

UNIVERZITET U BEOGRADU  
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Aleksandra D. Čairović

**UTICAJ TERMIČKE OBRADNE NA  
BIOLOŠKA I MIKROSTRUKTURNA  
SVOJSTVA DENTALNIH LEGURA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Aleksandra D. Čairović

**INFLUENCE OF RECASTING ON  
BIOLOGICAL AND MICROSTRUCTURAL  
PROPERTIES OF DENTAL ALLOYS**

doctoral dissertation

Beograd, 2014.

MENTOR:

**Prof. dr Dragoslav Stamenković,**  
redovni profesor Stomatološkog fakulteta,  
Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR:

**Dr Ivan Đorđević,**  
naučni saradnik, Institut za multidisciplinarna istraživanja,  
Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

**Prof. dr Kosovka Obradović Đuričić,**  
redovni profesor Stomatološkog fakulteta,  
Univerziteta u Beogradu

**Prof. dr Vojislav Lazić,**  
vanredni profesor Stomatološkog fakulteta,  
Univerziteta u Beogradu

**Prof. dr Dragana Vujanović,**  
vanredni profesor Farmaceutskog fakulteta,  
Univerziteta u Beogradu

**Dr Vesna Maksimović,**  
viši naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča”,  
Univerzitet u Beogradu

**Dr Sanja Mijatović,**  
naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja  
„Siniša Stanković”,  
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

*Posvećeno Neni i Akiju,  
da budu ponosni na mene, kao što sam ja na njih!*

*Mama*

Prilikom izrade ove doktorske disertacije nesebičnu pomoć i podršku su mi pružili saradnici i prijatelji. Želela bih ovom prilikom da se zahvalim:

– Prof. Dr Dragoslavu Stamenkoviću, mom mentoru i učitelju, koji prati moj profesionalni put od samog početka.

– Prof. Dr Kosovki Obradović Đuričić, koja mi je pomogla oko samog izbora teme i svojim savetima i kliničkim iskustvom pomogla da ovaj rad bude kompaktna celina.

– Prof. Dr Vojkanu Laziću, koji se trudio da sve teškoće pojednostavi.

– Prof. Dr Dragani Vujanović, na korisnim sugestijama i kolegijalnoj podršci.

– Dr Vesni Maksimović, koja je obogatila ovaj rad jednom prijateljskom vezom, koju ćemo kroz godine koje dolaze još više ojačati.

– Dr Sanji Mijatović i njenim saradnicama Neli i Tanji, kojima nije bilo lako, ali su se sjajno snašle, pre svega zahvaljujući svom velikom istraživačkom kvalitetu i iskustvu.

– Urošu Tasiću, Mateju i njihovim saradnicima iz štamparije „Interprint” koji su mi pomogli da ovaj rad bude oblikovan i ukoričen.

Bez porodice nijedan uspeh ne bi ni imao smisao i zato želim da se zahvalim svojim roditeljima na bezgraničnoj podršci i ljubavi.

# Uticaj termičke obrade na biološka i mikrostrukturna svojstva dentalnih legura

(sažetak)

Mikrostruktura je osnovni faktor koji određuje svojstva nekog materijala. Cilj ove studije je procena mikrostrukturnih promena nakon višestrukog pretapanja dve komercijalne dentalne legure, Ni-Cr (Wiron 99) i Co-Cr (Dentalit C) i njihov uticaj na fiziološke procese ćelija, kao i komparacija kvaliteta dve ispitivane legure, od kojih jedna sadrži, a druga ne sadrži Ni.

U ovom istraživanju pošlo se od pretpostavke da više puta topljenja i livenja dentalna legura ima promenjenu mikrostrukturu, koja utiče na izmenu fizičko-mehaničkih svojstava i biološkog kvaliteta legura. Uzorci obe ispitivane legure izliveni su nakon prvog, četvrtog i osmog topljenja, bez dodavanja nove legure. U cilju mikrostrukturne karakterizacije optičkom mikroskopijom uočena je tipična dendritna struktura uzoraka Co-Cr, kao i Ni-Cr dentalne legure, nakon različitog broja topljenja i livenja. Poznato je da dendritna struktura pokazuje razliku u hemijskom sastavu i da dendritne grane sadrže manje legirajućih i pratećih elemenata nego međudendritni prostor. Uočene su promene u mikrostrukтури koje su znatno izraženije kod Co-Cr dentalne legure. SEM analiza je dala jasnije podatke o strukturi ispitivanih uzoraka dentalnih legura. Poznato je na osnovu binarnog dijagrama stanja da Ni-Cr sistem pokazuje široku oblast rastvorljivosti u čvrstom stanju Cr u Ni. U složenom sistemu kao što je Wiron 99 pored čvrstog rastvora bogatog Ni uočavaju se i faze u međudendritnom prostoru nepravilnog oblika, koje menjaju svoj raspored u zavisnosti od broja ponavljanih topljenja i livenja. EDS analizom utvrđeno je da se razlika u hemijskom sastavu dendrita i međudendritnog prostora veoma mala za leguru Wiron 99. Kada je u pitanju legura na bazi Co-Cr, bilo je moguće praćenje razlike u hemijskom sastavu između dve zone, dendrit-međudendritni prostor. Sa povećanjem broja ponovljenog topljenja i livenja uočeno je da dolazi do homogenizacije strukture, odnosno do smanjenja razlike u hemijskom sastavu i da je to najuočljivije za elemente Co i Mo, dok ostali praćeni elemente Cr, Fe i Si imaju ravnomernu (homegenu) raspodelu u analiziranim zonama.

