvi testovi i zato im se pridaje poseban značaj. Za proveru citotoksičnosti ovi standardi propisuju više testova u zavisnosti da li je u pitanju direktan kontakt ili se radi o efektima ekstrakata materijala (indirektan efekat). Izbor testa zavisi od vrste materijala i njegove namene. Obzirom da se stomatološki materijali koriste najčešće za dugotrajnu primenu, češće se preporučuje indirektno testiranje radi provere postojanja potencijalno toksičnih supstanci ili jona, odnosno degradacionih produkata koji se oslobađaju iz materijala (204). To je i bio razlog zašto smo se opredelili za testiranje potencijalnog citotoksičnog efekta Biodentina, odnosno amalgama kao kontrolnog materijala.

Da bi rezultati bili uporedivi, ovim ISO standardima su propisani tačni postupci testiranja. Za indirektno testiranje je predložen MTT test koji je pokazatelj vijabilnosti ćelija jer se pomoću njega meri aktivnost sukcinat dehidrogenaze, enzima koji je uključen u metaboličke aktivnosti ćelija (226). To znači da je metabolička aktivnost, koja se inače meri jednostavnim kolorimetrijskim postupkom, direktno proporcionalna broju vijabilnih ćelija. Zato je smanjenje MTT aktivnosti kod ćelija koje nemaju proliferativnu aktivnost, najčešće pokazatelj citotoksičnosti, uzrokovane ćelijskom smrću (227). Ako su u pitanju ćelije koje spontano proliferišu u kulturi (najčešće fibroblastne ćelijske linije) onda smanjena metabolička aktivnost može predstavljati i citotoksično delovanje koje je posledica inhibicije ćelijske proliferacije različitim mehanizmima. Zbog toga MTT test uvek treba kombinovati sa drugim testovima kao što su testovi za dokazivanje ćelijske smrti i proliferacije ćelija (228), što smo mi i koristili u našim istraživanjima. Kod ćelija koje proliferišu može doći i do povećanja metaboličke aktivnosti koja je najčešće posledica povećanog umnožavanja ćelija pod uticajem stomatoloških materijala ili njihovih ekstrakata.

Zbog svega navedenog MTT je prihvaćen kao osnovni skrining test u postupku testiranja biokompatibilnosti materijala koji su pripremljeni kao medicinska sredstva za primenu u medicini i stomatologiji. Osim odabira testa i načina testiranja, ISO-10993-12 standard (204) propisuje i način kondicioniranja materijala. Kada nije moguće pripremiti materijal u pravilnom obliku da bi se lako odredila površina materijala onda se preporučuje merenje mase materijala koja je bitna da bi se odredila zapreminu rastvora za ekstrakciju (kondicioniranje). Preporuka je da masa materijala bude 0.2g/ml, što smo mi i ispoštovali u našim eksperimentima. Našalost, ISO-10993-12 (204) standard ne propisuje i sve detalje kondicioniranja, pre svega vreme kondicioniranja. Najčešće se preporučuje vremenski period od 24 časa, ali vreme može biti i duže u zavisnosti od vrste materijala i njegove namene. Kada je u pitanju odnos površine materijala i zapremine rastvora za kondicioniranje, standard propisuje raspon od 0.5cm<sup>2</sup>/ml do 6cm<sup>2</sup>/ml. Naša merenja približne površine materijala su pokazali da je odnos površine prema zapremini medijuma za kondicioniranje iznosio oko 2.2cm<sup>2</sup>/ml. Ovako veliki raspon predloženih indeksa, a koji je u objavljenim literaturnim podacima različito primenjivan, onemogućava adekvatno zaključivanje i zato je po našem mišljenju maksimalno predložen odnos mase materijala po jedinici zapremine materijala koji smo mi koristili bolji način za procenu biološke aktivnosti ispitivanih materijala. Kada je u pitanju kako Biodentin, tako i amalgam, sličan postupak nije korišćen, što otežava poređenje naših rezultata sa podacima iz literature.

Na osnovu svih dobijenih rezultata zaključeno je da veće koncentracije ekstrakta Biodentina i amalgama ispoljavaju citotoksični efekat na L929 ćelije, pri čemu je efekat ekstrakta amalgama bio manji nego efekat ekstrakta Biodentina, što je za nas bio prilično iznenađujući fenomen. Za razliku od ekstrakta amalgama, manje koncentracije ekstrakta Biodentina su stimulisale proliferaciju L929 ćelija koja je bila direktno srazmerna dužini kultivacije ćelija. Veće efekte su ispoljavali ekstrakti pripremljenih od sveže polimerizovanih materijala u odnosu na ekstrakte od ovrnutih materijala, što je generalno u saglasnosti sa literaturnim podacima o citotoksičnosti mnogih stomatoloških materijala a o čemu će biti rasprave u nastavku diskusije Ovi efekti su bili direktno proporcionalni dužini kondicioniranja, što znači da je duži period kondicioniranja direktno proporcionalan izraženijem inhibicijskom efektu. Filtrirani ekstrakt Biodentina je ispoljavao manji inhibicijski i manji stimulacijski efekat nego ukupni ekstrakt, što ukazuje na biološki značaj mikročestica oslobođenih u toku procesa ekstrakcije. Ova razlika nije nađena kod amalgama, što pokazuje i mikroskopska analiza odsustva mikročestica u ukupnom ekstraktu amalgama. Sve to ukazuje da citotoksični efekat amalgama zavisi od oslobođenih jona metala iz legure, što je dobro poznat fenomen (119-121).

U skoro svim revijskim radovima se navodi da je su trikalcijum silikatni cementi, uključujući MTA i Biodentin, biokompatibilni materijali koji ne pokazuju citotoksičnost *in vitro* i ne izazivaju inflamacijsku reakciju kada se implantiraju bilo subkutano bilo u koštane strukture. Sa druge strane, ističe se njihov stimulacijski efekat na proliferišuće ćelije (141, 143, 160, 161, 163, 165, 166). Najveći broj radova se odnosi na efekat Biodentina na ćelije zubnih struktura, pre svega fibroblasta ili MSC izolovanih iz zubne pulpe. Jedini uporedivi rad sa našim rezultatima, a koji se odnosi na korišćenje istih ciljnih ćelija (L929), istog testa (MTT) i sličnog postupka kondicioniranja je skoro objavljena studija od strane Ranjkesh *i sar* (2018) (165). Ovi autori su ispitivali citotoksičnost nekoliko brzo vezujućih kalcijum silikatnih cemenata, uključujući Biodentin. Cementi su kondicionirani u DMEM kultivacionom medijumu 24 časa posle polimerizacije. Korišćene su tri različite koncentracije (razblaženja 1, 1:2 i 1:4) što odgovara našim

100%, 50% i 25% koncentracijama. Citotoksičnost je procenjivana posle 24 časa od inkubacije ćelija. Ni jedna koncentracija eluate Biodentina nije pokazivala citotoksični efekat. Osnovna razlika između našeg eksperimentalnog modela i modela Ranjkesh *i sar.* (165) se odnosila na odnos površine materijala prema zapremini medijuma koja je kod njih iznosila 0.5cm<sup>2</sup>/ml. Na osnovu ovoga se može zaključiti da je njihov koncentrovani KM bio više od 4 puta razblaženiji u odnosu na naš medijum. Takođe ovi autori su filtrirali medijum koji je na taj način bio oslobođen mikročestica i nisu dodavali FCS u kondicionirani medijum, što smo i mi nismo činili, ali je njihova kontrola takođe bio DMEM medijum bez suplentacije serumom. Kada se ovako ekstrapolirani rezultati uporede onda se zapaža da su u komparabilnim koncentracijama dobijeni isti ne-citotoksični efekti.

Girauld *i sar* (2018) (164) su ispitivali efekat tri trkalcijum silikatnih cementa (Biodentin, TheraCal, and Xeno III) na fibroblaste izolovane iz humane zubne pulpe. Cementi su kondicionirani 20 min. nakon polimereizacije u toku 24 časa. Odnos površine materijala u odnosu na medijum za kondicioniranje (MEM) je bio znatno manji u odnosu na preporuke ISO standarda i iznosio je 0.05 cm<sup>2</sup> /mL. Fibroblasti su tretirani sa KM 4, 24 i 48 časova. Nisu pokazali citotoksični efekat ni jednog od ispitivanih cementa ni u jednom periodu kultivacije. Međutim, kada su ćelije tretirane sa eluatima materijala u toku 3, 6 i 9 dana, pokazan je stimulacijski efekat Biodentina na proliferaciju fibroblasta, proporcionalan dužini inkubacije, što je uporedivo sa našim rezultatima. Rezultati proliferacije su bili u korelaciji sa povećanom produkcijom VEGF, TGF-beta i FGF-2.

Nikfarjam *i sar* (229) su ispitivali efekte KM Biodentina na fibroblaste uspostavljene iz zubne pulpe. Površina diskova Biodentina u odnosu na ml medijuma za kondicioniranje je iznosila u rasponu od oko 15mm<sup>2</sup> do 73mm<sup>2</sup>, što je značajno manje u odnosu na naše eksperimentalne uslove. Kondicioniranje je trajalo 4 dana, a nakon svakih 24 časa medijum je zamenjivan svežim medijumom. Sakupljeni eluati su pulovani a zatim filtrirani pre korišćenja u test sistemima. Autori su pokazali da ni jedna koncentracija KM Biodentina nije ispoljavala citotoksični efekat. Interesantno je da je najmanja koncentracija eluate povećavala vijabilnost fibroblasta što nije bilo posledica povećane proliferacije ćelija, procenjivano na osnovu ugradnje bromodeoksiuridina. Poggio *i sar.* (2015) (163) su ispitivali citotoksični efekat Biodentina na modelu mišje odontogene ćelijske linije (MDPC-23) i nisu našli smanjenje vijabilnosti, niti znake nekroze i apoptoze. Ovi rezultati su teško poredivi sa našim pošto su autori koristili dvokomponentni sistem za kulturu sa insertom kojim se proverava efekat difuzibilnih solubilnih produkata. Količina nanetog materijala na membranu umetka (inserta) je iznosila 300 mikrolitara a zapremina medijuma je iznosila 1 ml. Ćelije su kultivisane u toku 24, 48 i 72 časa. Promena u vijabilnosti nije detektovana ni u jednom od ispitivanih vremenskih termina. Na 3D modelu iste ćelijske linije Perard *i sar* (166) nisu našli promene u vijabilnosti ćelija. Vijabilnost je inače procenjivana na osnovu aktivnosti alkalne fosfataze kada su 3D sfere kultivisali sa filtriranim eluatom Biodentina, pripremljenog od svežeg Biodentina pri kultivaciji od 24 časa (0.5cm<sup>2</sup>/ml). Odsustvo bitnijeg efekta Biodentina na citotoksičnost i proliferaciju humanih SHED matičnih ćelija su pokazali Araujo *i sar.* 2018 (167). Međutim, njihov protokol pripreme KM Biodentina se razlikovao od dosadašnjih. Naime oni su sveže pripremljen cement kultivisali u medijumu za kulturu ovog tipa MSC (alpha-MEM medijum sa dodatkom 10% FCS) u koncentraciji 1 mg/mL. Kondicioniranje je trajalo samo 1 sat na 37°C a zatim su eluati filtrirani. SHED ćelije su inkubirane 1, 3, 5 i 7 dana. Vijabilnost je

procenjivana pomoću MTT testa a proliferacija merenjem ukupnih proteina u ćelijama nakon kultivacije.

Attik i saradnici (168) su pripremili talog (pelet) od Biodentina na taj način što su sveže polimerizovani cement kultivisali u medijumu za ćelijske kulture. KM Biodentina su centrifugirali, odlili supernatant a na talogu su kultivisali osteoblastnu ćelijsku liniju (MG63). Inkubacija ćelija na mikročesticama Biodentina je trajala do 5 dana. Autori su pokazali da Biodentin ispoljava blagi inhibicijski efekat na vijabilnost ćelija koji je iznosio oko 23% posle 5 dana kultivacije. Međutim, na osnovu ISO standard za citotoksičnost (ISO 10993-5) (162), ovaj stepen smanjenja vijabilnosti se ne smatra citotoksičnim efektom.

Kao što se moglo zaključiti iz prethodnih publikacija, najveći broj eksperimenata u kojima nije detektovana citotoksičnost Biodentina je pokazana sa filtriranim KM a inicijalne količine Biodentina su bile oko 5 do 20 puta manje od naših i zbog toga ovi radovi mogu biti uporedivi sa najnižim koncentracijama filtriranog B-KM, a koji u našim eksperimentalnim uslovima nisu imale citotoksični efekat niti su bitnije menjali proliferaciju L929 ćelija.

Međutim, nekoliko radova govori o citotoksičnom efektu Biodentina. U tom kontekstu rezultati nedavno objavljenog rada Abuarqoub et al., 2020 (170) su najpribližniji našim rezultatima imajući u vidu stepen disocijacije sveže pripremljenog Biodentina tokom kondicioniranja. Naime ovi autori su resuspendovali prah polimerizovanog Biodentina u medijum za kulturu ćelija. Pokazali su da je Biodentin u koncentraciji od 20 mg/ml potpuno citotoksičan za MSC iz humanog periodontnog ligamenta. Deset puta manja koncentracija (2 mg/ml) nije pokazivala citotoksičnost. Zou *et al.*, 2013 (168) su ispitivali biokompatibilnost tri materijala za opturaciju kanala korena zuba, uključujući i Biodentin, na humanim gingivalnim fibroblastima, tako što su materijale kondicionirali 24 časa u DMEM medijumu. Odnos površine materijala u odnosu na zapreminu medijuma je iznosio  $250 \text{ mm}^2 / \text{mL}$ , što približno odgovara našim uslovima. Autori su pokazali smanjenje vijabilnosti ćelija ali i stimulaciju proliferacije posle 7 dana, kada su ćelije kultivisane na diskovima Biodentina. Kada su dentalne MSC iz zubne pulpe kultivisane na diskovima Biodentina, njihova vijabilnost posle 3 dana, procenjivana MTT testom, je bila smanjena za više od 70%. Pre postavljanja ćelija diskovi materijala su sušeni 48 časova. Nažalost, iz ovog rada se ne vidi koliki je bio odnos površine Biodentina u odnosu na zapreminu medijuma pa i rezultati koji su dobijeni nisu uporedivi sa našim.

Mehanizmi citotoksičnosti Biodentina nisu dovoljno proučeni. Na osnovu ekstrapolacije rezultata iz drugih studija može se pretpostaviti da je citotoksičnost izazvana toksičnim delovanjem visoke koncentracije kalcijumovih jona, promene u jonskoj aktivnosti ili prisustvu drugih toksičnih komponenti u B-KM. Pojedini autori veliki značaj pridaju baznom pH (169, 230, 231). To nije bio slučaj u našem eksperimentu pošto smo bazni pH B-KM podešavali na fiziološki pH od 7.4. U ovim citopatogenetskim mehanizmima značaj imaju i mikročestice koje su oslobođene iz materijala tokom kondicioniranja i direktne interakcije čestica sa ćelijama, što je važno u dizajniranju daljih istraživanja. Zbog toga su u ovom kontekstu značajni rezultati rastvorljivosti Biodentina u vodi i biološkim medijumima.

Nekoliko radova se bavi rastvorljivošću Biodentina. Kaup i sar. (198) su ispitivali rastvorljivost ProRoot MTA i Biodentina u vodi i fosfatnom puferu (PBS). Rastvorljivost je određivana posle

24 časa, 3 dana i 28. dana. Pre imerzije u vodu odnosno PBS, materijali su nakon pripreme prema uputstvu proizvođača inkubirani 24 časa u inkubatoru na 37<sup>0</sup>C. Interesantno je da je zapremina tečnosti bila nesrazmerno veća u odnosu na naš postupak kondicioniranja i iznosila je 160 ml. Rezultati, gubitka mase materijala su pokazali da je rastvorljivost Biodentina posle 24 časa iznosila 2.64%, posle 3 dana 3.70% a posle 28 dana 4.61%. Ovi rezultati su u saglasnosti sa ISO-6876:2001 standardom (232) koji propisuje da rastvorljivost materijala posle 24 časa u vodi treba da bude manja od 3%. Kada je kondicioniranje vršeno u PBS-u dobijeni su drugačiji rezultati. Osnovna razlika je što se u rastvoru pojavljivao beličast talog koji je identifikovan kao kalcijum hidroksiapatit. Interesantno je da je rastvorljivost Biodentina u PBS-u posle 24 časa bila veća i iznosila je 3.4% a posle 28 dana manja, najverovatnije zbog deponovanja kalcijum hidroksiapatita na Biodentin. Kumari i sar 2018 (199) su primenili sličan metod kondicioniranja Biodentina u dejonizovanoj vodi u manjoj zapremini (10 ml) i pokazali da solubilnost Biodentina posle 24 časa iznosi 1.97%, posle 3 dana 2.13% a posle 60 dana 5.50%. Koristeći identičan postupak, Sing i sar., 2015, (233) su pokazali da je solubilnost Biodentina posle 24 časa bila 2.74% a posle 60 dana solubilnost je bila 6.86%. Solubilnost Biodentina se povećava u kiseljoj sredini (234).

Mi smo u našim eksperimentima takođe pokazali prisustvo beličastog taloga sastavljenog od morfološki različitih čestica Biodentina. Količina taloga (mikročestica) je bila veća, posebno kada je kondicioniran sveže napravljen Biodentin i ona je bila srazmerna vremenskom periodu kondicioniranja. Veća rastvorljivost je svakako posledica toga što je sveže pripremljen Biodentin, zbog verovatno nepotpunog otvrdnjavanja, skloniji razgradnji. Međutim, u obzir treba uzeti i druge parametre, kao što su kompleksniji sastav medijuma u odnosu na vodu ili PBS ali i u pogledu razlike odnosu mase materijala i zapremine medijuma. Od značaja mogu verovatno biti i razlike u samoj inicijalnoj pripremi materijala.

Naš komparativni materijal, amalgam, je u višim koncentracijama A-KM pokazivao smanjenje vijabilnosti L929 ćelija kao posledica nekroze ćelija i dodatne inhibicije ćelijske proliferacije, što je u saglasnosti sa do sada objavljenim brojnim rezultatima o citotoksičnosti amalgama. Međutim, na naše iznenađenje, citotoksični efekat koncentrovanog A-KM je bio statistički značajno manji u odnosu na koncentrovani B-KM, a ova razlika se može objasniti većom solubilnošću Biodentina. Takođe, za razliku od Biodentina, amalgam nije pokazivao stimulacijski efekat na proliferaciju L929 ćelija.

Citotoksični efekti amalgama su najviše rađeni sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog veka i na ovu temu je napisano više stotina radova. Pre uvođenja MTT testa citotoksičnost je procenjena na osnovu broja ćelija, testa oslobađanja radioaktivnog Cr, testa ugradnje radioaktivnog timidina, agar- i filter difuzionih eseja i brojnih drugih metoda koje skoro da danas više nisu u upotrebi obzirom da su teške za statističku evaluaciju i komparaciju rezultata (235). Od mnogobrojnih publikacija mi smo odabrali neke radove i istraživanja koja mogu biti uporediva sa našim (236). Najveći problem u komparaciji tih publikacija se odnosi na različitost pripreme ekstrakata amalgama i sastava amalgama. Naš amalgam se osim žive sastoji od Cu, Ag i Sn, a ne sadrži Zn. Ove činjenice su vrlo značajne jer rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da joni Zn koji se oslobađaju iz amalgama u toku procesa korozije imaju najveći citotoksični efekat (237). U skladu sa ovim nalazima isti autori su pokazali da je Cu takođe citotoksičan, ali da nisu našli razlike u citotoksičnosti amalgama koji sadrži veći procenat Cu u odnosu na amalgame sa nižim procentom



Cu. Takođe, za razliku od manjih koncentracija Se, visoke koncentracije dodate u amalgam povećavaju njegovu citotoksičnost.