Rendgenostrukturnom analizom uzoraka Ni-Cr dentalne legure uočene su samo refleksije površinski centrirane kubne kristalne rešetke čvrstog rastvora  $\alpha$ -Ni. Utvrđeno je da sa povećanjem broja topljenja i livenja legure, menjaju relativni intenziteti difrakcionih maksimuma. Takođe se menja i preferentna orijentacija kristalita sa povećanjem broja ponovljenog topljenja i livenja. Razlog ovakvom ponašanju se može tražiti u promen hemijskog sastava legure tokom sukcesivnog topljenja i livenja, odnosno ugradnj legirajućih elemenata

u tačno određene ravni. Ovakvo objašnjenje se može dati za pojavu refleksija sa ravni (220)fcc koje nisu uočene na rendgenogramu uzorka koji je jednom pretopljen. Sa povećanjem broja topljenja i livenja legure širina difrakcionih maksimuma koji odgovaraju ravni (111)fcc se smanjuju, dok se veličina kristalita, odnosno stepen sredečnosti povećava. Rendgenostrukturalna analiza uzoraka Co-Cr dentalne legure ukazuje na prisustvo dve kristalne strukture, odnosno faze. Može se pretpostaviti da dendritni i međudendritni region odgovaraju hcp i fcc strukturi.

Potencijalna toksičnost Co-Cr i Ni-Cr dentalnih legura u zavisnosti od broja topljenja i livenja preliminarno je ispitivana na maligno transformisanoj liniji mišjeg fibrosarkoma L929, a potom humanim embrionalnim fibroblastima (MRC-5) i mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PBMC) poreklom iz zdravog donora. Ovi tipovi ćelija su realno u kontaktu sa dentalnim materijalom u živom sistemu i konstituenti su mikrosredine. Citotoksičnost materijala je procenjivana kroz određivanje njihovog uticaja na vijabilnost pomenutih ćelija. U tu svrhu su korišćena dva eseja: MTT test, zasnovan na merenju mitohondrijalne respiracije i test određivanja aktivnosti kisele fosfataze (AP test). Analiza vijabiliteta L929 ćelija kao i MRC-5 u prisustvu Co-Cr dentalnih materijala nakon 24, 48 i 72h ukazala je na umereno smanjen broj živih ćelija u kulturama izloženim delovanju Co-Cr materijala nakon 48h i 72h u poređenju sa kontrolnom grupom ćelija koju su rasle u idealnim uslovima na plastici. Zapaženi efekat nije bio u korelaciji sa brojem topljenja i livenja. Zanimljivo je da se u slučaju primarnih fibroblasta, nakon 48h inkubacije, proliferativni potencijal preživelih ćelija u prisustvu Co-Cr materijala u potpunosti dostigao stopu proliferacije kontrolne grupe što je ukazalo na njihovu potpunu adaptaciju na prisustvo ovih materijala. Paralelno, inhibitorni uticaj Ni-Cr legura na vijabilnost i proliferativni kapacitet kako maligno transformisanih tako i primarnih fibroblasta, za razliku od Co-Cr, bio vrlo izražen i u jasnoj korelaciji sa brojem topljenja i livenja. Kolizija rezultata dobijenih MTT u odnosu na AP test, uputila je na činjenicu da oba materijala izazivaju snažan „respiratorni šok“ već u prvih 24h kultivacije maligno transformisanih i primarnih fibroblasta ali i da mitohondrijalna respiracija nije adekvatan parametar za evaluaciju broja živih ćelija u ovom eksperimentalnom sistemu.

Nestimulisane mononuklearne ćelije periferne krvi su nakon 48h duge kultivacije pokazale značajno manju osetljivost na izlaganje dentalnim legurama izmerenu AP testom, izuzev u slučaju uzoraka Ni-Cr dentalne legure nakon maksimalnog testiranog broja topljenja i livenja. Vreme kultivacije ovih ćelija bilo je prilagođeno činjenici da su one nisko proliferativne u odsustvu stimulusa.

Dvostrukim bojenjem Annexin/propidijum-jodidom i sledstvenom analizom metodom protočne citofluorimetrije utvrđeno je da izlaganje primarnih fibroblasta, kao i mononuklearnih ćelija periferne krvi uzorcima dentalnih legura u trajanju od 48h rezultira

indukcijom programirane ćelijske smrti - apoptoze. Uočena nekroza, manifestovana akumulacijom AnnV+/PI+ ćelija, predstavlja nužni kontinuitet procesa umiranja apoptozom u in vitro uslovima, praćen gubitkom propustljivosti ćelijske membrane mnogo pre nego primarni mehanizam citotoksičnosti testiranih legura. Prisustvo umirućih ćelija je, u skladu sa rezultatima testova vijabiliteta, dominiralo kod Ni-Cr legure i koreliralo sa brojem topljenja i livenja.

Kako bi se razjasnio mehanizam koji stoji u osnovi citotoksičnog uticaja dentalnih legura, a imajući u vidu poznate podatke o destruktivnoj ulozi reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta produkovanih u odgovoru na prisutni materijal, proizvodnja azotmonoksida (NO) detektovana je na unutarćelijskom nivou DAF-FM indikatorom, dok su reaktivne kiseonične i azotne vrste (ROS i RNS) određivane pomoću DHR boje. Nivo produkovanih reaktivnih jedinjenja azota i kiseonika je meren nakon 24h inkubacije u prisustvu uzoraka dentalnih legura, imajući u vidu da ovaj događaj vremenski prethodi ćelijskoj smrti. Prisustvo uzoraka dentalnih legura značajno je potenciralo produkciju reaktivnih azotnih i kiseoničnih jedinjenja, čiji nivo je bio znatno veći u kulturi ćelija izloženih uticaju Ni-Cr uzoraka i pozitivno je korelirao sa povećanjem broja topljenja i livenja. Navedeni rezultati su uputili na činjenicu da je u osnovi zapažene citotoksičnosti materijala hiperprodukcija reaktivnih molekula. Zaključno sa ovim rezultatima, potvrđena je pozitivna korelaciju između pada vijabilnosti, prisustva ćelijske smrti i produkcije reaktivnih jedinjenja.

Sumarno, rezultati disertacije nedvosmisleno dokazuju da ponavljano topljenje i livenje Ni-Cr legure dovodi do mikrostrukturnih promena što intezivira njenu citotoksičnost i smanjuje njenu biokompatibilnost. To se manifestuje potenciranom proizvodnjom slobodnih radikala, indukcijom ćelijske smrti i permanentnim smanjenjem ćelijske proliferacije. Sa druge strane, nakon početnog toksičnog dejstva, ćelije se adaptiraju prisutnoj Co-Cr leguri. Nezavisno od broja topljenja i livenja, ispitivani uzorci Co-Cr dentalne legure su pokazali veću biokompatibilnost sa mikrookruženjem, nego uzorci Ni-Cr legure. Suprotno tome, ponavljano topljenje i livenje Ni-Cr legure je povećalo njenu toksičnost.

**Ključne reči:** kobalt-hrom (Co-Cr) legure, nikel-hrom (Ni-Cr) legure, topljenje i livenje dentalnih legura, citotoksičnost, biokompatibilnost.

Naučna oblast: Stomatologija

Uža naučna oblast: Biomaterijali u stomatologiji

UDK broj: 615.46:616.314-7(043.3)



# **Influence of recasting on biological and microstructural properties of dental alloys**

(summary)

Microstructure is the basic factor that determines the properties of any material. The aim of this study is to evaluate the effect of recasting of two commercially available dental alloys, Ni-Cr (Wiron 99) and Co-Cr (Dentalit C), on physiology of cells, as well as comparison those two dental alloys, one containing Ni and the other not.