Citotoksičnost amalgama se smanjuje sa protokom vremena od pripreme materijala, što su pokazali i drugi autori (238) a takođe smo i mi potvrdili u ovoj studiji analizirajući efekte A-KM pripremljenog od otvrdnutog amalgama. Ovaj efekat se objašnjava povećanom oksidacijom površine amalgama koja povećava njegovu korozivnu otpornost i pospešuje dalju amalgamizaciju. Za razliku od naših rezultata, studija Klein i sar.1995 (239), nije pokazala citotoksični efekat KM pripremljenog od otvrdnutog amalgama na L929 ćelijama, niti smanjenje ćelijske proliferacije, na osnovu MTT testa i inkorporacije bromodeoksiuridina.

Za razliku od jona Zn i Cu, joni Hg i Ag pokazuju umerenu citotoksičnost, dok je Sn necitotoksičan. Šta više dodavanje Sn može da smanji citotoksičnost nekih amalgama. Amalgam koji smo koristili u našoj studiji ne sadrži Zn, pa se može pretpostaviti da se citotoksičnost pripisuje sinergističkom dejstvu Cu, Hg i Ag jona koji se oslobađaju u medijumu za ćelijske kulture ili druge biološke tečnosti (240). Najveća debata koja se u javnosti vodi povodom citotoksičnosti amalgama je pre svega usmerena na Hg, kao dominantnu komponentu amalgama. Uprkos nastojanju da se dokaže da je hronična ekspozicija jonima Hg koji se oslobađaju u dugom vremenskom periodu iz amalgamskih restauracija štetna po zdravlje, to ipak nije dokazano u mnogim studijama, pa se postavlja pitanje koliko je zabrana upotrebe amalgama u stomatologiji u nekim zemljama političko pitanje a ne pitanje struke (241).

U svakom slučaju količina amalgama koja se aplikuje u kanal korena zuba u toku retrogradnog punjenja je zanemarljivo mala u odnosu količinu amalgama koja se koristi kod zubnih restauracija.

## **5.2. Eksperimentalna studija: Modulacija produkcije citokina u kulturi**

Kao što je u uvodnom delu ovog rada definisano i u okviru rezultata kliničke studije više puta naglašeno, apikotomija je relativno česta hirurška procedura koja se primenjuje za uklanjanje PL kada je konvencionalni endodontski postupak lečenja ili reintervencije bio neuspešan (1, 103). Retrogradno punjenje kanala korena zuba je sastavni deo endodontske hirurške procedure i u tom kontekstu mi smo po prvi put u okviru randomizovane kliničke studije pokazali da je Biodentin efikasan trikalcijum silikatni cement za ovu namenu, što su uostalom pokazali i dosadašnji prikazi slučajeva u stomatološkoj literaturi (150-152). Na osnovu ovih rezultata u našoj studiji je postavljeno naučno pitanje da li i kako Biodentin utiče na procese inflamacije i imunske procese koji su od ključne važnosti u zarastanju PL. Poznato je da hirurški tretman kojim se odstranjuju PL predstavlja ozbiljnu traumu periapeksnog tkiva. Nakon toga dolazi do reparacije lezije, koja je dugotrajan proces i obično se završava tek posle godinu dana (219, 221).

Zarastanje najpre prolazi kroz fazu zapaljenja koja je praćena nakupljanjem inflamacijskih ćelija sa ciljem da se ukloni nekrotični debris i omoguće procesi regeneracije mekih tkiva (periodontalnog ligamenta) i koštanih struktura. Zarastanje mekotkivnih i koštanih struktura je uzajamno sinhronizovan proces (242). Histološke analize inflamacije u okviru procesa zarastanja pokazuju da su u periapeksnom tkivu prisutne svi tipovi inflamacijskih ćelija koje se viđaju i kod PL (neutrofili, makrofagi, limfociti). Broj inflamacijskih ćelija je značajno veći ako je faza

inflamacije produžena iz različitih razloga i tada predominiraju mononuklearne ćelije (makrofagi, T i B limfociti) u odnosu na polimorfonukleare (243). Najznačajniji razlog produžene inflamacije je nepotpun uspeh hirurškog lečenja, najčešće zbog nepotpune opturacije kanala korena zuba. Međutim, produženoj inflamaciji, pa i formiranju novih PL mogu doprineti i materijali za retrogradno punjenje. Delovi materijala mogu biti utisnuti u periapeksno tkivo jatrogeno u toku punjenja što se često dešava kod korišćenja amalgama i takve čestice mogu prouzrokovati dugotrajnu zapaljensku reakciju po tipu reakcije na strano telo (235). Od ne manjeg značaja mogu biti citotoksični produkti koji se iz materijala oslobađaju a o čemu ima relativno malo podataka. Najviše rezultata vezanih za ovaj problem je dobijeno iz eksperimentalnih modela na životinjama, pri čemu su najvredniji rezultati analize tkiva nakon direktne implantacije materijala u periapeksno tkivo ili nakon punjenja kanala zuba (242).

Ovakva istraživanja nije moguće sprovoditi na ljudima, zbog čega se moraju tražiti pogodni *in vitro* modeli. U ovom kontekstu mi smo odabrali originalan model da ekstrakt Biodentina ispitamo na ćelijama izolovanih iz PL. Ovaj model koji je uspostavljen u Institutu za medicinska istraživanja pre više godina omogućava različite vrste studija a posebno je pogodan za ispitivanje modulacijskih efekata stomatoloških materijala na produkciju citokina koji su od ključnog značaja za inflamaciju, imunski odgovor i reparaciju koštanog sistema (20, 25, 73, 92, 244). Zato smo dizajnirali model kultivacije ćelija izolovanih iz PL sa ukupnim kondicioniranim medijumom Biodentina. Shodno konceptu kliničke studije i studije citokompatibilnosti kontrolu su činile kulture sa KM pripremljenim od amalgama.

Pre nego smo napravili dizajn imunoloških istraživanja bilo je neophodno da ispitamo citotoksičnost KM ovih materijala kako bismo u studiju uključili necitotoksične koncentracije ekstrakata. Bez obzira na prethodne rezultate citotoksičnosti na L929 ćelijama, ovaj deo istraživanja je bio nužan jer odgovor PL ćelija, koji je dominantno sadržao mešavinu infiltrujućih inflamacijskih ćelija u različitom odnosu i koje nemaju proliferativna svojstva u kulturi, je mogao biti drugačiji u odnosu na L929 ćelije koje su spontano proliferišuće ćelije. Kao i u prethodnom eksperimentu, za procenu citotoksičnosti koristili smo MTT test, koji se inače široko koristi u istraživanjima citotoksičnog potencijala dentalnih materijala, uključujući i trikalcijum silikatne cimente (165, 245).

Pokazali smo da nerazblaženi (100%) i 75% B-KM izazivaju izrazito smanjenje metaboličke aktivnosti PL ćelija u MTT testu, 50% B-KM dovodi do umerene redukcije metaboličke aktivnosti, dok koncentracije od 25% i manje bitnije ne menjaju metaboličku aktivnost PL ćelija. Redukcija MTT aktivnosti je posledica smanjenja vijabilnosti PL ćelija obzirom da se radi o ne-proliferišućim ćelijama. Zbog toga je rezultat ovog testa istovremeno i pokazatelj stepena citotoksičnosti Biodentina. Na osnovu poređenja sa efektom amalgama u istom testu, zaključeno je da su citotoksičnost ispoljavale samo koncentracije od 100% i 75% A-KM, dok koncentracije od 50% i manje nisu bile citotoksične.

Ispitivanjem mehanizama citotoksičnosti pokazali smo da koncentrovani B-KM indukuje primarno nekrozu, dok koncentracije od 75% i 50% B-KM kao i obe citotoksične koncentracije A-KM indukuju primarno apoptozu PL ćelija. Različit tip ćelijske smrti, koji zavisi od doze, nije redak fenomen. Istakli bismo slične rezultate iz objavljene studije ispitivanja kondicioniranog medijuma Cu legure, gde su veće koncentracije ekstrakta izazivale nekrozu a manje koncentracije

apoptozu (246). Jedno od objašnjenja ovog fenomena je da veće koncentracije toksičnih komponenti u eluatu materijala blokiraju stvaranje ATP u mitohondrijama koji se odvija glikolitičkim putem. Kada su koncentracije toksičnih komponenti manje stvaranje ATP nije u potpunosti blokirano, ali koncentracije ATP nisu dovoljne da inhibiraju procese programirane ćelijske smrti, tj apoptoze (247).

Do sada nisu rađena ispitivanja o efektima Biodentina i amalgama na PL ćelije u kulturi pa ni na efekte drugih inflamacijskih ćelija zbog čega je teško naše konkretne rezultate upoređivati u spomenutom kontekstu. U prethodnom odeljku detaljno su komentarisani efekti ovih materijala na drugim ćelijama pa se grubo može izvesti zaključak da se radi o sličnim mehanizmima. Kada su u pitanju PL ćelije, treba naglasiti da su one kratkoživeće ćelije i zbog toga je njihova spontana apoptoza u kulturi velika, posebno granulocita i makrofaga (248), što su potvrdili i naši rezultati a što nije konkretno prikazano u ovom radu već u posebnoj publikaciji (Eraković i sar. International Endodontic Journal, 2020 in press).

Ključni i u potpunosti originalni rezultati ovog dela eksperimentalne studije se odnosio na efekte ne-citotoksičnih koncentracija kondicioniranih medijuma Biodentina i amalgama na produkciju citokina od strane PL ćelija. Odabrali smo po dve koncentracije KM od kojih veća predstavlja prvu ne-citotoksičnu koncentraciju odabranog na osnovu MTT testa (25% B-KM i 50% A-KM) a druge su dvostruko manje.

Na osnovu analize pro-inflamacijskih citokina i hemokina (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 i MCP-1) pokazali smo da oba KM inhibiraju njihovu produkciju na dozno zavisani način. Efekat amalgama je bio izraženiji ali rezultati dobijenih primenom većih koncentracija KM ne mogu biti u potpunosti upoređivi jer su koncentracije bile različite. Međutim, kada se uporede ekvivalentne koncentracije KM (25%) razlike nisu bile statistički značajne.

IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , koje proizvode različite inflamacijske i stromalne ćelije u PL, su predstavnici osnovnih pro-inflamacijskih citokina. Poseduju brojne funkcije koje se na nivou patofiziologije PL mogu sistematizovati u nekoliko najvažnijih aktivnosti povezanih sa procesima akutne i hronične inflamacije. Najznačajnije funkcije su stimulacija mobilizacije granulocita, monocita, T i B limfocita u periapeksno tkivo, aktivacija fagocitoze, pospešivanje ekspresije hemokina, hemokinskih receptora, citokina, adhezionih molekula i drugih bioloških medijatora koju su uključeni u kompleksne zapaljenske procese i osteolitičke mehanizme (249).

IL-8 je ključni hemoatraktant za neutrofilne granulocite (250), dok MCP-1 ispoljava istu funkciju mobilizacijom monocita (251). IL-6 je dominantno pro-inflamacijski citokin i stimulator akutnog odgovora, ali može, pod izvesnim uslovima, da ispoljava i suprotne anti-inflamacijske efekte (252). Naši rezultati pokazuju da je od svih pro-inflamacijskih citokina, produkcija IL-6 od strane PL ćelija pod uticajem Biodentina bila najviše smanjena. Suprotno našim rezultatima, rezultati koji su dobijeni na fibroblastima iz pulpe, su pokazali da ekstrakt Biodentina stimuliše produkciju IL-6 (253). Razlike se mogu tražiti u razlici u ciljnim ćelijama, različitim koncentracijama eluate Biodentina i dužine ćelijske inkubacije. Sa druge strane, funkcije IL-6 kod fibroblasta nisu iste kao što su u okviru inflamacije. U ovom kontekstu, nalaz Giraud-a i sar. (253) da osim povećane produkcije IL-6, ekstrakt Biodentina takođe dovodi do povećanja produkcije fibroblastnog faktora rasta-2 (FGF-2), vaskularnog endotelnog faktora (VEGF) i TGF- $\beta$ , ključnih

citokina koji pospešuju zarastanje pulpe. Suprotni rezultati su dobijeni i na modelu eksperimentalne PL u pacova, da Biodentin u inicijalnoj fazi stimuliše zapaljenske procese u periapexnom tkivu (254).

Ovi rezultati se mogu povezati sa inicijalnim citotoksičnim efektima Biodentina. U kasnijem periodu (od 7. do 60. dana nakon implantacije) ekspresija IL-6 se smanjuje što je praćeno povećanjem proliferacije fibroblasta i osteoblasta. Očito da se uzročno posledične veze između ovih fenomena ne mogu jasno iskristalisati obzirom da su u procese regeneracije periapexnog tkiva uključeni drugi biomolekuli pa tek treba dokazati da li je smanjenje produkcije IL-6 direktan ili indirektan fenomen. Naši rezultati su takođe suprotni sa rezultatima objavljenim od strane Corral Nuñez i saradnika (255) koji nisu pokazali modulaciju produkcije IL-1 $\beta$  i IL-6 od strane 3T3 mišjih fibroblasta, kultivisanih direktno na diskovima Biodentina. Očito da razlike mogu poticati od različite metodologije i različitih ciljnih ćelija kao i vremena merenja produkcije ovih citokina.

Podaci da necitotoksične koncentracije A-KM takođe inhibiraju produkciju pro-inflamacijskih citokina od strane PL ćelija je bio neočekivani fenomen, pošto najveći broj publikovanih radova na drugim modelima sa amalgamom pokazuju suprotne rezultate. Tako je na primer pokazano da čestice amalgama koje dospeju u periapexno tkivo u toku endodontskog hirurškog zahvata mogu uzrokovati hronične zapaljenske promene po tipu PL (256). Slično je pokazano da amalgam može dovesti do zapaljenskih promena u zubnoj pulpi koje su prolazne i vremenom se smanjuju (257). Dobijene razlike u efektima amalgama se mogu objasniti razlikama u eksperimentalnom pristupu. Pro-inflamacijski efekti zabeleženi u drugim studijama, suprotno efektima pokazanih u našem radu, se mogu tumačiti toksičnim efektima visokih koncentracija jona oslobođenih iz amalgama, koji mogu indukovati zapaljenske procese. Takva pretpostavka se može ekstrapolirati i na *in vivo* uslove, gde se može očekivati da nakon retrogradnog punjenja kanala korena oslobođene mikročestice amalgama mogu podstaći inflamacijske procese u obližnjem tkivu koje je sa materijalom u direktnom kontaktu. Međutim, vremenom ovaj proces oslobađanja citotoksičnih jona slabi pa mogu nadvladati povoljni anti-inflamacijski efekti (258). Suprotno ovim istraživanjima, mi smo koristili ne-citotoksične doze ekstrakta amalgama koji su ispoljili anti-inflamacijske efekte. Neretko su efekti nižih koncentracija nekih supstanci maskirani kada nadvladaju suprotni efekti visokih koncentracija. Treba naglasiti da bi korišćenje visokih koncentracija KM kako amalgama tako i Biodentina u našem modelu bilo beskorisno za proučavanje modulacijskih efekata ovih ekstrakata zbog indukcije smrti PL ćelija, pri čemu bi neki preformisani citokini mogli i pasivno da se oslobađaju iz mrtvih ćelija.

Osim anti-inflamacijskih svojstava ekstrakata oba materijala, pokazali smo da B-KM ispoljava značajna imunomodulacijska svojstva, od kojih su najznačajnija stimulacija produkcije Th2 citokina (IL-4, IL-5 i IL-33) i IL-10. Iako IL-33 nije tipičan Th2 citokin, mi smo ga svrstali u ovu grupu zato što je receptor za koji se on veže prvo detektovan na Th2 ćelijama. Kao što je istaknuto u Uvodu ekspresija Th2 citokina u PL je pokazana u više publikacija (20, 71, 92, 101, 244). Th2 ćelije imaju dominantnu ulogu u humoralnom imunskom odgovoru, posebno u sintezi IgE i IgG4, a pretpostavlja se da humoralni imunski odgovor karakteriše kasniju fazu razvoja PL kada su zapaljenski procesi u regresiji. (20, 259). Zajedno sa dokazanim ulogama IL-4 i IL-13, kao anti-inflamacijskih citokina, može se zaključiti da Biodentin smanjuje zapaljenske reakcije ne samo

delujući na produkciju pro-inflamacijskih citokina od strane ćelija urođene imunosti već i posredstvom Th odgovora.

Ekspresija IL-33 je pokazana u PL *in situ* (260) a takođe i u kulturama PL ćelija *in vitro* (92). IL-33, koji se naziva i alarmin, pripada IL-1 porodici citokina i po strukturi je sličan IL-18 i IL-1 $\beta$ . Sintetišu ga brojne ćelije u obliku biološki inaktivnog prekursora koji delovanjem kaspaze-1 biva sekretovan u obliku zrele forme. Kada se veže za specifičan receptor ST2, koji je ispoljen prvenstveno na tkivnim rezidentnim imunskim ćelijama (mastociti, tip 2 prirodne limfoidne ćelije, regulatorne T ćelije), Th1 i Th2 ćelijama i citotoksičnim limfocitima, aktiviraju se signalni putevi slični onima koje koristi IL-1 $\beta$ . Odgovor zavisi od tipa ćelije na kojoj je ispoljen ST2 receptor. IL-33 je ispoljen i kao nuklearni faktor u aktiviranim endotelnim ćelijama postkapilarnih venula. Kao što je naglašeno ovaj citokin je incijalno detektovan u modelima stimulacije Th2 odgovora, pre svega kod alergijskih bolesti. Međutim, kasnije je pokazano da je IL-33 snažan imunomodulator sa različitim aktivnostima kako na Th2, tako i na Th1 i T regulatorni imunski odgovor. Uključen je u patogenezu alergijskih bolesti, fibroze, infektivnih i hroničnih inflamacijskih bolesti (79).

Balans između Th1 i Th2 ćelija je već dugo poznat fenomen. Na osnovu činjenice da Th1 i Th2 citokini međusobno inhibiraju jedni druge moglo se očekivati da će ekstrakt Biodentina stimulišući Th2 odgovor inhibirati Th1 ali se na osnovu nivoa IFN- $\gamma$  i IL-12, ključnog citokina antigen-prezentujućih ćelija koji stimuliše produkciju IFN- $\gamma$ , to nije pokazalo kao tačna pretpostavka. Uloga Th1 ćelija u patogenezi i dalje ostaje nejasna. Iako brojne studije sugerišu njegovu pro-inflamacijsku ulogu, podaci na modelima miševa sa delecijom IFN- $\gamma$  su pokazali suprotnu ulogu (20, 65, 71, 244). Treba napomenuti da su nivoi i IFN- $\gamma$  i IL-12 u našim istraživanjima bili relativno niski zbog čega su za sagledavanje efekta Biodentina na Th1 odgovor neophodni bolji modeli.