In this study it was presumed that many times recasted dental alloy has changed microstructure, which influences the physical and mechanical properties and biological quality of the alloy. The specimens of both tested alloys were casted after the first, fourth and eight melting, without adding any amount of new alloy. The microstructural characterization by optical microscopy showed typical dendritic structure of Co-Cr and Ni-Cr alloys after different numbers of recasting. It is well known that the dendritic structure shows differences in chemical composition and that the dendrite branches contain less alloying and trace elements than the interdendritic zone. There were noticed some microstructural changes that were much more obvious by Co-Cr dental alloy. SEM analysis has given more explicit informations about the structure of the examined dental alloys. Based on the binary phase diagram, Ni-Cr alloy shows a wide region of solubility in solid condition Cr in Ni. In a complex system, as it is in Wiron 99, beside the solid solution of Ni rich phase, there are also phases in the interdendritic zones with irregular shapes, depending of the number of recasting. EDS analysis showed the differences in chemical composition of dendritic and the interdendritic zones, that were very small for Wiron 99. For the Co-Cr alloy it was possible to detect the differences in chemical compositions between two zones, dendritic and interdendritic. As the number of recasting was increased, the structure became more homogenous and the difference in the chemical composition was decreased for Co and Mo, while the rest of the tracing elements Cr, Fe and Si were homogenous in the analyzed zones.

X-ray analysis of the specimens of the Ni-Cr dental alloy indicate that there were only reflections of face centered cubic crystal lattice of solid solution of  $\alpha$ -Ni phase. It was established that the increase of the number of recasting changes the relative intensity of diffraction maximum. Also, there were changes in the preferred orientation of the crystallites with the increase of the number of recasting. The reason for this could be found in the change of chemical composition of the alloy during successive recasting and

including of alloying elements in specific planes. This explanation can be given for the reflection in plane  $(220)_{\text{fcc}}$  that are not seen in the X-ray diffractograms of the specimens after one casting. With increase of the number of recasting broad of diffraction peak corresponding to the  $(111)_{\text{fcc}}$  plane decreased, while the crystallite size and the degree of orderliness increases. XRD analysis of the specimens of Co-Cr dental alloys indicates the presence of two Co rich phases. It can be assumed that dendritic and interdendritic regions correspond to hcp and fcc crystal structure.

To evaluate the potential toxicity of different dental alloy samples in correlation with the number of recasting, in the present study preliminary experiments were performed on mouse fibrosarcoma cell line L929, and after that on human embryonal fibroblasts (MRC-5) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). In oral environment, this types of cells are in contact with the tested dental materials. The cytotoxicity was evaluated through the influence of dental alloy samples on cell viability. For this purpose there were chosen two tests, MTT assay and acidic phosphatase test. L929 cell viability analysis, as well as MRC-5, in presence of Co-Cr dental alloy samples after 24, 48 and 72h, showed moderately decreased cell viability after exposure of 48 and 72h, comparing to the control. This effect was in corelation to the number of recasting. It was interesting that MRC-5, after 48h of incubation, showed that their proliferative potential in presence of Co-Cr dental alloy samples has reached the proliferation rate of the control samples, which showed their full adaptation to the presence of the tested dental alloy samples. Analogous, the inhibitory influence of Ni-Cr samples on viability and proliferative capacity, as well as L929 fibrosarcoma cells and also MRC-5, in opposite to Co-Cr, was very distinctive and in corelation with the number of recasting. Colision of the results of MTT and acidic phosphatase tests lead to the conclusion that both of the dental alloys provoke a strong respiratoty shock, already after 24h of cultivation in presence of L929 and MRC-5, but also that mitochondrial respiration is not an adecvate parameter for cell viability evaluation in this experimental sistem.

Nonstimulated PBMC showed after 48h of cultivation significantly less sensitivity to the presence of the dental alloys measured with acidic phosphatase test, except for Ni-Cr dental alloy after the maximum number of recasting. The cultivation time for this cells was adapted to the fact that those cells were low proliferative in the apsence of external stimuli.

Early apoptotic cells characterized by phosphatidylserine exposure to extracellular environment while cell membrane integrity remains intact were detected using an annexin V- FIT/PI staining kit. Exposure of L929 and MRC-5 to the dental alloy samples for a 48h cultivation time showed induction of programed cell death - apoptosis. Necrosis, manifested by AnnV+/PI + accumulation cells, is a nessesery resumption of the deth process by apoptosis in *in vitro* circumstances, followed by loss of cell membrane permeability much earlier

than the primary toxic mechanism of the tested alloys. The presence of dying cells was in harmony with the viability test results, it was dominant by Ni-Cr alloy samples and in correlation with the number of recasting.