Regulatorne T ćelija su osnovna populacija koja primarno inhibira imunski odgovor i inflamaciju. Ove efekte najviše ostvaruje posredstvom produkcije dva ključna imunoregulacijska citokina, IL-10 i TGF- $\beta$ . Ekspresija oba citokina je pokazana u PL u više publikacija (82, 95, 101). Naši podaci pokazuju povećanu produkciju IL-10 u supernatantima PL ćelijskih kultura stimuliranih B-KM, što je još jedna potvrda povoljnog efekta Biodentina na smanjenje imunskog odgovora i inflamacije a time i povoljnog toka na procese reparacije periapexnog tkiva nakon apikotomije. Do sada nisu objavljeni slični rezultati. Dve studije su pokazale da Biodentin povećava ekspresiju TGF- $\beta$  od strane fibroblasta pulpe zuba (164, 261), što je još jedan od mehanizama kojim ovaj trikalcijum silikatni cement utiče na supresiju inflamacije i podstiče zarastanje PL.

Imajući u vidu poznati koncept inflamacije i citokinske mreže u kojoj porodica Th 17 citokina ima značajnu pro-inflamacijsku ulogu, očekivali smo da će B-KM dovesti do smanjenja nivoa IL-17A i IL-23, citokina koji stimuliše proliferaciju i efektorske funkcije Th17 ćelija (262). Međutim, dobili smo suprotan nalaz da B-KM dovodi do povećanja nivoa IL-17A a da bitnije ne menja nivo IL-23. Poznato je da je IL-17 uključen u patogenezu PL putem multiplih mehanizama, prevashodno stimulacijom inflamacije, egzacerbacije PL i osteolize (84, 85, 263). Obzirom da je IL-17A uključen u odbranu od ekstracelularnih bakterija (264), moglo bi se pretpostaviti da Biodentin, povećanjem produkcije IL-17 takođe dodatano doprinosi povoljnom anti-mikrobskom efektu u PL. Međutim, ovu pretpostavku tek treba proveravati obzirom da je koncentracija IL-17A u supernatantima kultura PL ćelija bila relativno mala.

Kada se uporede efekti Biodentina i amalgama na produkciju Th citokina može se uočiti ključna razlika da A-KM ne menja produkciju ni jednog od ispitivanih citokina. Do sada nije objavljena ni jedna studija koja se odnosi na efekte amalgama na citokinsku mrežu. Možda je najrelevantniji rad koji bi mogao biti uporediv sa našim rezultatima onaj koji su objavili Shendle i sar (265). Autori su ispitivali efekte dentalnog amalgama na produkciju citokina u kulturama humanih mononuklearnih ćelija iz periferne krvi zdravih dobrovoljaca u prisustvu sveže pripremljenog amalgama, otvrdnutog amalgama ili A-KM. Kulture su stimulisali sa LPS-om, fitohemaglutininom ili stafilokoknim enterotoksinom. Pokazano je da sveže pripremljen amalgam i A-KM smanjuju produkciju IFN- $\gamma$  i IL-10, uz istovremeno povećanje produkcije TNF- $\alpha$ . Sa druge strane, nije bilo efekta na nivoe IL-2, IL-6, i granulocitno-makrofagni faktor stimulacije kolonija. Amalgam, koji je testiran 6 nedelja od pripreme nije bitnije uticao ni na jedan od ispitivanih citokina. Autori su proveravali i koji bi od metalnih jona koji se oslobađaju iz amalgama mogli imati uticaj na produkciju citokina. U A-KM su detektovali jone Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, i Sn<sup>2+</sup>, pa su soli ovih metala dodavali u kulture. Pokazali su da Cu<sup>2+</sup> i Hg<sup>2+</sup> smanjuju nivoe IFN- $\gamma$  i IL-10, joni Hg<sup>2+</sup> povećavaju koncentraciju TNF- $\alpha$ , dok joni Sn<sup>2+</sup> nisu ispoljavali modulacijski efekat. Kada poredimo efekat TNF- $\alpha$  (smanjenje produkcije u našoj studiji, povećanje produkcije u studiji Shendle i sar) mogu se izvući i neke pretpostavke koje bi ove razlike mogle objasniti. Prvo radi se o drugom modelu (nestimulisane inflamacijske PL ćelije) u odnosu na aktivisane mononuklearne ćelije iz krvi. Druga razlika se odnosi na koncentraciju A-KM (u našoj studiji najmanje dvostruko razblažen, u njihovoj koncentrovan). Treća razlika je povezana sa različitim odnosom mase amalgama u odnosu na zapreminu medijuma (u našoj studiji 0.2g/ml a u njihovoj 1.92g/ml). I poslednja razlika se odnosi na vreme kultivacije ćelija (24 časa u našoj studiji, 48 časova u studiji Shendle i sar.).

Neke studije, koje mogu delimično biti komparabilne sa našom, su se bavile efektima amalgama *in vivo* ili efektima žive, ključne komponente amalgama. U tom kontekstu Soleo *et al.* (266) su pokazali povećanje broja CD4<sup>+</sup> ćelija u perifernoj krvi kod pacijenata sa amalgamskim restauracijama uz istovremeno smanjenje nivoa IL-8 u serumu. Podzimek i sar. (267) su ispitivali produkciju citokina (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ ) od strane humanih limfocita u kulturama tretiranih solima žive i našli povećanu produkciju TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . Ilday i sar (268) su u okviru kliničke studije pokazali poboljšanje periodontalnog nalaza kod pacijenata posle uklanjanja amalgama iz zuba ali objektivno kliničko poboljšanje nije koreliralo sa promenama nivoa IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  u gingivalnoj sulkusnoj tečnosti. Ovi nalazi su u suprotnosti sa nalazima druge studije, koncipirane na isti način, u kojoj je pokazano smanjenje nivoa IFN- $\gamma$  u krvi nakon uklanjanja amalgama iz zuba, što bi moglo da ukazuje da amalgam može da stimuliše Th1 odgovor kod pacijenata (269).

Značajan deo naših rezultata se odnosio na modulacijski efekat Biodentina na promenu balansa RANKL/OPG, pri čemu je pokazan njegov uticaj na osteoprotektivne procese, a što nije nađeno kod amalgama. Povećanje odnosa RANKL/OPG pod uticajem B-KM je bilo na račun smanjenja nivoa RANKL u kulturama PL ćelija a bez bitnije promene u nivou OPG. RANKL je inicijalno otkriven kao membranski ligand koji vezivanjem za RANK dovodi do diferencijacije osteoklasta i aktivacije njihovih osteolitičkih mehanizama. RANK je ispoljen na membrani monocita i makrofaga kao i na prekursorima osteoklasta. Kasnija istraživanja su pokazala da se RANKL nalazi i u sekretornoj formi i da ga produkuju osteoblasti, fibroblasti, makrofagi, kao i aktivisani T i B limfociti (270). Delovanje RANKL sprečava OPG koji je njegov prirodni inhibitor. OPG je

ispoljen na pojedinim epitelnim ćelijama, endotelnim ćelijama i pojedinim limfoidnim ćelijama (271). Zastupljenost ovih ćelija je relativno mala u populaciji PL ćelija pa je to i razlog što su koncentracije OPG niske kao što smo to i ranije pokazali (92).

Efekat Biodentina na smanjenje produkcije RANKL od strane PL ćelija može biti direktan ili indirektan. Indirektan efekat je uglavnom posredovan delovanjem drugih citokina. Ranije je pokazano da TNF- $\alpha$  stimuliše osteoklaste tako što povećava ekspresiju RANKL u makrofagama i stromalnim ćelijama (272). Zhang i sar. (273) su pre toga pokazali postojanje još jednog mehanizma delovanja TNF- $\alpha$  na RANKL, koji se pre svega odnosi na interferenciju sa signalnim putevima uključenih u njegovu aktivaciju. Nasuprot tome, IL-4 direktno sprečava diferencijaciju osteoklasta iz njihovih prekursora posredstvom STAT 6 (*engl.* signal transducer and activator of transcription) signalnog puta. Osim toga, IL-4 smanjuje ekspresiju RANK i povećava ekspresiju OPG u osteoblastima (274). IL-10 i TGF- $\beta$  inhibiraju produkciju RANKL i povećavaju produkciju OPG (275). IL-10 direktno inhibira osteolitičke procese tako što blokira signalne puteve posredovane NFATc1, c-Fos and c-Jun, koje inače indukuje RANKL u osteoklastima i njihovim prekursorima (276). Na osnovu ovih nalaza može se pretpostaviti da Biodentin inhibicijom TNF- $\alpha$  i povećanjem produkcije IL-4 i IL-10 može na indirektan način da dovede do smanjenja produkcije RANKL, što su sve ključni mehanizmi stimulacije osteogene regeneracije nakon endodontskih hirurških intervencija.

Do sada nisu objavljene ni slične studije sa drugim vrstama MTA cemenata. Jedna studija je pokazala da MTA *in vivo* smanjuje ekspresiju pro-inflamacijskih citokina CCL5, IL-1 $\alpha$  i IFN- $\gamma$  u pulpi zuba kod miševa (277). Druga *in vivo* studija, takođe na miševima, je pokazala da MTA pospešuje humoralni imunski odgovor ali da nema bitniji uticaj na produkciju citokina od strane memorijskih T ćelija (278). Kada je MTA korišćen za zatvaranje eksperimentalnih perforacija kod miševa pokazano je da u ranoj fazi nakon tretmana dolazi do povećane produkcije pro-inflamacijskih citokina u prve dve nedelje. U kasnijoj fazi (posle 3 nedelje) došlo je do smanjenja produkcije ovih citokina, verovatno zbog povećanja produkcije IL-10 (279). *In vitro* eksperimenti na sarkomskoj ćelijskoj liniji su pokazali da tri cementa koji se koriste u endodontskoj hirurgiji kod retrogradnog punjenja kanala korena (Ca hidroksid, super EBA i MTA) indukuju ekspresiju pro-inflamacijskih citokina (280). Na osnovu svega, jasno se može zaključiti da heterogenost prikazanih rezultata koji su dobijeni na veoma različitim modelima, nameće potrebu da se ovaj značajni anti-inflamacijski, imunomodulacijski i osteoprotektivni mehanizmi Biodentina, a moguće i drugih MTA-tipova cementa bolje izuče, između ostalog i zbog njihove široke i sve veće kliničke primene. A o mehanizmima, kojima ovi materijali ostvaruju modulacijski efekat na ćelije imunskog sistema skoro da se ništa ne zna.

### 5.3. Eksperimentalna studija: Efekat ekstrakta Biodentina i amalgama na osteoblastnu diferencijaciju PL-MSC

Jedno od najvažnijih pitanja kojim smo se bavili u ovom delu projekta je da li i u kom obimu Biodentin ispoljava osteoinduktivni potencijal na modelu MSC izolovanih iz PL i da li se slični efekti uočavaju kod amalgama, kao kontrolnog materijala. Efekat je procenjivan na osnovu formiranja mineralizovanih jezgara u kulturi i ekspresije 9 gena karakterističnih za osteoblastnu diferencijaciju i proliferaciju MSC.

Međutim, pre nego smo započeli ključne eksperimente ove studije bilo je neophodno okarakterisati fenotipska i funkcionalna svojstva PL-MSC. Ove ćelije su najviše izučavane od strane saradnika iz IMI VMA (12-14). Ono što je do sada publikovano i što je dodatno potvrđeno u ovom radu je da PL-MSC imaju sva osnovna svojstva koje imaju i druge MSC a koja su objedinjena u kriterijumima za definisanje matičnosti mezenhimskih ćelija (180-185). Ovi kriterijumi uključuju klonogenost, visoku ekspresiju nekoliko karakterističnih markera MSC kao što su CD73, CD90 i CD105 i CD166, ekspresije nekoliko dodatnih markera MSC (CD146, CD39, CD56) uz odsustvo ekspresije markera hematopoetske loze, kao i sposobnost diferencijacije u adipocite, hondroците i osteoblaste (185). Na osnovu ovih parametara PL-MSC imaju sve attribute MSC, koji su inače karakteristični i za MSC iz drugih dentalnih struktura (180-184). U svojoj doktorskoj disertaciji (281), Marković je detaljno analizirao fenotipska svojstva nekoliko PL-MSC linija i upoređivao sa publikovanim podacima o karakteristikama MSC izolovanih iz zdravog periodontalnog ligamenta. Ono što je uočljivo, a što se ponavlja i kod PL-MSC korišćenih u ovom radu, je relativno mala procentualna zastupljenost STRO-1<sup>+</sup> i SSEA4<sup>+</sup> ćelija koje predstavljaju ključne markere matičnih ćelija mezenhimskih tkiva, posebno MSC iz koštane srži i koji su značajno više ispoljeni na MSC iz zdravog periodontalnog ligamenta. Međutim, kao što pokazuju naši nalazi, to nije bilo u korelaciji sa sposobnošću osteoblastne diferencijacije ovih linija. Ostaje nerešeno pitanje heterogenosti PL-MSC, koja se dodatno menja sa dužinom kultivacije (281), što je izazov za dalja istraživanja

Postavlja se pitanje da li razlika u ekspresiji pojedinih markera PL-MSC u odnosu na MSC iz zdravog periodontalnog ligamenta potiče i zbog razlike u poreklu MSC. Kod zdravog periodontalnog ligamenta MSC su lokalizovane oko malih krvnih sudova (282). Istraživanja Markovića (281) takođe pokazuju lokalizaciju PL-MSC oko krvnih sudova, predominantno kapilara u granulomatoznom tkivu lezija, koje topografski i morfološki odgovaraju pericitima. Pretostavka da su periciti zapravo tkivne MSC je testirana i potvrđena u brojnim radovima (283, 284). Međutim, u granulomu PL, u kome postoji čitava mreža novoformiranih krvnih sudova, periciti mogu predstavljati i MSC koje u toku inflamacije povećano migriraju iz krvi u tkivo. Zbog svega navedenog, MSC iz inflamiranog tkiva mogu imati i drugačije funkcije u odnosu na zdravo tkivo.

Da bi se ovaj proces na pravi način razumeo, neophodno je evaluirati procese zarastanja rane nakon apikotomije, retrogradne opturacije kanala zuba i uklanjanja PL. Na prvu koagulacijsko/inflamacijsku fazu, praćenu stvaranjem fibrinskog koagulumu i akumulacijom različitih inflamacijskih ćelija, nadovezuje se druga faza koju karakteriše formiranje novog tkiva. Novoformirano tkivo se sastoji od proliferisanih fibroblasta, endotelnih i epitelnih ćelija, uz



stvaranje privremenog ekstracelularnog matriksa sastavljenog iz fibronektina i polimerizovanog kolagena. Paralelno sa razvojem krvnih sudova dolazi do formiranja pericita koji imaju potencijal diferencijacije u različite ćelijske linije, uključujući i osteoblaste (242, 285, 286). Ovi procesi stimulišu i proliferaciju endogenih osteoblasta koji su zaduženi za formiranje nove kosti. Zbog svega navedenog, model uticaja Biodentina na osteoinduktivni potencijal PL-MSK ima svoje patofiziološko opravdanje.

Ono što je bio prvi zadatak ove eksperimentalne studije je da odaberemo necitotoksične koncentracije KM Biodentina i amalgama, koje su korišćene u ključnim eksperimentima osteogeneze. Pokazali smo da su veće koncentracije KM oba materijala citotoksične, slično kao i kod L929 ćelija i PL ćelija, što govori o zajedničkom citopatogenetskom mehanizmu. O tome je detaljno komentarisano u delu diskusije o biokompatibilnosti. U ovom odeljku je bitno ponovo citirati rad (170) u kome je pokazan sličan fenomen citotoksičnog efekta većih koncentracija Biodentina na humanim MSC izolovanih iz periodontalnog ligamenta. Takođe, pažnju zavređuju radovi u kome je pokazan citotoksični efekat amalgama na ćelijskim linijama uspostavljenih iz periodontalnog ligamenta i na osteoblastima (257), odnosno na ćelijama periosta i osteoblastima (287).

U odabiru necitotoksičnih koncentracija ekstrakata ovih materijala za dalja istraživanja bili su veoma bitni nalazi da su koncentracije B-KM (10-30%), za razliku od istih koncentracija A-KM, stimulisale proliferaciju PL-MSK na dozna zavisian način, slično kao kod L929 ćelija.

Ključni rezultat ovog dela eksperimentalne studije studije je potvrda naše hipoteze da KM Biodentina stimuliše diferencijaciju PL-MSK u pravcu osteoblasta u osnovnom  $\alpha$ -MEM medijumu sa dodatkom 10% FCS i dodatno podstiče osteoblastogenezu u kulturama PL-MSK u medijumu sa suboptimalnom koncentracijom osteoinduktivnih komponenti. Za razliku od Biodentina, amalgam nema ova svojstva ali dovodi do indukcije nekoliko gena koji su bitni za matriksnu mineralizaciju i proliferaciju.

Diferencijacija MSC u osteogenu liniju je posredovana složenim interakcijama između ekstraćelijskih medijatora i hormona sa njihovim receptorima na membrani MSC, što posledično dovodi do aktivacije unutarćelijskih sprovodnih signala i transkripcijskih faktora (288, 289). Od brojnih transkripcijskih faktora ključnu ulogu ima multifunkcijski RUNX2, koji je neophodan za kontrolu diferencijacije MSC u hondroblaste i osteoblaste, proliferaciju MSC i ekspresiju brojnih gena koji kodiraju produkciju proteina ekstracelularnog matriksa. RUNX2 ostvaruje ove funkcije kroz recipročnu regulaciju nekoliko glavnih signalnih puteva kao što su FGF, Hedgehog, WNT i Pthlh, odnosno transkripcionih faktora kao što su SP7 i Dlx5. RUNX2, zajedno sa SP7 (osteriks) i kanonskim WNT/beta kateninskim signalnim putem indukuje diferencijaciju proosteoblasta u nezrele osteoblaste istovremeno blokirajući diferencijaciju MSC u hondrocite (290-292). WNT su sekretorna familija od 19 proteina od kojih WNT2 pripada kanonskoj podfamiliji (292). Kanonski WNT signalni put se aktivira na taj način što se WNT proteini vežu za WNT receptore na membrani ćelija kao što su molekuli iz porodice FZD i LRP5/6 koreceptora. Na taj način se vrši transkripcija i stabilizacija specifičnih gena posredstvom beta katenina koji se iz citoplazme translocira u jedro. Beta katenin između ostalog stimuliše transkripciju *RUNX2* i *SP7* (190, 293). To je bio i razlog zašto smo ova tri gena (*RUNX2*, *SP7* i *WNT2*) prvo i objedinjeno analizirali.

Kada se analizira ekspresija ovih gena u potpunom osteoinduktivnom medijumu uočava se zajednički obrazac ekspresije. Naizraženija je ekspresija *RUNX2* u ranoj fazi (povećanje i do 40 puta u odnosu na kontrolu) koja je istovremeno praćena umerenom ekspresijom druga dva gena. U kasnoj fazi ekspresija *RUNX2* i *SP7* se smanjuje, odnosno potpuno blokira, kada je u pitanju *WNT2*. Sličan obrazac ekspresije je dobijen u kulturama PL-MSC u suboptimalnom osteogenom medijumu, stim što je nivo ekspresije bio znatno manji. Dodatak veće koncentracije (30%) ukupnog KM Biodentina, (koji je ispoljavao snažniji uticaj u odnosu na 10%, pa će kasnije uglavnom biti komentarisani efekat veće koncentracije), je snažno stimulisao ekspresiju *RUNX2*, umereno ekspresiju *SP7* a inhibirao ekspresiju *WNT2* u PL-MSC kulturama kada su gajene u osnovnom medijumu i potencirao ekspresiju sva tri gena u SOM kulturama. Međutim, obrazac ekspresije je bio drugačiji. Za razliku od smanjene ekspresije u kasnoj fazi u odnosu na ranu fazu u SOM kulturama, B-KM je imao suprotan efekat u BM kulturama u kojima je povećanje bilo izraženije u kasnijoj fazi diferencijacije. Sa druge strane, ekspresija *WNT2* je bila potpuno inhibirana u ranoj fazi. Ovi nalazi ukazuju na prolongiranu aktivaciju ovih gena, što bi govorilo o njihovoj različitoj dinamici transkripcije u odsustvu osteogenih stimulusa u medijumu. Očekivalo bi se da će ovakvi eksperimentalni uslovi usporiti i mineralizaciju u PL-MSC kulturama, koja je određivana nakon 3 nedelje, ali to nije pokazano u ovom istraživanju.

Odsustvo uticaja ekstrakta amalgama na ekspresiju *RUNX2* i *SP7* je u saglasnosti sa nalazima da amalgam nije uticao na osteoblastogenu diferencijaciju PL-MSC kada je taj proces procenjivan na osnovu bojenja mineralizovanih jezgara sa Alizarin crvenim.

Tri važna gena koja su povezana sa mineralizacijom matriksa su *BGLAP*, *COL1A1* i *AP*. Za *BGLAP* smo pokazali da je njegova ekspresija, nezavisno od eksperimentalnih uslova, bila veća u kasnoj fazi ćelijske diferencijacije. Ekstrakt Biodentina je doveo do povećanja ekspresije *BGLAP* kako u BM tako i SOM, koja je bila čak veća nego ekspresija u potpunom osteogenom medijumu. Interesantno je da su manje koncentracije A-KM značajno više indukovale ekspresiju *BGLAP* u BM bez osteogenih faktora nego B-KM, što je bilo suprotno u SOM kulturama.

Ekspresija *COL1A1* u potpunom OOM je bila izraženija u ranoj fazi i značajno se smanjila u kasnoj fazi. Isti trend ekspresije je bio prisutan i u SOM kulturama. B-KM je pokazivao sličan uticaj na ekspresiju ovog gena u BM kulturama kao i na ekspresiju *RUNX2* (povećanje ekspresije u kasnoj fazi a potencijacija ekspresije u ranoj fazi PL-MSC diferencijacije u SOM kulturama). Ekstrakt amalgama je modifikovao i ekspresiju *COL1A1*, s tim što je kao i kod većine drugih gena, efekat manje koncentracije A-KM bio izraženiji u odnosu na veću koncentraciju. A-KM je smanjivao ekspresiju *COL1A1* (kasna faza) ali je stimulisao njegovu ekspresiju u obe faze u SOM kulturama.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da se ekspresija *BGLAP* i *COL1A1* povećava kako proces diferencijacije osteoblasta napreduje paralelno sa smanjenjem ekspresije *RUNX2* gena (190, 293, 294). Mi smo sličan efekat u OOM pokazali za ekspresiju *BGLAP* ali ne i za *COL1A1*, što se može povezati i sa razlikom u vremenskim terminima kada je ekspresija ovih gena procenjivana ali i sa tipom ćelija u kojima je ovaj fenomen proučavan.

Najznačajnija funkcija osteoblasta je produkcija tip I kolagena koji čini čak 90% koštanih proteina. Tip I kolagena je heterotrimerni protein koji se sastoji iz dva alfa1 (I) lanca i jednog alfa 2 (I) koji

su kodirani od strane *COL1A1* odnosno *COL1A2* genima (295). Na ekspresiju *COL1A1* direktno utiče *RUNX2* i u čemu dodatnu ulogu ima osteriks (296, 297). Ovi transkripcioni faktori deluju sinergistički na fosforilaciju p38 i ERK signalnih puteva koji su uključeni u transkripciju *COL1A1* (295-297).

*BGLAP* gen kodira protein osteokalcin (OCN), koji se dodatno naziva i koštani protein koji sadrži gama- karboksiglutaminsku kiselinu. OCN, zajedno sa osteonektinom (ON), pripada ne-kolagenim koštanim proteinima. Iako ova dva proteina čine samo 10% proteina kosti, vrlo su bitni za mineralizaciju kostiju i dinamiku stvaranja i razgradnje kosti (298). OCN tipično pripada kasnim markerima osteoblastne diferencijacije i u njima se primarno sintetiše. Rezidue gama-karboksiglutaminske kiseline, koji nastaju hidrolitičnom razgradnjom pro-osteokalcina, su mesta na OCN koji veže Ca i hidroksiapatit i na taj način vrši njihovo deponovanje u mineralizovani matriks (298). Na ekspresiju OCN utiču i mnogi drugi faktori, osim primarnih osteoblastnih transkripcionih faktora, među kojima značajnu ulogu ima parathormon (PTH) (299, 300). Sa druge strane, dobro je poznato, da solubilna forma OCN, koja ne sadrži gama-karboksiglutaminsku kiselinu, deluje poput hormona i učestvuje u brojnim fiziološkim i patološkim funkcijama, kao što su sekrecija insulina, pamćenje, muški fertilitet i rast tumora (299). Dosadašnja istraživanja su pokazala da OCN doprinosi formiranju kostiju i da pospešuje adherencu bioaktivnih cemenata za osteoblaste, što može imati i direktnu vezu sa Biodentinom (301). Osim toga, OCN pospešuje proliferaciju osteoblasta i zarastanje kostiju oko kompozita na bazi hidroksiapatita i kolagena (302).

Za razliku od *COL1A1*, ekspresija *ALP* je pratila obrazac ekspresije *BGLAP* (veća ekspresija u kasnoj fazi u odnosu na ranu) u svim eksperimentalnim uslovima. B-KM je povećavao ekspresiju gena za *ALP* kako u bazalnom tako i u suboptimalnom osteogenom medijumu. A-KM nije uticao na ekspresiju *ALP* u bazalnom medijumu ali je povećavao ekspresiju u SOM kulturama.

*ALP* je prvi enzim koji je identifikovan u procesima osteogeneze kao ključni molekul u procesima fiziološke i patološke kalcifikacije (302). Zbog jednostavnih metoda bazirane na merenju aktivnosti enzima, histohemijskoj identifikaciji ili proučavanju genske ekspresije, *ALP* predstavlja po pravilu obavezan marker za proučavanje osteogeneze i najveći broj radova koji se odnose na uticaj stomatoloških materijala na procese diferencijacije dentalnih MSC ili regeneraciju kostiju se upravo odnosi na dokazivanje *ALP* (303-305). Koliki je značaj *ALP* pokazuju podaci da dokazivanje indukcije mRNK za *ALP* kao i određivanje *ALP* aktivnosti u okviru in vitro osteogene diferencijacije predstavlja jedini sveobuhvatni pokazatelj kapaciteta za formiranje kostiju in vivo (306). Ekspresija *ALP* u toku osteoblastne diferencijacije dentalnih MSC je proučavana u brojnim radovima (303-305,307). Ovaj marker se češće spominje kao rani marker osteoblastne diferencijacije zbog značaja *ALP* pre svega za započinjanje mineralizacije. Tako je na primer u kulturama MSC izolovanih iz dentalne pulpe najveća ekspresija zabeležena 7. dana, da bi 14. dana došlo do značajnog smanjenja u odnosu na ranu fazu (303). Ova razlika u odnosu na naše rezultate se može tumačiti drugačijom dinamikom osteogene diferencijacije i mineralizacije koja duže traje, što se poklapa i sa dinamikom promene ekspresije drugih gena u BM kulturama u prisustvu Biodentina.

Interesantan je rad Hasegawai sar. (308) koji su immortalizovali 3 fibroblastne ćelijske linije nakon izolacije iz periodontalnog ligamenta, od kojih je jedna imala sposobnost osteoblastne

diferencijacije i formiranja mineralizovanih jezgara. Druge dve linije nisu imale ta svojstva uprkos ekspresiji *RUNX2*, *osteriksa*, *OCN*, *ON*, *COL1A1*, *ALP* i receptora za *PTH*. Ovi rezultati bi se mogli povezati i sa heterogenošću naših PL-MSC kultura imajući u vidu njihov fenotip i osnovni potencijal diferencijacije. Moguće je da amalgam upravo deluje stimulacijski na ekspresiju *BGLAP*, *COL1A1* i *ALP* u klonovima PL-MSC linija koje nemaju potencijal formiranja kalcijumovih depozita.

U okviru ovog projekta izučavali smo i efekat KM naših materijala na ekspresiju tri citokina koji imaju bitnu ulogu u procesima proliferacije i diferencijacije MSC u osteoblaste kao i za različite funkcije osteoblasta. To su *BMP2*, *TGF- $\beta$*  i *FGF2*.

*BMP-2* pripada porodici *BMP* proteina koje imaju svojstva citokina sa dosta sličnih i preklapajućih funkcija. Ovi proteini iz šire porodice superfamilije *TGF-beta* su najpre izolovani iz mineralizovanog koštanog matriksa. *BMP-2*, *BMP-4*, *BMP-5*, and *BMP-7* stimulišu osteoblastnu diferencijaciju MSC i indukuju formiranje koštanog tkiva, od kojih je *BMP-2* pokazuje najveću aktivnost (309, 310). *BMP-2* ostvaruje svoje funkcije vezivanjem za membranski receptor preko koga se aktivacijska signalizacija prenosi na grupu *Smad* proteina koji su lokalizovani u citoplazmi. *Smad* su i zajednički molekuli za signalni put koji je posredovan sa *TGF- $\beta$* , zbog čega se ova dva citokina najčešće zajedno spominju u procesu diferencijacije. Od njih, *Smad1* i *Smad5* su povezani sa osteoblastnom diferencijacijom između ostalog i posredstvom transkripcije *RUNX2*, *SP7* i *ALP* (311). Zbog svih navedenih svojstava, u cilju pospešivanja regeneracije kosti intenzivno se ispituju bioregenerativne matrice u koje se ugrađuje *BMP-2* (312).

*TGF- $\beta$*  je multipotentni citokin (faktor rasta) koji je ispoljen u brojnim tkivima i u kojima ostvaruje različite funkcije kao što su ćelijska proliferacija, diferencijacija, migracija, adhezija i sinteza ekstracelularnog matriksa (313-315). U okviru koštanog tkiva produkuju ga osteoblasti i osteociti ali je njegova uloga u osteogenezi veoma kompleksna. Pokazano je da indukuje migraciju MSC, pospešuje ranu osteoblastnu diferenciju, a inhibira kasnu fazu diferencijacije, pospešuje njihovu proliferaciju i mineralizaciju (314). Često ovi procesi zavise od koncentracije *TGF- $\beta$* , sastava medijuma za ćelijske kulture koji može da sadrži različite koncentracije endogenog *TGF- $\beta$*  u serumu, vrste ćelija i njihove gustine u kulturi, pa su neretko rezultati kontradiktorni (316).

Naši rezultati pokazuju veću ekspresiju *BMP-2* u kompletnom OOM u ranoj fazi diferencijacije PL-MSC i inhibiciju u kasnoj fazi, što je bilo suprotno u odnosu na ekspresiju *BMP-2* u SOM kulturama (stimulacija ekspresije u kasnoj fazi). Ekspresija mRNA za *TGF- $\beta$*  je imala recipročan obrazac ekspresije u odnosu na *BMP-2* (veća ekspresija u ranoj fazi u SOM kulturama a veća ekspresija u kasnoj fazi u OOM kulturama). B-KM je stimulisao ekspresiju gena za oba citokina u BM i SOM kulturama u kasnoj fazi diferencijacije. A-KM je znatno manje uticao na ekspresiju *BMP-2* ali je snažnije stimulisao ekspresiju *TGF- $\beta$*  u odnosu na B-KM, kako u BM tako i u SOM kulturama i to izraženije u ranoj fazi diferencijacije. Ovi nalazi sugerišu da je ekspresija *BMP-2* značajnija u ranoj fazi, a *TGF- $\beta$*  u kasnijoj fazi osteoblastogeneze. Sa druge strane, povećana ekspresija *TGF- $\beta$*  u ranoj fazi diferencijaciji u prisustvu ekstrakta amalgama može ukazivati na značaj ovog citokina za funkcije ne-osteogenih klonova PL-MSC. Te funkcije verovatno nisu povezane sa proliferacijom PL-MSC, jer to nije pokazano u testu sa radioaktivnim timidinom. Veća ekspresija *TGF- $\beta$*  u kulturama sa A-KM može biti povezana i sa aktivacijom pojedinih gena

kao što je *COL1A1* u odsustvu povećane ekspresije *RUNX2*. Ovaj fenomen je inače pokazan u fibroblastima iz pluća u kojima TGF- $\beta$  povećava sekreciju matriksa i inhibira proliferaciju (317).

Biodentin je stimulisao i ekspresiju *FGF2* kako u BM tako i SOM kulturama i to izraženije u kasnoj fazi diferencijacije. U kasnoj fazi diferencijacije amalgam je imao izrazitiji stimulacijski efekat na ekspresiju ovog gena u odnosu na Biodentin u BM kulturama ali je inhibirao diferencijaciju u SOM kulturama. Ovaj faktor rasta pripada FGF familiji koji ima brojne funkcije. Osim što je pozitivni regulator formiranja koštanog tkiva i induktor osteoblastne diferencijacije (318), FGF-2 utiče i na druge važne procese kao što su angiogeneza, zarastanje rane, morfogeneza ili regulacija metabolizma (319). FGF-2 stimuliše ekspresiju *BGLAP*, što se može povezati sa našim nalazima kod PL-MSK kultura tretiranih ekstraktom amalgama gde je ekspresija ova dva gena u pozitivnoj korelaciji. Sa druge strane, pokazana uloga FGF-2 u fosforilaciji *Runx2* i povećanja transkripcije *RUNX2* nije bila u korelaciji sa našim nalazima, imajući u vidu različitu dinamiku ekspresije *FGF-2* i *RUNX2* gena. Neke od funkcija FGF-2 koje su povezane sa snažnom indukcijom njegove genske ekspresije u kulturama PL-MSK u prisustvu amalgama mogu se dovesti u vezu i sa nalazima da FGF-2 stimuliše produkciju komponenti ekstracelularnog matriksa u humanim fibroblastima kao što su kolageni, fibronektin, osteopontin i matriksne metaloproteinaze (320).

Jedno od značajnih pitanja koje proizilazi iz ove studije je da li Biodentin ispoljava neke specifične uticaje na modulaciju genske ekspresije u kulturama PL-MSK u odnosu na druge MSK tipove i koliko su ti efekti slični ili različiti u odnosu druge trikalcijum silikatne cemente odnosno druge stomatološke materijale koji se koriste za reparaciju pulpe ili u endodontskoj hirurgiji. Odgovor na ovo pitanje se najbolje može sagledati iz sistematskog revijskog rada objavljenog 2016.god.od strane Rathinama i sar. koji su analizirali 41 rad publikovanih o efektima MTA i sličnih trikalcijum silikatnih cemenata na genski profil u osteoblastnim ćelijskim linijama ili MSK izolovanih iz različitih dentalnih struktura (321). Pokazano je da svi cementi utiču na osteogenu diferencijaciju i da indukuju transkripciju ključnih osteoblastnih gene. Broj osteoblastnih gena je bio uglavnom ograničen na 4 do 6 po studiji, a najčešće je uključivao *ALP*, *COL1A1*, *OCN*, *BSP*, *RUNX2* i *OPN*. Dinamika i nivoi genske ekspresije su bili vrlo različiti što je zavisilo od vrste ispitivanog materijala, njegovih fizičko-hemijskih svojstava ali i ciljnih ćelija. Jedan od ređih radova u kome je ispitivan Biodentin kod MSK linije (C3H10T1/2) pokazuje manju ekspresiju *ALP*, *OCN* i *BSP* u odnosu na MTA i Bioaggregate (322). Noviji rad publikovan nedavno od strane Abuarqoub i sar (169) i koji je već ranije komentarisano, pokazuje da necitotoksična koncentracija Biodentina (2mg/ml) koja stimuliše proliferaciju MSK iz humanog periodontalnog ligamenta, takođe stimuliše ekspresiju *OCN*, *ALP* i *OPN*, ali ne i *COL1A1*, posle 21 dan od indukcije diferencijacije. Interesantno je da ekspresija *FGF-2* nije bila povećana u ranoj fazi diferencijacije (posle 24 časa). Očito da detaljno poređenje naših rezultata sa ovim radom nije u potpunosti moguće zbog različite metodologije pripreme Biodentina za ispitivanje, različitog vremenskog termina kada je ekspresija procenjivana kao i zbog različitih karakteristika ispitivanih MSK. Vredno je spomenuti i rad Luo i sar. 2018 (323) koji su kultivisali MSK iz periodontalnog ligamenta a na diskovima iRoot FS ili Biodentina. Diskovi su prethodno kondicionirani radi uklanjanja rastvorljivih komponenti. Pokazali su da oba materijala povećavaju adheziju ćelija. Pri tome je iRoot FS više stimulisao proliferaciju i ekspresiju mRNK za *ALP*, *COL1*, *RUNX2* i *OCN* u odnosu na Biodentin.

Postavlja se pitanje mehanizama kojima Biodentin ali i drugi trikalcijum silikatni cementi pospešuju osteoplastnu diferencijaciju MSC. Ono što je do sada publikovano najviše upućuje na pretpostavku da je Ca, koji se oslobađa iz Biodentina, najodgovorniji za sve uočene fenomene u kulturi PL-MSC, kao što su citotoksičnost, proliferativna svojstva i osteoplastni induktivni potencijal. U ovom kontekstu, kada se posmatra efekat mikročestica Biodentina i solubilnih komponenti, za komparaciju je vrlo interesantan rad u kome je ispitivan biološki efekat matrica (skafolda) napravljenih od hitozanskih-TiO<sub>2</sub> nanocevi u koje su inkorporirani Ca<sup>2+</sup> joni. Naime, Lim i sar., 2017 (324) su pokazali da koncentracije Ca<sup>2+</sup> jona do 4.5mM nemaju bitnijeg efekta na proliferaciju jedne osteoplastne ćelijske linije u kulturi. Stimulacijski efekat na ćelijsku proliferaciju su imali Ca<sup>2+</sup> joni u koncentraciji od 13.5mM. Ovaj efekat se smanjivao sa povećanjem koncentracije Ca<sup>2+</sup> do 40mM a koncentracije veće od ovih su ispoljavale citotoksični efekat. Ovi nalazi se poklapaju sa rezultatima Lee i sar. 2018 (325) koji su takođe pokazali da su koncentracije Ca iznad 40mM citotoksične za mišje MSC iz koštane srži. U njihovoj studiji koncentracije Ca jona između 4 i 10 mM su pospešivale proliferaciju MSC, pri čemu je maksimalni efekat zabeležen pri koncentraciji od 6 mM. Ovi rezultati pokazuju da i male razlike u koncentraciji Ca mogu da značajno menjaju biološki odgovor ćelija pa to između ostalog može biti i razlog ponekad oprečnih nalaza o efektu Ca<sup>2+</sup> na proliferaciju, migraciju ili ostogenu diferencijaciju MSC (326). U skladu sa ovim komentarom su i nalazi Lee i sar (325) da koncentracije Ca<sup>2+</sup>, koje stimulišu proliferaciju, zapravo inhibiraju matriksnu mineralizaciju. Da bi se pokazao inhibicijski fenomen bile su neophodne veće koncentracije Ca<sup>2+</sup> (i do 20 mM), najverovatnije zbog deponovanja Ca<sup>2+</sup> u procesu formiranja mineralizovanih jezgara. Efekti egzogeno dodatog Ca su bili uočljivi i bez dodatnih osteoinduktivnih komponenti u medijumu. Ovakvi nalazi mogu imati i analogiju sa različitim genskim odgovorom PL-MSC na manje i veće koncentracije B-KM, koji su takođe dobijeni u kulturama samo sa osnovnim medijumom. Inače u  $\alpha$ -MEM medijumu, koji smo koristili, koncentracija Ca je prema deklaraciji 1.8 mM.

Povećane ekstracelularne koncentracije Ca<sup>2+</sup> jona indukuju ekspresiju *FGF2*, *TGF- $\beta$ 1* i *OPN* u kulturi MSC (325). Povećana ekspresija prva dva gena se poklapa sa našim nalazima, pošto ekspresiju *OPN* nismo određivali. Oba citokina stimulišu proliferaciju MSC, pri čemu *FGF2* stimuliše ekspresiju c-jun i ciklin D1. Rad Gonzalez-Vasquez-a i sar. (327) takođe pokazuje da ekstracelularna koncentracija Ca<sup>2+</sup> jona od 10 mM stimuliše hemotaksu, proliferaciju i osteogenu diferencijaciju MSC izolovanih iz kostne srži pacova aktivacijom membranskog receptora za kalcijum poznatog pod nazivom CaSR (calcium sensing receptor). Ovaj receptor, koji svojim ekstracelularnim domenom vezuje Ca čak i u milimolarnim koncentracijama, je povezan sa G-proteinima preko kojih se prenose unutarćelijski signali. Verovatno se Ca signali prenose i preko drugih puteva, uključujući i one koje koristi slobodni Ca unet iz ekstracelularnih prostora posredstvom Ca kanala. To potvrđuju eksperimenti u miševa sa delecijom CaSR gena, kod kojih nije bitnije poremećena ekspresija *RUNX2*, *SP7* i *OCN* tokom osteoplastne diferencijacije (328).

Ako se Ca dodaje u gel koji sadrži fosfate (optimalna koncentracija Ca je bila 5mM) dolazi do formiranja hidroksiapatita u gelu. Slično se dešava i na površini čestica Biodentina u vodenim rastvorima (329). Pošto je u našim eksperimentima korišćen ukupan KM Biodentina koji je sadržao ne samo slobodne jone oslobođenih iz materijala već i mikročestice Biodentina, u okviru mehanizama delovanja ekstrakta ovog cementa treba razmatrati kako efekte jona Ca<sup>2+</sup> tako i i hidroksiapatita ali i drugih komponenti, pre svega, fosfata i Si. Pokazano je da hidroksiapatit tokom osteoplastogeneze takođe stimuliše CaSR, što za posledicu ima inhibiciju hondrogeneze u ranom

stadijumu diferencijacije. Hidroksiapatit ostvaruje ovaj efekat posredstvom inhibicije ekspresije receptora za PTH. Sa druge strane, koristi isti receptor za stimulaciju osteogeneze u kasnijoj fazi diferencijacije (330). Nanočestice hidroksiapatita deluju na osteoblaste posredstvom membranskih receptora kao i iz unutarćelijskih odeljaka nakon intrenalizacije nanočestica. Izgleda da je za stimulaciju osteoblasta važniji njihov membranski efekat i to vezivanje hidroksiapatita za FGFR i fosfatne ko-transportere. Oba receptora koriste Erk1/2 signalni put u procesu aktivacije karakterističnih osteoplastnih gena (330). Isti signalni put koriste i fosfati vezivanjem za ekstracelularne fosfatne ko-transportere, što takođe može biti mehanizam stimulacijskog efekta Biodentina.

Nalaz da KM amalgama dovodi do indukcije nekoliko gena u kulturama PL-MSK bez indukcije osteoplastne diferencijacije je veoma interesantan i do sada nije opisivan na ovakvom eksperimentalnom modelu. Posebno je upadljiv snažan efekat niskih koncentracija A-KM (10%) na ekspresiju *BGLAP* koji, kako je već ranije navedeno, kodira OCN. Obzirom da u prisustvu A-KM nije došlo do osteoindukcije, može se pretpostaviti da se ovaj, tipični osteogeni gen, eksprimira u nediferentovanim PL-MSK koje poseduju brojna zajednička svojstva sa fibroblastima (188). Takođe je pokazano da MSK iz periodontalnog ligamenta mogu da se diferentuju i u periodontalne fibroblaste (331). Na osnovu podataka da u patološkim uslovima fibroblasti mogu da učestvuju u produkciji ekstracelularnog matriksa i da posredstvom OCN i drugih mineralizirajućih komponenti učestvuju u ne-osteogenoj kalcifikaciji (332), moglo bi se pretpostaviti da amalgam upravo podstiče ove procese tokom zarastanja PL. Moguće je da se ovi mehanizmi odvijaju posredstvom TGF- $\beta$ , čiju ekspresiju takođe snažno stimulišu male koncentracije ekstrakta amalgama. TGF- $\beta$  stimuliše proliferaciju fibroblasta i produkciju ekstracelularnog matriksa, što upućuje na pretpostavku da fibrozno zarastanje, koje se sreće kod nepotpunog zarastanja PL, može biti dodatno podstaknuto delovanjem amalgama. To se često viđa kada u operativnoj rani u toku endodontskog hirurškog zahvata zaostanu čestice amalgama.

Osim poznatog proinflamacijskog efekta (256), čestice amalgama mogu inhibirati osteogeno zarastanje a favorizovati fibrozu. Ovome treba dodati i podatke da TGF- $\beta$  inhibira proliferaciju osteoplasta a stimuliše produkciju komponenti matriksa poput tipa I kolagena, fibronektina i OCN. Ako je izrazit stimulacijski efekat amalgama na ekspresiju TGF- $\beta$  primarni fenomen, onda se može razmatrati i pretpostavka da je povećana ekspresija *COL1A1* i *BGLAP* u kulturama PL-MSK sa A-KM sekundarna i uslovljena delovanjem TGF- $\beta$ . Amalgam dovodi i do značajne indukcije ekspresije *FGF-2* koji je takođe stimulator proliferacije fibroblasta (318). Sa druge strane, fibroblasti produkuju FGF-2 koji stimuliše angiogenezu tokom zarastanja rane (318).

Za stimulacijski efekat ekstrakta amalgama mogu biti odgovorni joni Hg, Cu i Ag. Pokazano je da Hg<sup>2+</sup> joni stimulišu produkciju TGF- $\beta$  (333). Slično je pokazano i za Cu (334, 335) kao i za Ag (336, 337). Nanočestice Ag mogu stimulisati ili inhibirati osteoplastnu diferencijaciju MSK (338) ili alergijsku inflamaciju (339), u zavisnosti od primenjene koncentracije. Ostaje otvoreno pitanje kako ovi solubilni joni metala modulišu ekspresiju drugih gena i kakve sve posledice to može imati kada je u pitanju regeneracija periodontalnog ligamenta. Zbog svega navedenog, dobijeni rezultati o biološkim efektima dva različita materijala, koji se koriste za retrogradnu opturaciju kanala korena zuba, na ekspresiju gena uključenih u regeneraciju koštanog i vezivnog tkiva, jasno daje smernice za buduće studije.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedene kliničke studije i kompleksnih eksperimentalnih istraživanja na ćelijama humanog porekla o proceni efikasnosti Biodentina, primenjenog za retrogradnu opturaciju kanala korena zuba, u procesu zarastanja humanih periapiksni lezija, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Biodentin je bio efikasniji u zarastanju periapiksni lezija u odnosu na kontrolni materijal, amalgam, procenjivano na osnovu kliničkih i radiografskih pokazatelja u okviru randomizovane kliničke studije.
2. U grupi sa amalgamom lošiji terapijski ishod je uočen kod većih periapiksni lezija.
3. Nije postojala statistički značajna razlika u ishodu hirurškog lečenja periapiksni lezija u odnosu na demografske karakteristike, tip zuba i prethodno endodonsko lečenje kod obe grupe ispitanika.
4. Veće koncentracije kondicioniranih medijuma (ekstrakata) pripremljenih od Biodentina i amalgama su ispoljavale citotoksični efekat na L929 ćelije, inflamacijske ćelije i MSC izolovane iz periapiksni lezija, pri čemu je efekat amalgama bio manji u odnosu na efekat Biodentina.
5. Za razliku od amalgama, manje koncentracije ekstrakta Biodentina su stimulisale proliferaciju L929 ćelija i MSC, što je bilo direktno srazmerno vremenu kultivacije ovih ćelija.
6. Snažnije citotoksične efekte su ispoljavali kondicionirani medijumi pripremljeni od sveže polimerizovanih materijala u odnosu na ekstrakte od tvrdnutih materijala i oni su bili direktno srazmerni vremenu kondicioniranja.
7. Filtrirani kondicionirani medijum Biodentina je pokazivao manju citotoksičnost (veće koncentracije) i manji stimulacijski efekat na proliferaciju ćelija (manje koncentracije) nego ukupni kondicionirani medijum. Ova razlika nije uočena kod ekstrakta amalgama.
8. Citotoksičnost koncentrovanog kondicioniranog medijuma Biodentina je bila posledica indukcije nekroze, dok je koncentrovani kondicionirani medijum amalgama indukovao apoptozu.
9. Necitotoksične koncentracije ukupnog kondicioniranog medijuma oba materijala su imale snažno anti-inflamacijsko dejstvo, procenjivano na osnovu smanjenja koncentracija IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 i MCP-1 u kulturama ćelija iz periapiksni lezija.
10. U istim koncentracijama, kondicionirani medijum Biodentina je pokazivao imunomodulacijska svojstva koja su manifestovana povećanjem produkcije IL-10, Th2 citokina i IL-17A, bez bitnijeg uticaja na Th1 odgovor.



11. Biodentin je ispoljavao osteoprotektivno dejstvo smanjujući produkciju RANKL i odnosa RANKL/OPG.
12. Za razliku od Biodentina, kondicionirani medijum amalgama nije pokazivao imunomodulacijsko svojstvo, niti je bitnije uticao na produkciju osteolitičkih i osteoprotektivnih medijatora.
13. Kondicionirani medijum Biodentina je snažno stimulisao osteoblastnu diferencijaciju MSC iz periapeksnih lezija u osnovnom medijumu i potencirao ove procese u prisustvu suboptimalne koncentracije osteoinduktivnog medijuma.
14. Dozno zavisano, osteoinduktivni potencijal Biodentina, je pokazan na osnovu stimulacije formiranja mineralizovanih kalcijumovih jezgara u kulturi i ekspresije seta osteoblastnih gena.
15. Kondicionirani medijum Biodentina je snažno stimulisao *RUNX2*, *ALP* i *BGLAP*, umereno stimulisao *COL1A1*, *SP7*, *BMP-2*, *TGF- $\beta$ 1* i *FGF2*, a inhibirao *WNT2* gensku ekspresiju.
16. Stimulacijski efekat Biodentina na ispitivane gene je bio veći u kasnoj fazi diferencijacije što se za većinu gena nije poklapalo sa dinamikom njihove ekspresije u kulturama MSC gajenih u osteogenim medijumima.
17. Necitotoksične koncentracije kondicioniranog medijuma amalgama nisu stimulisale osteoblastnu diferencijaciju MSC i ekspresiju *RUNX2*, *SP7*, *ALP* i *COL1A1*. Međutim, snažnije su indukovale ekspresiju *BGLAP*, *BMP-2*, *TGF- $\beta$ 1* i *FGF-2* u odnosu na Biodentin.
18. Niske koncentracije (10%) kondicioniranog medijuma amalgama su povećavale ekspresiju *COL1A1*, *SP7*, *WNT2*, *BGLAP*, *BMP-2* i *TGF- $\beta$ 1* u suboptimalnom osteogenom medijumu a inhibirale ekspresiju *RUNX2*, *ALP* i *FGF2*.
19. Na osnovu svih iznetih rezultata može se izvesti opšti zaključak da je stimulacijski efekat Biodentina na regeneraciju koštanih i meko-tkivnih struktura nakon hirurškog tretmana periapeksnih lezija povezan sa stimulacijom proliferacije i osteoblastne diferencijacije MSC, kao i njegovim lokalnim anti-inflamacijskim, imunomodulacijskim i osteoprotektivnim efektima.

## 7. LITERATURA

1. Chercoles-Ruiz A, Sanchez-Torres A, Gay-Escoda C. Endodontics, endodontic retreatment, and apical surgery versus tooth extraction and implant placement: a systematic review. *J Endodont.* 2017; 43(5): 679-86.
2. von Arx T. Apical surgery: A review of current techniques and outcome. *Saudi Dent J.* 2011; 23(1): 9-15.
3. Gutmann JL, Harrison JW. *Surgical Endodontics.* Boston: Blackwell Scientific Publications, 1991.
4. Gutmann JL, Harrison JW. Posterior endodontic surgery: anatomical considerations and clinical techniques. *Int Endod J.* 1985; 18(1): 8-34.
5. Warnsinck J, Shemesh H. The dynamics of the periapical lesion. *Endod Pract Today.* 2017; 11(3): 167-71.
6. Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J.* 1998; 31(1): 39-47.
7. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the cause of endodontic failure. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(6): 348-81.
8. Warnsinck J, Shemesh H. The dynamics of the periapical lesion. *Endod Pract Today.* 2017; 11(3): 167-71.
9. Márton IJ, Kiss C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *J Endod.* 2014; 40(2): 155-63
10. Razavi SM, Kiani S, Khalesi S. Periapical Lesions: a Review of Clinical, Radiographic, and Histopathologic Features. *Avicen J Dent Res.* 2015; 7(1): 1-1.
11. Figdor D, Sjögren U, Sörlin S, Sundqvist G, Nair PN. Pathogenicity of *Actinomyces israelii* and *Arachnia propionica*: experimental infection in guinea pigs and phagocytosis and intracellular killing by human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7(3): 129-36.
12. Đokić J, Tomić S, Marković M, Milosavljević P, Colić M. Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2013; 43(7): 1862-72.
13. Đokić J, Tomić S, Cerović S, Todorović V, Rudolf R, Colić M. Characterization and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells from periapical lesions. *J Clin Periodontol.* 2012; 39(9): 807-16.

14. Marković M, Tomić S, Đokić J, Mihajlović D, Vučević D, Gazivoda D, Duka M, Čolić M. Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate cytokine production by local immune cells. *Vojnosanit Pregl.* 2018; 75(5): 473-480
15. Seltzer S, Soltanoff W, Bender IB. Epithelial proliferation in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1969; 27(1): 111-21.
16. Spouge JD. The rests of Malassez and chronic marginal periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1984; 11(5): 340-7.
17. Rincon JC, Young WG, Bartold PM. The epithelial cell rests of Malassez-a role in periodontal regeneration? *J Periodontal Res.* 2006; 41(4): 245-52
18. Keinan D, Cohen RE. The Significance of Epithelial Rests of Malassez in the Periodontal Ligament. *J Endod.* 2013; 39(5): 582-7.
19. Kitajima K, Das R, Liang X, Neppelberg E, Johannessen AC, Costea DE, Igarashi M. Isolation and characterization of cells derived from human epithelial rests of Malassez. *Odontol.* 2019; 107(3): 291-300
20. Čolić M, Gazivoda D, Vučević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol.* 2009; 47(1): 101-13.
21. Mortaz E, Alipoor SD, Adcock IM, Mumby S, Koenderman L. Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. *Front Immunol.* 2018; 9:2171.
22. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(3): 173-82.
23. Hellebrekers P, Vrisekoop N, Koenderman L. Neutrophil phenotypes in health and disease. *Eur J Clin Invest.* 2018; 23: e12943.
24. Voisin M-B, Nourshargh S. Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular walls. *J Innate Immun.* 2013; 5(4): 336-47.
25. Lukić A, Vojvodić D, Majstorović I, Čolić M. Production of interleukin-8 in vitro by mononuclear cells isolated from human periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(5): 296-300.
26. Dessaune Neto N, Porpino MTM, Antunes HDS, Rodrigues RCV, Perez AR, Pires FR, Siqueira JF Jr, Armada L. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine expression in post-treatment apical periodontitis. *J Appl Oral Sci.* 2018; 26: e20170455.
27. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013; 122(16): 2784-94

28. Vitkov L, Klappacher M, Hannig M, Krautgartner WD. Extracellular neutrophil traps in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2009 Oct; 44(5): 664-72.
29. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S, Resink TJ. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.* 2010; 584(14): 3193-7.
30. Kalyan, S, Kabelitz D. When neutrophils meet T cells: beginnings of a tumultuous relationship with underappreciated potential. *Eur J Immunol.* 2014; 44(3): 627-33.
31. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov.* 2012; 11(10): 763-76.
32. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, Cosmi L, Lunardi C, Annunziato F, Romagnani S, Cassatella MA. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood.* 2010; 115(2): 335-43.
33. Hajishengallis G, Chavakis T, Hajishengallis E, Lambris JD. Neutrophil homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis. *J Leukoc Biol.* 2015 Oct; 98(4): 539-48.
34. Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15(12): 731-44.
35. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol.* 2019; 10:1084.
36. França GM, Carmo AFD, Costa Neto H, Andrade ALDL, Lima KC, Galvão HC. Macrophages subpopulations in chronic periapical lesions according to clinical and morphological aspects. *Braz Oral Res.* 2019 May 27;33:e047.
37. Prakash S, Devnath KR, Abid S. Study of mast cells in periodontal diseases. *J Oral Maxillofac Pathol* 2006; 10:64-8.
38. Sheethal HS, Uma K, Rao K, Priya NS, Umadevi HS, Smitha T. A quantitative analysis of mast cells in inflammatory periapical and gingival lesions. *J Contemp Dent Pract.* 2014; 15(3): 300-5.
39. Mahita VN, Manjunatha BS, Shah R, Astekar M, Purohit S, Kovvuru S. Quantification and localization of mast cells in periapical lesions. *Ann Med Health Sci Res.* 2015; 5(2): 115-8.
40. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol.* 2016 Jan 6; 6:620.

41. Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of apical periodontitis: a literature review. *J Oral Maxillofac Res.* 2012 Jan 1; 2(4): e1.
42. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res.* 2007 Apr; 86(4): 306-19.
43. Dinarello C, Arend W, Sims J, Smith D, Blumberg H, O'Neill L, et al. IL-1 family nomenclature. *Nat Immunol.* 2010; 11(11): 973.
44. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 2013 Dec 12; 39(6): 1003-18.
45. Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 2000; 16(1): 1-8.
46. Miller GA, DeMayo T, Hutter JW. Production of interleukin-1 by polymorphonuclear leukocytes resident in periradicular tissue. *J Endod.* 1996; 22(7): 346-51.
47. Ataoğlu T, Ungör M, Serpek B, Haliloğlu S, Ataoğlu H, Ari H. Interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha levels in periapical exudates. *Int Endod J.* 2002; 35(2): 181-5.
48. Yang NY, Zhou Y, Zhao HY, Liu XY, Sun Z, Shang JJ. Increased interleukin 1 $\alpha$  and interleukin 1 $\beta$  expression is involved in the progression of periapical lesions in primary teeth. *BMC Oral Health.* 2018; 18(1): 124.
49. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018; 281(1): 8-27.
50. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018; 10(2): a028415.
51. Prso IB, Kocjan W, Simić H, Brumini G, Pezelj-Ribarić S, Borčić J, Ferreri S, Karlović IM. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. *Mediators Inflamm.* 2007; 2007:38210.
52. Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LT. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *Int Endod J.* 2014; 47(7): 615-21.
53. de Sá AR, Pimenta FJ, Dutra WO, Gomez RS. Immunolocalization of interleukin 4, interleukin 6, and lymphotoxin alpha in dental granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96(3): 356-60.
54. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod.* 2012; 38(6): 740-5.

55. Čolić M, Gazivoda D, Majstorović I, Dragicević A, Vasilijić S, Rudolf R, Milosavljević P, Vučević D. Immunomodulatory activity of IL-27 in human periapical lesions. *J Dent Res.* 2009; 88(12): 1142-7.
56. Li J, Wang R, Huang SG. Immunomodulatory activity of interleukin-27 in human chronic periapical diseases. *Am J Transl Res.* 2017; 9(3): 1460-1470.
57. Márton IJ, Rot A, Schwarzwinger E, Szakáll S, Radics T, Vályi-Nagy I, Kiss C. Differential in situ distribution of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and Rantes in human chronic periapical granuloma. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 15(1): 63-5.
58. Patel T, Park SH, Lin LM, Chiappelli F, Huang GT. Substance P induces interleukin-8 secretion from human dental pulp cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96(4): 478-85.
59. Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W Jr, Silva JS, Cunha FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(5): 310-6.
60. Dostert C, Grusdat M, Letellier E, Brenner D. The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. *Physiol Rev.* 2019; 99(1): 115-160.
61. Jakovljević A, Knežević A, Karalić D, Soldatović I, Popović B, Milašin J, Andrić M. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. *Aust Endod J.* 2015; 41(2): 72-7.
62. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Feb; 15(1): 49-60.
63. Danin J, Linder LE, Lundqvist G, Andersson L. Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 in chronic periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000; 90(4): 514-7.
64. Gazivoda D, Džopalić T, Božić B, Tatomirović Z, Brkić Z, Colić M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *J Oral Pathol Med.* 2009; 38(7): 605-11.
65. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res.* 2010; 89(12): 1349-63.
66. Taniuchi I. CD4 helper and CD8 cytotoxic T cell differentiation. *Annu Rev Immunol.* 2018; 36:579-601.

67. Farber DL. Form and function for T cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2020; 20(2): 83-84
68. Luckh Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012:925135.
69. Geginat J, Paroni M, Maglie S, Alfen JS, Kastirr I, Gruarin P, De Simone M, Pagani M, Abrignani S. Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol.* 2014; 5:630.
70. Sasaki H, Balto K, Kawashima N, Eastcott J, Hoshino K, Akira S, Stashenko P. Gamma interferon (IFN-gamma) and IFN-gamma-inducing cytokines interleukin-12 (IL-12) and IL-18 do not augment infection-stimulated bone resorption in vivo. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004; 11(1): 106-10
71. Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(1): 25-31
72. Kabashima H, Nagata K, Maeda K, Iijima T. Presence of IFN-gamma and IL-4 in human periapical granulation tissues and regeneration tissues. *Cytokine.* 2001 7; 14(5): 289-93.
73. Čolić M, Gazivoda D, Vasilijić S, Vucević D, Lukić A. Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39(9): 690-6.
74. Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banchereau J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol.* 2001; 167(9): 5067-76.
75. Gemmell E, Bird PS, Ford PJ, Ashman RB, Gosling P, Hu Y, Seymour GJ. Modulation of the antibody response by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19(4): 247-51.
76. Gemmell E, Carter CL, Bird PS, Seymour GJ. Genetic dependence of the specific T-cell cytokine response to *Porphyromonas gingivalis* in mice. *J Periodontol.* 2002; 73(6): 591-6.
77. Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *J Dent Educ.* 1998 Oct; 62(10): 840-51.
78. Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem.* 2001; 276(40): 37692-9.
79. Cayrol C, Girard JP. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev.* 2018; 281(1): 154-168.
80. Bhaumik S, Basu R. Cellular and Molecular Dynamics of Th17 Differentiation and its Developmental Plasticity in the Intestinal Immune Response. *Front Immunol.* 2017; 8:254.

81. Tait Wojno ED, Hunter CA, Stumhofer JS. The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery. *Immunity*. 2019; 50(4): 851-870.
82. Naufel AO, Aguiar MCF, Madeira FM, Abreu LG. Treg and Th17 cells in inflammatory periapical disease: a systematic review. *Braz Oral Res*. 2017; 31: e103.
83. Marçal JR, Samuel RO, Fernandes D, de Araujo MS, Napimoga MH, Pereira SA, Clemente-Napimoga JT, Alves PM, Mattar R, Rodrigues V Jr, Rodrigues DB. T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod*. 2010; 36(6): 995-9.
84. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J*. 2009 Sep; 54 Suppl 1:S2-10.
85. Colić M, Vasilijić S, Gazivoda D, Vucević D, Marjanović M, Lukić A. Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. *Eur J Oral Sci*. 2007; 115(4): 315-20.
86. Takayanagi H. New developments in osteoimmunology. *Nat Rev Rheumatol*. 2012; 8(11): 684-9.
87. Sobacchi C, Menale C, Villa A. The RANKL-RANK Axis: A Bone to Thymus Round Trip. *Front Immunol*. 2019; 10:629.
88. Menezes R, Bramante CM, da Silva Paiva KB, Letra A, Carneiro E, Fernando Zambuzzi W, Granjeiro JM. Receptor activator NFkappaB-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102(3): 404-9.
89. Fan R, Sun B, Zhang CF, Lü YL, Xuan W, Wang QQ, Yin XZ. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: possible association with inflammatory cells. *Chin Med J (Engl)*. 2011; 124(14): 2162-6.
90. Santos SCLT, Couto LA, Fonseca JM, Xavier FCA, Figueiredo ACL, Freitas VS, Freitas RA, Santos JN, Henriques ACG. Participation of osteoclastogenic factors in immunopathogenesis of human chronic periapical lesions. *J Oral Pathol Med*. 2017; 46(9): 846-852.
91. Nikolić N, Jakovljević A, Čarkić J, Beljić-Ivanović K, Miletić M, Soldatović I, Milašin J. Notch Signaling Pathway in Apical Periodontitis: Correlation with Bone Resorption Regulators and Proinflammatory Cytokines. *J Endod*. 2019; 45(2): 123-128.
92. Duka M, Eraković M, Dolićanin Z, Stefanović D, Čolić M. Production of Soluble Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand and Osteoprotegerin by Apical Periodontitis Cells in Culture and Their Modulation by Cytokines. *Mediators Inflamm*. 2019 Mar 18; 2019:8325380. 1-11.



93. Gao Y, Grassi F, Ryan MR, Terauchi M, Page K, Yang X, Weitzmann MN, Pacifici R. IFN- $\gamma$  stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest.* 2007 Jan; 117(1): 122-32.
94. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$ . *Nature.* 2000 Nov 30; 408(6812): 600-5.
95. Čolić M, Gazivoda D, Vucević D, Majstorović I, Vasiljić S, Rudolf R, Brkić Z, Milosavljević P. Regulatory T-cells in periapical lesions. *J Dent Res.* 2009; 88(11): 997-1002.
96. Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:551-89.
97. Garlet GP, Cardoso CR, Mariano FS, Claudino M, de Assis GF, Campanelli AP, Avila-Campos MJ, Silva JS. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. *J Clin Periodontol.* 2010; 37(7): 591-600.
98. Glowacki AJ, Yoshizawa S, Jhunjhunwala S, Vieira AE, Garlet GP, Sfeir C, Little SR. Prevention of inflammation-mediated bone loss in murine and canine periodontal disease via recruitment of regulatory lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Nov 12; 110(46): 18525-30.
99. Belibasakis GN, Rechenberg DK, Zehnder M. The receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand-osteoprotegerin system in pulpal and periapical disease. *Int Endod J.* 2013; 46(2): 99-111.
100. Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, Johansson A, Lundgren I, Lie A, Conaway HH, Lerner UH. Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2006 3; 281(5): 2414-29.
101. Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Biguetti CC, Cavalla F, Aranha AM, Letra A, Trombone AP, Faveri M, Silva RM, Garlet GP. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci.* 2014; 22(4): 336-46.
102. Wang HS, Yang FH, Li Y, Pei F, Kulkarni AB, Chen Z, Zhang L. The expression of PD-1 and LAG-3 in periapical lesions. *Am J Transl Res.* 2018; 10(8): 2677-84.
103. Abbott PV. Classification, diagnosis and clinical manifestations of apical periodontitis. *Endodontic Topics.* 2005; 8(1), 36-54.

104. Molander B, Ahlqwist M, Gröndahl HG. Panoramic and restrictive intraoral radiography in comprehensive oral radiographic diagnosis. *Eur J Oral Sci.* 1995; 103(4): 191-8.
105. Chapman MN, Nadgir RN, Akman AS, Saito N, Sekiya K, Kaneda T, Sakai O. Periapical Lucency around the Tooth: Radiologic Evaluation and Differential Diagnosis. *Radiographics.* 2013; 33(1): E15-32.
106. Lofthag-Hansen S, Huuononen S, Gröndahl K, Gröndahl HG. Limited cone-beam CT and intraoral radiography for the diagnosis of periapical pathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103(1): 114-119
107. Gambarini G, Piasecki L, Miccoli G, Gaimari G, Nardo DD, Testarelli L. Cone-beam computed tomography in the assessment of periapical lesions in endodontically treated teeth. *Eur J Dent.* 2018; 12(1): 136-143.
108. Al Khasawnah Q, Hassan F, Malhan D, Engelhardt M, Daghma DES, Obidat D, Lips KS, El Khassawna T, Heiss C. Nonsurgical Clinical Management of Periapical Lesions Using Calcium Hydroxide-Iodoform-Silicon-Oil Paste. *Biomed Res Int.* 2018; 2018:8198795. 1-8.
109. Serrano-Giménez M, Sánchez-Torres A, Gay-Escoda C. Prognostic factors on periapical surgery: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015 1; 20 (6): e715-22.
110. Alghamdi F, Alhaddad AJ, Abuzinadah S. Healing of Periapical Lesions After Surgical Endodontic Retreatment: A Systematic Review. *Cureus.* 2020; 12(2): e6916.
111. Ögütlü F, Karaca İ. Clinical and Radiographic Outcomes of Apical Surgery: A Clinical Study. *J Maxillofac Oral Surg.* 2018; 17(1): 75-83.
112. von Arx T. Apical surgery: A review of current techniques and outcome. *Saudi Dent J.* 2011; 23(1): 9-15.
113. Tsesis I, Rosen E, Taschieri S, Telishevsky Strauss Y, Ceresoli V, Del Fabbro M. Outcomes of surgical endodontic treatment performed by a modern technique: an updated meta-analysis of the literature. *J Endod.* 2013; 39: 332-339
114. Kohli MR, Berenji H, Setzer FC, Lee SM, Karabucak B. Outcome of Endodontic Surgery: A Meta-analysis of the Literature-Part 3: Comparison of Endodontic Microsurgical Techniques with 2 Different Root-end Filling Materials. *J Endod.* 2018 Jun; 44(6): 923-31.
115. von Arx T, Hänni S, Jensen SS. Clinical Results with Two Different Methods of Root-end Preparation and Filling in Apical Surgery: Mineral Trioxide Aggregate and Adhesive Resin Composite. *J Endod.* 2010 Jul; 36(7): 1122-9
116. Cohen S, Burns RC. *Pathway of the pulp: Apicoectomy.* 8. izd. St.Louis: CV Mosby; 2002. p. 683-725.

117. Grossman LI. Endodontic practice (8<sup>th</sup> ed.). Philadelphia: Lea & Febiger. 1974:367.
118. Bodrumlu E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: a review. *Aust Endod J.* 2008; 34(1): 30-5.
119. Bhagat K, Goel M, Bhagat N. Root End Filling Materials and Recent Advances: A Review. *EC Dent Sci.* 2017; 12: 46-57.
120. Mahler DB. The high-copper dental amalgam alloys. *J Dent Res.* 1997; 76(1): 537-41.
121. Pleva J. Corrosion and mercury release from dental amalgam. *J Orthomol Med.* 1989; 4(3): 141-58.
122. Sidhu SK, Nicholson JW. A Review of Glass-Ionomer Cements for Clinical Dentistry. *J Funct Biomater.* 2016; 7(3): 16.
123. Ma X, Li C, Jia L, Wang Y, Liu W, Zhou X, Johnson TM, Huang D. Materials for retrograde filling in root canal therapy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 12(12): CD005517.
124. Ainsworth G. Super-EBA and IRM for retrograde root filing. *Evid Based Dent.* 2012 Mar; 13(1): 20.
125. Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro AL, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Braz Dent J.* 2007; 18(1): 3-7.
126. Rao A, Rao A, Shenoy R. Mineral trioxide aggregate-a review. *J Clin Pediatr Dent.* 2009; 34(1): 1-7.
127. Primus CM, Tay FR, Niu LN. Bioactive tri/dicalcium silicate cements for treatment of pulpal and periapical tissues. *Acta Biomater.* 2019; 96:35-54.
128. Zhou W, Zheng Q, Tan X, Song D, Zhang L, Huang D. Comparison of mineral trioxide aggregate and iRoot BP Plus root repair material as root-end filling materials in endodontic microsurgery: a prospective randomized controlled study. *J Endod.* 2017; 43(1): 1-6.
129. Macwan C, Deshpande A. Mineral trioxide aggregate (MTA) in dentistry: A review of literature. *J Oral Res Rev.* 2014; 6(2): 71-4.
130. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate, *J Endod.* 2005; 31(2): 97-100.
131. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995; 21(7): 349-53.

132. Miculescu F, Maidaniuc A, Voicu ȘI, Thakur VK, Stan GE, Ciocan LT. Progress in hydroxyapatite-starch based sustainable biomaterials for biomedical bone substitution applications. *ACS Sustainable Chem Eng.* 2017; 5:8491-512.
133. Šupová M. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceram Int.* 2015; 41:9203-31
134. Zhu L, Yang J, Zhang J, Peng B. A comparative study of BioAggregate and ProRoot MTA on adhesion, migration, and attachment of human dental pulp cells. *J Endod.* 2014; 40(8): 1118-23
135. De-Deus G, Canabarro A, Alves GG, Marins JR, Linhares ABR, Granjeiro JM. Cytocompatibility of the ready-to-use bioceramic putty repair cement iRoot BP Plus with primary human osteoblasts. *Int Endod J.* 2012; 45(6): 508-13
136. Septodont. Biodentine, Active Biosilicate Technology-Scientific File. In Vitro 2010. Available online: <http://www.oraverse.com/bio/img/Biodentine-ScientificFile.Pdf>
137. Rajasekharan S, Martens LC, Cauwels RGEC, Verbeeck RMH. Biodentine™ material characteristics and clinical applications: A review of the literature. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2014; 15(3): 147-58.
138. Tanalp J, Karapınar-Kazandağ M, Dölekoğlu S, Kayahan MB. Comparison of the radiopacities of different root-end filling and repair materials. *Sci World J.* 2013; 2013:594950.
139. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalciumsilicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater.* 2013; 29(2): e20-8.
140. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru Filho M, Esberard RM. The influence of calciumchloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *J Endod.* 2009; 35(4): 550-4.
141. Camilleri J. Investigation of Biodentine as dentine replacement material. *J Dent.* 2013; 41(7): 600-10.
142. Malkondu Ö, Karapınar Kazandağ M, Kazazoğlu E. A Review on Biodentine, a Contemporary Dentine Replacement and Repair Material. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:160951.
143. Kaur M, Singh H, Dhillon JS, Batra M, Saini M. MTA versus Biodentine: Review of Literature with a Comparative Analysis. *J Clin Diagn Res.* 2017; 11(8): ZG01-ZG05.
144. Alshaikh A, Alkahtani M, Alghamdi A, Alghamdi Y, Alghamdi F. Comparative Evaluation of the Different Retrograde Filling Materials Bioceramic, Biodentine and Mineral Trioxide

- Aggregate for Endodontic Surgery: A Systematic Review. *EC Dental Science* 18. 8. 2019; 1749-55.
145. Sinkar RC, Patil SS, Jogad NP, Gade VJ. Comparison of sealing ability of ProRoot MTA, RetroMTA, and Biodentine as furcation repair materials: An ultraviolet spectrophotometric analysis. *J Conserv Dent*. 2015; 18(6): 445-8.
  146. Brizuela C, Ormeño A, Cabrera C, Cabezas R, Silva CI, Ramírez V, Mercade M. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide, Mineral Trioxide Aggregate, and Biodentine in Permanent Young Teeth with Caries: A Randomized Clinical Trial. *J Endod*. 2017; 43(11): 1776-80.
  147. Mahmoud SH, El-Negoly SA, Zaen El-Din AM, El-Zekrid MH, Grawish LM, Grawish HM, Grawish ME. Biodentine versus mineral trioxide aggregate as a direct pulp capping material for human mature permanent teeth-A systematic review. *J Conserv Dent*. 2018; 21(5): 466-73.
  148. Koubi G, Colon P, Franquin JC, Hartmann A, Richard G, Faure MO, Lambert G. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth: a prospective study. *Clin Oral Investig*. 2013; 17(1): 243-9.
  149. Kurun Aksoy M, Tulga Oz F, Orhan K. Evaluation of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) and hydroxide ( $\text{OH}^-$ ) ion diffusion rates of indirect pulp capping materials. *Int J Artif Organs*. 2017; 40(11): 641-646.
  150. Pawar AM, Kokate SR, Shah RA. Management of a large periapical lesion using Biodentine (<sup>TM</sup>) as retrograde restoration with eighteen months evident follow up. *J Conserv Dent*. 2013; 16(6): 573-5.
  151. Caron G, Azérad J, Faure MO, Machtou P, Boucher Y. Use of a new retrograde filling material (Biodentine) for endodontic surgery: two case reports. *Int J Oral Sci*. 2014; 6(4): 250-3.
  152. Tomer AK, Miglani A, Rana S, Chauhan P, Nagarjuna P. Clinical evaluation of two different filling materials in case of endodontic surgery (Mineral trioxide aggregate and biodentine-case reports). *J Med Dent Sci*. 2017; 16(10): 113-118.
  153. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod*. 2012; 38(9): 1220-6.
  154. Sultana N, Singh M, Nawal RR, Chaudhry S, Yadav S, Mohanty S, Talwar S. Evaluation of Biocompatibility and Osteogenic Potential of Tricalcium Silicate-based Cements Using Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. *J Endod*. 2018; 44(3): 446-51.

155. About I. Biodentine: from biochemical and bioactive properties to clinical applications. *G Ital Endod.* 2016. 30(2): 81-88.
156. Costa F, Sousa Gomes P, Fernandes MH. Osteogenic and angiogenic response to calcium silicate-based endodontic sealers. *J Endod.* 2016 Jan; 42(1): 113-9.
157. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 2008; 29(20): 2941-53.
158. FDA. Use of International Standard ISO 10993-1, Biological evaluation of medical devices- Part 1: Evaluation and testing within a risk management process. Guidance Document. 2018. Dostupno na: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/use-international-standard-iso-10993-1-biological-evaluation-medical-devices-part-1-evaluation-and>
159. ISO 7405 Dentistry-Evaluation of biocompatibility of a medical device used in dentistry, 2014
160. Solanki NP, Venkappa KK, Shah NC. Biocompatibility and sealing ability of mineral trioxide aggregate and biodentine as root-end filling material: A systematic review. *J Conserv Dent.* 2018; 21(1): 10-15.
161. Kunert M, Lukomska-Szymanska M. Bio-Inductive Materials in Direct and Indirect Pulp Capping-A Review Article. *Materials (Basel).* 2020; 13(5): 1204.
162. ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity
163. Poggio C, Ceci M, Dagna A, Beltrami R, Colombo M, Chiesa M. In vitro cytotoxicity evaluation of different pulp capping materials: a comparative study. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2015 Sep 1; 66(3): 181-8.
164. Giraud T, Jeanneau C, Bergmann M, Laurent P, About I. Tricalcium silicate capping materials modulate pulp healing and inflammatory activity in vitro. *J Endod.* 2018; 44(11): 1686-91.
165. Ranjkesh B, Isidor F, Kraft DCE, Løvschall H. In vitro cytotoxic evaluation of novel fast-setting calcium silicate cement compositions and dental materials using colorimetric methyl-thiazolyl-tetrazolium assay. *J Oral Sci.* 2018; 60(1): 82-88.
166. Pérard M, Le Clerc J, Watrin T, Meary F, Pérez F, Tricot-Doleux S, Pellen-Mussi P. Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. *J Mater Sci Mater Med.* 2013 Jun; 24(6): 1527-34.
167. Araújo LB, Cosme-Silva L, Fernandes AP, Oliveira TM, Cavalcanti BDN, Gomes Filho JE, Sakai VT. Effects of mineral trioxide aggregate, Biodentine<sup>TM</sup> and calcium hydroxide on

viability, proliferation, migration and differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *J Appl Oral Sci.* 2018 Feb 1; 26: e20160629.

168. Attik GN, Villat C, Hallay F, Pradelle-Plasse N, Bonnet H, Moreau K, Colon P, Grosgeat B. In vitro biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine™ versus MTA (®). *Int Endod J.* 2014; 47(12): 1133-41.
169. Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, Li L, Zheng YF, Häkkinen L, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod.* 2013; 39(4): 478-83.
170. Abuarqoub D, Aslam N, Jafar H, Abu Harfil Z, Awidi A. Biocompatibility of Biodentine™® with Periodontal Ligament Stem Cells: In Vitro Study. *Dent J (Basel).* 2020; 8(1): 17.
171. Youssef AR, Emara R, Taher MM. Al-Allaf FA, Almalki M, Almasri MA, Siddiqui SS. Effects of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide, biodentine and Emdogain on osteogenesis, Odontogenesis, angiogenesis and cell viability of dental pulp stem cells. *BMC Oral Health.* 2019; 19(1): 133.
172. Bortoluzzi EA, Niu LN, Palani CD, El-Awady AR, Hammond BD, Pei DD, Tian FC, Cutler CW, Pashley DH, Tay FR. Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization. *Dent Mater.* 2015; 31(12): 1510-22.
173. da Fonseca TS, Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Delfino MM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Biodentine and MTA modulate immunoinflammatory response favoring bone formation in sealing of furcation perforations in rat molars. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(3): 1237-52.
174. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J.* 2013; 46(9): 808-14.
175. Silva EJ, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod.* 2013 Feb; 39(2): 274-7.
176. Michel A, Erber R, Frese C, Gehrig H, Saure D, Mente J. In vitro evaluation of different dental materials used for the treatment of extensive cervical root defects using human periodontal cells. *Clin Oral Investig.* 2017; 21:753-61.
177. Emara R, Elhennawy K, Schwendicke F. Effects of calcium silicate cements on dental pulp cells: A systematic review. *J Dent.* 2018; 77, 18-36
178. Jalan AL, Warhadpande MM, Dakshindas DM. A comparison of human dental pulp response to calcium hydroxide and Biodentine as direct pulp-capping agents. *J Conserv Dent.* 2017; 20(2): 129-133.

179. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, Kaczmarek W, Buczkowska-Radlińska J. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2013; 39(6): 743-7.
180. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(25): 13625-13630.
181. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(10): 5807-5812.
182. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004; 364(9429): 149-155.
183. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005; 24(2): 155-65.
184. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008; 34(2): 166-71.
185. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4): 315-7.
186. Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2009; 18(3): 487-96.
187. Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, Gronthos S. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 2008 Feb; 214(2): 413-21.
188. Zhai Q, Dong Z, Wang W, Li B, Jin Y. Dental stem cell and dental tissue regeneration. *Front Med.* 2019; 13(2): 152-159.
189. Zheng C, Chen J, Liu S, Jin Y. Stem cell-based bone and dental regeneration: a view of microenvironmental modulation. *Int J Oral Sci.* 2019; 11(3): 23.
190. Rutkovskiy A, Stensløykken KO, Vaage IJ. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med Sci Monit Basic Res.* 2016; 22:95-106.
191. Hanna H, Mir LM, Andre FM. In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9(1): 203.



192. Yavropoulou MP, Michopoulos A, Yovos JG. PTH and PTHR1 in osteocytes. New insights into old partners. *Hormones (Athens)*. 2017; 16(2): 150-160.
193. Cui SJ, Zhang T, Fu Y, Liu Y, Gan YH, Zhou YH, Yang RL, Wang XD. DPSCs Attenuate Experimental Progressive TMJ Arthritis by Inhibiting the STAT1 Pathway. *J Dent Res*. 2020; 99(4): 446-455.
194. López-García S, Myong-Hyun B, Lozano A, García-Bernal D, Forner L, Llena C, Guerrero-Gironés J, Murcia L, Rodríguez-Lozano FJ. Cytocompatibility, bioactivity potential, and ion release of three premixed calcium silicate-based sealers. *Clin Oral Investig*. 2020; 24(5): 1749-59.
195. Hou WX. Effect of mineral trioxide aggregate in retrograde filling. *J Med Forum*. 2008; 29(21): 19-20.
196. von Arx T, Peñarrocha M, Jensen S. Prognostic Factors in Apical Surgery with Rootend Filling: A Metaanalysis. *J Endod*. 2010; 36(6): 95773.
197. Rapp EL, Brown CE, Newton CW. An analysis of success and failure of apicoectomies. *J Endod*. 1991; 17(10): 50812.
198. Kaup M, Schäfer E, Dammaschke T. An in vitro study of different material properties of Biodentine compared to ProRoot MTA. *Head Face Med*. 2015; 2: 116.
199. Shilpa K, Anika M, Shifali D, Aditi D, Anju A, Bidya Y. Comparative evaluation of physical and chemical properties of calcium silicatebased rootend filling materials (Mineral trioxide aggregate and biodentine): An in vitro study. *Indian J Dent Sci*. 2018; 10 (4): 197202.
200. Rud J, Andreasen JO, Jensen JE. Radiographic criteria for the assessment of healing after endodontic surgery. *Int J Oral Surg*. 1972; 1(4): 195214.
201. Molven O, Halse A, Grung B. Observer strategy and the radiographic classification of healing after endodontic surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1987; 16(4): 4329.
202. Mikkonen M, KullaaMikkonen A, Kotilainen R. Clinical and radiologic reexamination of apicoectomized teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1983; 55(3): 3026.
203. von Arx T, Kurt B. Rootend cavity preparation after apicoectomy using a new type of sonic and diamondsurfaced retrotip: a 1year followup study. *J Oral Maxillofac Surg*. 1999; 57(6): 65661.
204. International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials (ISO 1099312). 2012.

205. Tomer AK, Mangat P, Behera A, Kour S, Gupta A, Bhagat V, Mittal N. Revascularisation of an immature permanent tooth using platelet rich fibrin and biodentin as a matrix a case report. *IJMBS*. 2019; 3(7): 2737.
206. von Arx T, Hänni S, Jensen SS. Clinical results with two different methods of rootend preparation and filling in apical surgery: mineral trioxide aggregate and adhesive resin composite. *J Endod*. 2010; 36(7): 11229.
207. Chong BS, Pitt Ford TR, Hudson MB. A prospective clinical study of MTA and IRM when used as rootend filling materials in endodontic surgery. *Int Endod J*. 2003; 36: 5206.
208. Lindeboom JAH, Frenken JWH, Kroon FHM, van den Akker HP. A comparative prospective randomized clinical study of MTA and IRM as rootend filling materials in singlerooted teeth in endodontic surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005; 100: 495500.
209. Kim E, Song JS, Jung IY, Lee SJ, Kim S. Prospective clinical study evaluating endodontic microsurgery outcomes for cases with lesions of endodontic origin compared with cases with lesions of combined periodontalendodontic origin. *J Endod*. 2008; 34: 54651.
210. Peñarrocha M, Marti E, Garcia B, Gay C. Relationship of Periapical Lesion Radiologic Size, Apical Resection, and Retrograde Filling with the Prognosis of Periapical Surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 65: 15269.
211. Iqbal MK, Kratchman SI, Guess GM, Karabucak B, Kim S. Microscopic periradicular surgery: perioperative predictors for postoperative clinical outcomes and quality of life assessment. *J Endod*. 2007; 33: 23944.
212. Song M, Chung W, Lee SJ, Kim E. Longterm outcome of the cases classified as successes based on shortterm followup in endodontic microsurgery. *J Endod*. 2012; 38(9): 11926.
213. Setzer FC, Shah SB, Kohli MR, Karabucak B, Kim S. Outcome of endodontic surgery: a metaanalysis of the literature part 1: comparison of traditional rootend surgery and endodontic microsurgery. *J Endod*. 2010; 36(11): 175765.
214. Taschieri S, Del Fabbro M. Endoscopic endodontic microsurgery: 2year evaluation of healing and functionality. *Braz Oral Res*. 2009; 23(1): 2330.
215. Kreisler M, Gockel R, AubellFalkenberg S, Kreisler T, Weihe C, Filippi A, Kühl S, Schütz S, d'Hoedt B. Clinical outcome in periradicular surgery: effect of patient and toothrelated factors a multicenter study. *Quintessence Int*. 2013; 44(1): 5360.
216. Dorn SO, Gartner AH. Retrograde filling materials: A retrospective successfailure study of amalgam, EBA, and IRM. *J Endod*. 1990; 16(8): 3913.

217. GarcíaGuerrero C, Guauque, SQ, Molano N, Pineda GA, NinoBarrera JL, MarínZuluaga DJ. Predictors of clinical outcomes in endodontic microsurgery: a systematic review and metaanalysis. *Giornale Italiano di Endodonzia*. 2017; 31(1): 213.
218. Gutmann JL. Surgical Endodontics: Past, Present, and Future. *Endod Topics*. 2014; 20(1): 2943.
219. Huumonen S, Ørstavik D. Radiological aspects of apical periodontitis. *Endod. Topics*. 2002; 1: 325.
220. Ørstavik D. Radiographic evaluation of apical periodontitis and endodontic treatment results: a computer approach. *Int Endod J*. 1991; 41: 8998.
221. Ørstavik D. Timecourse and risk analyses of the development and healing of chronic apical periodontitis in man. *Int Endod J*. 1996; 29: 1505.
222. Kerosuo E, Ørstavik D. Application of computerised image analysis to monitoring endodontic therapy: reproducibility and comparison with visual assessment. *Dentomaxillofac Radiol*. 1997; 26: 7984.
223. Strindberg LZ. The dependence of the results of pulp therapy on certain factors. An analytical study based on radiographic and clinical followup examinations. *Acta Odontol Scand*. 1956; 14: 1174.
224. Reit C, Gröndahl HG. Application of statistical decision theory to radiographic diagnosis of endodontically treated teeth. *Scand J Dent Res*. 1983; 91: 213218.
225. Pak JG, Fayazi S, White SN. Prevalence of periapical radiolucency and root canal treatment: a systematic review of crosssectional studies. *J Endod*. 2012; 38(9): 11706.
226. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol*. 2017; 1601:117.
227. Kasugai S, Hasegawa N, Ogura H. A simple in vitro cytotoxicity test using the MTT (3(4,5) dimethylthiazol2yl)2,5diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay: analysis of eugenol toxicity on dental pulp cells (RPCC2A). *Jpn J Pharmacol*. 1990; 52, 95100.
228. Lovschall H, Eiskjaer M, ArenholtBindslev D. Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. *Toxicol In Vitro*. 2002; 16(1): 639.
229. Nikfarjam F, Beyer K, König A, Hofmann M, Butting M, Valesky E, Kippenberger S, Kaufmann R, Heidemann D, Bernd A, Zöller NN. Influence of Biodentine® A Dentine Substitute On Collagen Type I Synthesis in Pulp Fibroblasts In Vitro. *PLoS One*. 2016; 11(12): e0167633.

230. Matsuya S, Takagi S, Chow LC. Effect of mixing ratio and pH on the reaction between  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$  and  $\text{CaHPO}_4$ . *J Mater Sci Mater Med*. 2000; 11, 30511.
231. Gandolfi MG, Ciapetti G, Taddei P, Perut F, Tinti A, Cardoso MV, Van Meerbeek B, Prati C. Apatite formation on bioactive calciumsilicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. *Dent Mater*. 2010; 26(10), 97492.
232. International Organization for Standardization. *Dentistry Root canal sealing materials (ISO 6876)*. 2012.
233. Singh S, Podar R, Dadu S, Kulkarni G, Purba R. Solubility of a new calcium silicatebased rootend filling material. *J Conserv Dent*. 2015; 18(2): 14953.
234. Pushpa S, Maheshwari C, Maheshwari G, Sridevi N, Duggal P, Ahuja P. Effect of pH on solubility of white Mineral Trioxide Aggregate and Biodentine: An in vitro study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2018; 12(3): 2017.
235. Espevik S. Dental Amalgam. *A Rev Mater Sci*. 1977; 5572.
236. Leirskar J. On the mechanism of cytotoxicity of silver and copper amalgams in a cell culture system. *Eur J Oral Sci*. 1974; 82(1): 7481.
237. Kaga M, Seale N, Hanawa T, Ferracane J, Okabe T. Cytotoxicity of amalgams. *J Dent Res*. 1988; 67(9): 12214.
238. Kaga M, Seale NS, Hanawa T, Ferracane JL, Waite DE, Okabe T. Cytotoxicity of amalgams, alloys, and their elements and phases. *Dent Mater*. 1991; 7(1): 6872.
239. Klein CL, Otto M, Kohler H, Hermanns MI, Susz C, Reclaru L, Kirckpatrick CJ. Comparative studies on cytotoxic effects of dental amalgams and alternative alloys according to ISO standards in vitro. *J Mat Sci. Mat Med*. 1995; 6: 70814.
240. Ferracane J, Mafiana P, Cooper C, Okabe T. Timedependent dissolution of amalgams into saline solution. *J Dent Res*. 1987; 66(8): 13315.
241. Enwonwu C. Potential health hazard of use of mercury in dentistry: critical review of the literature. *Environ Res*. 1987; 42(1): 25774.
242. Gurtner G, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 453, 31421.
243. Khayat A. Histological Observations Of Periradicular Healing Following Root Canal Treatment. *Australian Endodontic Journal*., 2005; 31(3): 1015.
244. Čolić M, Lukić A, Vučević D, Milosavljević P, Majstorović I, Marjanović M, Dimitrijević J. Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human

- periapical lesions and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(12): 112030.
245. Scelza MZ, Coil J, Alves GG. Effect of time of extraction on the biocompatibility of endodontic sealers with primary human fibroblasts. *Brazilian Oral Research.* 2012; 26, 42430.
246. Colic M, Rudolf R, Stamenković D, Anzel I, Vucević D, Jenko M, Lazić V, Lojen G. Relationship between microstructure, cytotoxicity and corrosion properties of a CuAlNi shape memory alloy. *Acta Biomater.* 2010; 6, 30817.
247. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1833(12): 344859.
248. GreenleeWacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunological reviews.* 2016; 273, 35770.
249. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1843(11): 25632582.
250. Moore BB, Kunkel SL. Attracting Attention: Discovery of IL8/CXCL8 and the Birth of the Chemokine Field. *J Immunol.* 2019; 202(1): 34.
251. Yoshimura T. The Chemokine MCP1 (CCL2): in the Host Interaction With Cancer: A Foe or Ally? *Cell Mol Immunol.* 2018; 15(4): 33545.
252. Garbers C, Heink S, Korn T, RoseJohn S. Interleukin6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nat Rev Drug Discov.* 2018; 17(6): 395412.
253. Giraud T, Jeanneau C, Bergmann M, Laurent P, About I. Tricalcium silicate capping materials modulate pulp healing and inflammatory activity in vitro. *J Endod.* 2018; 44, 168691.
254. da Fonseca TS, Silva GF, GuerreiroTanomaru JM, Delfino MM, SassoCerri E, TanomaruFilho M, Cerri PS. Biodentine and MTA modulate immunoinflammatory response favoring bone formation in sealing of furcation perforations in rat molars. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(3): 12371252.
255. Corral Nunez CM, Bosomworth HJ, Field C, Whitworth JM, Valentine RA. Biodentine and mineral trioxide aggregate induce similar cellular responses in a fibroblast cell line. *J Endod.* 2014; 40, 40611.
256. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J.* 2006; 39(4): 24981.

257. Baek SH, Plenk Jr H, Kim S. Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, SuperEBA, and MTA as rootend filling materials. *J Endod.* 2005; 31(6): 4449.
258. Meryon S. The effect of zinc on the biocompatibility of dental amalgams in vitro. *Biomaterials.* 1984; 5(5): 2937.
259. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 2011; 17: 3.
260. Velickovic M, Pejnovic N, Petrovic R, Mitrovic S, Jeftic I, Kanjevac T, Lukic A. Expression of interleukin33 and its receptor ST2 in periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 2016; 45(1): 706.
261. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM): induces TGFβ1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* 2012 May; 45(5): 43948.
262. Hawkes JE, Yan BY, Chan TC, Krueger JG. Discovery of the IL23/IL17 Signaling Pathway and the Treatment of Psoriasis. *J Immunol.* 2018; 201(6): 160513.
263. Xiong H, Wei L, Peng B. The Presence and involvement of interleukin17 in apical periodontitis. *Int Endod J.* 2019; 52(8): 112837.
264. Amatya N, Garg AV, Gaffen SL. IL17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* 2017; 38(5): 31022.
265. Schedle A, RauschFan XH, Samorapoompichit P, Franz A, Leutmezer F, Spittler A, Baghestanian M, Lucas T, Valent P, Slavicek R, BoltzNitulescu G. Effects of dental amalgam and heavy metal cations on cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J Biomed Mater Res.* 1998; 42(1): 7684.
266. Soleo L, Colosio C, Alinovi R, Guarneri D, Russo A, Lovreglio P, Vimercati L, Birindelli S, Cortesi I, Flore C, Carta P, Colombi A, Parrinello G, Ambrosi L. Immunologic effects of exposure to low levels of inorganic mercury. *Med Lav.* 2002; 93(3): 22532.
267. Podzimek S, Tomka M, Nemeth T, Himmlova L, Matucha P, Prochazkova J. Influence of metals on cytokines production in connection with successful implantation therapy in dentistry. *Neuro Endocrinol Lett.* 2010; 31(5): 65762.
268. Iday NO, Celik N, Dilsiz A, Alp HH, Aydin T, Seven N, Kiziltunç A. The effects of overhang amalgam restoration on levels of cytokines, gingival crevicular fluid volume and some periodontal parameters. *Am J Dent.* 2016; 29(5): 26670.
269. L, Brokstad KA, Moen K, Jonsson R. Minor changes in serum levels of cytokines after removal of amalgam restorations. *Toxicol Lett.* 2012; 211(2): 1205.

270. Petean IBF, Küchler EC, Soares IMV, Segato RAB, Silva LABD, Antunes LAA, Salles AG, Antunes LS, SousaNeto MD. Genetic Polymorphisms in RANK and RANKL are Associated with Persistent Apical Periodontitis. *J Endod.* 2019; 45(5): 52631.
271. Terpos E, NtanasisStathopoulos I, Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer J.* 2018; 8(1): 7.
272. Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Kohara H, Yoshimatsu M, TakanoYamamoto T. Immunological reaction in TNF $\alpha$ mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 181849.
273. Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, Mukherjee A, AbuAmer Y. Tumor necrosis factor $\alpha$  (TNF): stimulates RANKLinduced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem.* 2001; 276(1): 5638.
274. Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, Johansson A, Lundgren I, Lie A, Conaway HH, Lerner UH. Inhibition of hormone and cytokine stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin4 and interleukin13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6dependent pathway. *J Biol Chem.* 2006; 281(5): 241429.
275. Chen B, Wu W, Sun W, Zhang Q, Yan F, Xiao Y. RANKL expression in periodontal disease: where does RANKL come from?. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:731039.
276. Evans KE, Fox SW. Interleukin10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. *BMC Cell Biol.* 2007; 8:4.
277. Barbosa Silva MJ, Vieira LQ, Sobrinho AP. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(5): 706.
278. Rezende TM, Vargas DL, Cardoso FP, Sobrinho AP, Vieira LQ. Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. *Int Endod J.* 2005; 38(12): 896903.
279. Lara Vde P, Cardoso FP, Brito LC, Vieira LQ, Sobrinho AP, Rezende TM. Experimental Furcal Perforation Treated with MTA: Analysis of the Cytokine Expression. *Braz Dent J.* 2015; 26(4): 33741.
280. Huang TH, Yang CC, Ding SJ, Yeng M, Kao CT, Chou MY. Inflammatory cytokines reaction elicited by rootend filling materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005; 73(1): 1238.
281. Marković M. Interakcija između mezenhimskih matičnih ćelija iz periapikalnih lezija i fagocita. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet. 2016.

282. Trubiani O, Pizzicannella J, Caputi S, Marchisio M, Mazzon E, Paganelli R, Paganelli A, Diomede F. Periodontal Ligament Stem Cells: Current Knowledge and Future Perspectives. *Stem Cells Dev.* 2019; 28(15): 9951003.
283. Cathery W, Faulkner A, Maselli D, Madeddu P. Concise Review: The Regenerative Journey of Pericytes Toward Clinical Translation. *Stem Cells.* 2018 Sep; 36(9): 12951310.
284. Yamazaki T, Mukoyama YS. Tissue Specific Origin, Development, and Pathological Perspectives of Pericytes. *Front Cardiovasc Med.* 2018; 5:78.
285. Ivanovski S. Periodontal regeneration. *Aust Dent J.* 2009; 54(1): 11828.
286. Siali M, Chatzopoulou D, Gillam DG. An overview of periodontal regenerative procedures for the general dental practitioner. *Saudi Dent J.* 2018; 30(1): 2637.
287. Shaini FJ, Shelton RM, Marquis PM, Shortall AC. In vitro evaluation of the effect of freshly mixed amalgam and galliumbased alloy on the viability of primary periosteal and osteoblast cell cultures. *Biomaterials.* 2000; 21(2): 1139.
288. Hanna H, Mir LM, Andre FM. In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9(1): 203.
289. Luo Z, Shang X, Zhang H, Wang G, Massey PA, Barton SR, Kevil CG, Dong Y. Notch Signaling in Osteogenesis, Osteoclastogenesis, and Angiogenesis. *Am J Pathol.* 2019; 189(8): 14951500.
290. Komori T. Signaling networks in RUNX2dependent bone development. *J Cell Biochem.* 2011; 112(3): 7505.
291. Kawane T, Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Komori H, Yoshida CA, MatsuuraKawata VKDS, Sakane C, Matsuo Y, Nagai K, Maeno T, Date Y, Nishimura R, Komori T. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 13551.
292. Yavropoulou MP, Yovos JG. The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. *Hormones (Athens):* 2007; 6(4): 27994.
293. Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.* 2010; 339(1): 18995.
294. Tsao YT, Huang YJ, Wu HH, Liu YA, Liu YS, Lee OK. Osteocalcin Mediates Biomineralization during Osteogenic Maturation in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(1): 159.
295. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78: 92958.



296. Zhou L, Hinerman JM, Blaszczyk M, Miller JL, Conrady DG, Barrow AD, Chirgadze DY, Bihan D, Farndale RW, Herr AB. Structural basis for collagen recognition by the immune receptor OSCAR. *Blood*. 2016; 127(5): 52937.
297. BoraschiDiaz I, Wang J, Mort JS, Komarova SV. Collagen Type I as a Ligand for ReceptorMediated Signaling. *Front Phys*. 2017; 5:12.
298. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*. 2016; 82: 429.
299. Moser SC, van der Eerden BCJ. OsteocalcinA Versatile BoneDerived Hormone. *Front Endocrinol (Lausanne)*: 2019; 9: 794.
300. OkurowskaZawada B, Kozerska A, Żelazowska B, Kułak W, Wasilewska A, Wysocka J. Serum 25hydroxyvitamin D, osteocalcin, and parathormone status in children with meningomyelocele. *Neuropediatrics*. 2012; 43(6): 3149.
301. Boskey AL, Wians FH Jr, Hauschka PV. The effect of osteocalcin on in vitro lipidinduced hydroxyapatite formation and seeded hydroxyapatite growth. *Calcif Tissue Int*. 1985 Jan; 37(1): 5762.
302. Kaur K, Sanskrita D, Sourabh G. Regulation of Human OsteoblasttoOsteocyte Differentiation by DirectWrite 3D Microperiodic Hydroxyapatite Scaffolds. *ACS Omega*. 2019; 4: 150415.
303. Pettersson LF, Kingham PJ, Wiberg M, Kelk P. In Vitro Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells from Jawbone Compared with Dental Tissue. *Tissue Eng Regen Med*. 2017; 14(6): 76374.
304. LedesmaMartínez E, MendozaNúñez VM, SantiagoOsorio E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells Int*. 2016; 2016:4709572.
305. Noda S, Kawashima N, Yamamoto M, Hashimoto K, Nara K, Sekiya I, Okiji T. Effect of cell culture density on dental pulpderived mesenchymal stem cells with reference to osteogenic differentiation. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 5430.
306. George J, Kuboki Y, Miyata T. Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds. *Biotechnol Bioeng*. 2006; 95(3): 40411.
307. Prins HJ, Braat AK, Gawlitta D, Dhert WJ, Egan DA, TijssenSlump E, Yuan H, Coffey PJ, Rozemuller H, Martens AC. In vitro induction of alkaline phosphatase levels predicts in vivo bone forming capacity of human bone marrow stromal cells. *Stem Cell Res*. 2014; 12(2): 42840.

308. Hasegawa T, Chosa N, Asakawa T, Yoshimura Y, Ishisaki A, Tanaka M. Establishment of immortalized human periodontal ligament cells derived from deciduous teeth. *Int J Mol Med.* 2010; 26(5): 7015.
309. Hanada K, Dennis JE, Caplan AI. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein2 on osteogenic differentiation of rat bone marrowderived mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res.* 1997; 12(10): 160614.
310. Ducy P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn.* 2000; 219(4): 46171.
311. Chen G, Deng C, Li YP. TGF $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci.* 2012; 8(2): 27288.
312. Hauff K, Zambarda C, Dietrich M, et al. MatrixImmobilized BMP2 on Microcontact Printed Fibronectin as an in vitro Tool to Study BMPMediated Signaling and Cell Migration. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015; 3:62.
313. Erlebacher A, Filvaroff EH, Ye JQ, Derynck R. Osteoblastic responses to TGFbeta during bone remodeling. *Mol Biol Cell.* 1998; 9(7): 190318.
314. Kasagi S, Chen W. TGFbeta1 on osteoimmunology and the bone component cells. *Cell Biosci.* 2013; 3(1): 4.
315. Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF $\beta$  signaling in bone remodeling. *J Clin Invest.* 2014; 124(2): 46672.
316. Khan SA, Joyce J, Tsuda T. Quantification of active and total transforming growth factor $\beta$  levels in serum and solid organ tissues by bioassay. *BMC Res Notes.* 2012; 5: 636.
317. Epstein Shochet G, Brook E, BardensteinWald B, Shitrit D. TGF $\beta$  pathway activation by idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): fibroblast derived soluble factors is mediated by IL6 transsignaling. *Respir Res.* 2020; 21(1): 56.
318. Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, Jang JH, Shin US, Kim HW. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng.* 2010; 2010: 218142.
319. Maddaluno L, Urwyler C, Werner S. Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair. *Development.* 2017 Nov 15; 144(22): 40474060.
320. Wilgus TA. Growth FactorExtracellular Matrix Interactions Regulate Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle):* 2012; 1(6): 24954.
321. Rathinam E, Rajasekharan S, Chitturi RT, Declercq H, Martens L, De Coster P. Gene Expression Profiling and Molecular Signaling of Various Cells in Response to Tricalcium Silicate Cements: A Systematic Review. *J Endod.* 2016; 42(12): 171325.

322. Lee BN, Lee KN, Koh JT, Min KS, Chang HS, Hwang IN, Hwang YC, Oh WM. Effects of 3 endodontic bioactive cements on osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *J Endod.* 2014; 40(8): 121722.
323. Luo T, Liu J, Sun Y, Shen Y, Zou L. Cytocompatibility of Biodentine and iRoot FS with human periodontal ligament cells: an in vitro study. *Int Endod J.* 2018; 51(7): 77988.
324. Lim SS, Chai CY, Loh HS. In vitro evaluation of osteoblast adhesion, proliferation and differentiation on chitosanTiO<sub>2</sub> nanotubes scaffolds with Ca<sup>2+</sup> ions. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017; 76: 14452.
325. Lee MN, Hwang HS, Oh SH, Roshanzadeh A, Kim JW, Song JH, Kim ES, Koh JT. Elevated extracellular calcium ions promote proliferation and migration of mesenchymal stem cells via increasing osteopontin expression. *Exp Mol Med.* 2018; 50(11): 116.
326. Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, Toyama Y, Taguchi T, Tanaka J. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials.* 2005; 26(23): 484755.
327. GonzálezVázquez A, Planell JA, Engel E. Extracellular calcium and CaSR drive osteoinduction in mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater.* 2014; 10(6): 282433.
328. Chang W, Tu C, Chen TH, Bikle D, Shoback D. The extracellular calciumsensing receptor (CaSR): is a critical modulator of skeletal development. *Sci Signal.* 2008; 1(35).
329. Singh S, Podar R, Dadu S, Kulkarni G, Purba R. Solubility of a new calcium silicatebased root end filling material. *J Conserv Dent.* 2015; 18(2): 149153.
330. Sarem M, Heizmann M, Barbero A, Martin I, Shastri VP. Hyperstimulation of CaSR in human MSCs by biomimetic apatite inhibits endochondral ossification via temporal downregulation of PTH1R. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018; 115(27): E6135E6144.
331. Ouchi T, Nakagawa T. Mesenchymal stem cellbased tissue regeneration therapies for periodontitis. *Regen Ther.* 2020; 14: 7278.
332. Duan X, Xu H, Wang Y, Wang H, Li G, Jing L. Expression of corebinding factor  $\alpha 1$  and osteocalcin in fluoridetreated fibroblasts and osteoblasts. *J Trace Elem Med Biol.* 2014; 28(3): 278283.
333. Ayensu WK, Tchounwou PB. Microarray analysis of mercuryinduced changes in gene expression in human liver carcinoma (HepG2): cells: importance in immune responses. *Int J Environ Res Public Health.* 2006; 3(2): 141173.

334. Ko JW, Shin NR, Park JW, Park SH, Lee IC, Kim JS, Kim JC, Ahn KS, Shin IS. Copper oxide nanoparticles induce collagen deposition via TGF $\beta$ 1/Smad3 signaling in human airway epithelial cells. *Nanotoxicology*. 2018; 12(3): 239250.
335. Zhu X, Wang J, Xie G, Feng H, Li X, Liu L, Wang X, Li D, Liu Z, Qian J, Wang Z, Liu G. Effect of copper on the expression of TGF $\beta$  in incubated chondrocytes of newborn pigs. *Biol Trace Elem Res*. 2011; 143(3): 14619.
336. Kim YS, Song MY, Park JD, Song KS, Ryu HR, Chung YH, Chang HK, Lee JH, Oh KH, Kelman BJ, Hwang IK, Yu IJ. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2010; 7:20.
337. Wei M, Li S, Le W. Nanomaterials modulate stem cell differentiation: biological interaction and underlying mechanisms. *J Nanobiotechnology*. 2017; 15(1): 75.
338. Xie H, Wang P, Wu J. Effect of exposure of osteoblastlike cells to lowdose silver nanoparticles: uptake, retention and osteogenic activity. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019; 47(1): 260267.
339. Park HS, Kim KH, Jang S, Park JW, Cha HR, Lee JE, Kim JO, Kim SY, Lee CS, Kim JP, Jung SS. Attenuation of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma by silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2010; 5:50515.

## Biografija

Mile Eraković je rođen 24.12.1978. u Podgorici, Crna Gora. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu je završio 2004. godine (šeste godine Fakulteta bio je stipendista Vojske Srbije). Posle položenog državnog ispita dobio je zaposlenje u Vojnomedicinskom centru Karaburma u Beogradu, kao profesionalno vojno lice i postavljen za načelnika Kabineta za stomatologiju. Od 2015.god. radi na Odeljenju za oralnu hirurgiju, Klinike za stomatologiju VMA.

Dr Eraković je završio specijalizaciju iz Oralne hirurgije na Stomatološkom fakultetu u Beogradu 2019 godine sa odličnim uspehom. Doktorske akademske studije na Fakultetu medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu je upisao 2016 godine. Do sada je položio sve ispite predviđene planom i programom studija, uključujući i usmeni doktorski ispit.

Do sada je objavio 3 rada u međunarodnim časopisima kao prvi autor i koautor.

1. **Mile Eraković**, Miloš Duka, Marina Bekić, Marijana Milanović, Sergej Tomić, Dragana Vučević and Miodrag Čolić. Anti-inflammatory effect of amalgam on periapical lesion cells in culture. *Vojnosanitetski Pregled*, (2019); Online First March, 2019. IF.0.405, M23
2. Miloš Duka, **Mile Eraković**, Zana Dolićanin, Dara Stefanović, and Miodrag Čolić, Production of Soluble Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand and Osteoprotegerin by Apical Periodontitis Cells in Culture and Their Modulation by Cytokines, Mediators of Inflammation, vol. 2019, Article ID 8325380, 11 pages, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8325380>. IF.3.549, M22
3. **Mile Eraković**, Miloš Duka, Marina Bekić, Sergej Tomić, Bashkim Ismaili, Dragana Vučević and Miodrag Čolić. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Biodentine on human periapical lesion cells in culture. *International Endodontic Journal*. 2020. Article ID: IEJ 13351, Article DOI:10.1111/iej.13351. Internal Article ID:16818039. M 21a

***IZJAVA AUTORA O ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE***

Ja, Mile Eraković, izjavljujem da doktorska disertacija pod naslovom:

„Efekat trikalcijum silikatnog cementa (biodentina) na zarastanje humanih periapeksnih lezija nakon retrogradnog punjenja kanala korena zuba: klinička i eksperimentalna studija”

koja je odbranjena na Fakultetu medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu predstavlja *originalno autorsko delo* nastalo kao rezultat *sopstvenog istraživačkog rada*.

*Ovom Izjavom takođe potvrđujem:*

da sam *jedini autor* navedene doktorske disertacije,

da u navedenoj doktorskoj disertaciji *nisam izvršio/la povredu* autorskog niti drugog prava intelektualne svojine drugih lica,

da umnoženi primerak doktorske disertacije u štampanoj i elektronskoj formi u čijem se prilogu nalazi ova Izjava sadrži doktorsku disertaciju istovetnu odbranjenoj doktorskoj disertaciji.

U Kragujevcu, 9.10.2020. godine,

---

potpis autora

**IZJAVA AUTORA O ISKORIŠĆAVANJU DOKTORSKE DISERTACIJE**

Ja, Mile Eraković,

dozvoljavam

ne dozvoljavam

Univerzitetnoj biblioteci u Kragujevcu da načini dva trajna umnožena primerka u elektronskoj formi doktorske disertacije pod naslovom:

„Efekat trikalcijum silikatnog cementa (Biodentina) na zarastanje humanih periapeksnih lezija nakon retrogradnog punjenja kanala korena zuba: klinička i eksperimentalna studija”

koja je odbranjena na Fakultetu medicinskih nauka,

Univerziteta u Kragujevcu, i to u celini, kao i da po jedan primerak tako umnožene doktorske disertacije učini trajno dostupnim javnosti putem digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Kragujevcu i centralnog repozitorijuma nadležnog ministarstva, tako da pripadnici javnosti mogu načiniti trajne umnožene primerke u elektronskoj formi navedene doktorske disertacije putem *preuzimanja*.

Ovom Izjavom takođe

dozvoljavam

ne dozvoljavam<sup>1</sup>

pripadnicima javnosti da tako dostupnu doktorsku disertaciju koriste pod uslovima utvrđenim jednom od sledećih *Creative Commons* licenci:

---

<sup>1</sup> Ukoliko autor izabere da ne dozvoli pripadnicima javnosti da tako dostupnu doktorsku disertaciju koriste pod uslovima utvrđenim jednom od Creative Commons licenci, to ne isključuje pravo pripadnika javnosti da navedenu doktorsku disertaciju koriste u skladu sa odredbama Zakona o autorskom i srodnim pravima.

- 1) Autorstvo
- 2) Autorstvo - deliti pod istim uslovima
- 3) Autorstvo - bez prerada
- 4) Autorstvo - nekomercijalno
- 5) Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima**
- 6) Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada<sup>2</sup>

U Kragujevcu, 9. 10. 2020. godine,

---

potpis autora

---

<sup>2</sup> Molimo autore koji su izabrali da dozvole pripadnicima javnosti da tako dostupnu doktorsku disertaciju koriste pod uslovima utvrđenim jednom od *Creative Commons* licenci da zaokruže jednu od ponuđenih licenci. Detaljan sadržaj navedenih licenci dostupan je na: <http://creativecommons.org.rs/>