To explain the mechanism that is fundamental for the cytotoxic influence of dental alloys and having in mind the well known fact of the destructive role of reactive molecules ROS and RNS produced in reaction to the present dental material, the production of NO was detected on the intracellular level supported by DAF-FM indicator and the reactive molecules ROS and RNS were determined with DHR indicator. The level of produced ROS and RNS was measured after a 24h incubation period in presence of the alloy samples, having in mind that this occurs before cell death. The presence of dental alloys influenced more production of ROS and RNS and the level of this reactive molecules was much higher by Ni-Cr samples and in positive correlation with the number of recasting. The shown results pointed out the fact that in the base of cytotoxicity of the tested dental alloys is hyperproduction of high reactive molecules. This results led to the conclusion that there is a positive correlation between the decrease of viability, presence of cell death and production of reactive molecules.

All together, results of this study undoubtedly showed that recasting of Ni-Cr dental alloy leads to microstructural changes which decreases biocompatibility. That was manifested by intensified production of free radicals, induction of cell death and permanent decrease of cell proliferation. On the other hand, after the initial toxic effect, the cells adapted to the presence of Co-Cr dental alloy. No matter the number of recasting, the examined Co-Cr dental alloy samples showed higher biocompatibility with the microenvironment, than the Ni-Cr dental alloy samples. On the contrary, Recasting of Ni-Cr dental alloy increased its toxicity.

**Key words:** cobalt-chromium (Co-Cr) dental alloys, nickel-chromium (Ni-Cr) dental alloys, dental alloy recasting, cytotoxicity, biocompatibility.

Scientific field: Dentistry

Speciality: Biomaterials in dentistry

UDK: 615.46:616.314-7(043.3)

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD I NAUČNA OSNOVA PROBLEMA .....</b>	<b>1</b>
1.1.	O razlozima istraživanja .....	3
1.2.	Naučna osnova problema .....	3
<b>2.</b>	<b>PREGLED LITERATURE .....</b>	<b>9</b>
2.1.	Mikrostruktura baznih dentalnih legura .....	9
2.2.	Korozija dentalnih legura .....	10
2.3.	Biokompatibilnost dentalnih legura .....	19
2.4.	Alergije izazvane dentalnim legurama .....	27
<b>3.</b>	<b>CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>29</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIJAL I METOD ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>30</b>
4.1.	Materijal istraživanja .....	30
4.1.1.	Topljenje i livenje uzoraka dentalnih legura .....	30
4.1.2.	Priprema uzoraka .....	32
4.1.3.	Reagensi i rastvori .....	32
4.1.4.	Ćelijske linije .....	33
4.1.5.	Priprema i kultivacija adherentnih ćelijskih linija .....	33
4.1.5.1.	Tripsinizacija .....	33
4.1.5.2.	Bojenje .....	33
4.1.5.3.	Izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi .....	34
4.1.6.	Priprema uzoraka za biološke eksperimente .....	34
4.1.7.	Priprema ćelija za biološke eksperimente .....	34
4.2.	Metod istraživanja .....	35
4.2.1.	Mikrostrukturna karakterizacija legura .....	35
4.2.2.	Rendgenostrukturna analiza (XRD) .....	35
4.2.3.	Merenje makro i mikrotvrdoće .....	35
4.2.4.	Testovi za određivanje vijabiliteta .....	36
4.2.4.1.	MTT test .....	36
4.2.4.2.	Test vijabiliteta merenjem kisele fosfataze .....	36
4.2.4.3.	Određivanje prisustva ćelijske smrti dvostrukim aneksin-propidijum jodid bojenjem .....	36
4.2.4.4.	Merenje intracelularnog azotmonoksida (NO) i reaktivnih kiseoničnih (ROS) i azotnih (RNS) jedinjenja .....	37

4.3.	Statistička obrada podataka .....	38
<b>5.</b>	<b>REZULTATI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>39</b>
5.1.	Rezultati ispitivanja mikrostrukturne karakterizacije uzoraka dentalnih legura ..	39
5.2.	Poroznost odlivaka .....	46
5.3.	Rezultati rendgenostrukturne analize (XRD) .....	48
5.3.1.	Rezultati rendgenostrukturne analize uzoraka legure Wiron 99 .....	49
5.3.2.	Rezultati rendgenostrukturne analize uzoraka legure Dentalit C .....	51
5.4.	Rezultati merenja makro i mikrotvrdoće ispitivanih dentalnih legura .....	52
5.5.	Rezultati testova za ispitivanje vijabiliteta .....	60
5.5.1.	Rezultati testova za ispitivanje vijabiliteta na L929 ćelijama .....	60
5.5.1.1.	Rezultati ispitivanja vijabiliteta L929 ćelija MTT testom .....	60
5.5.1.2.	Rezultati ispitivanja vijabiliteta L929 ćelija testom kisele fosfataze .....	65
5.5.2.	Rezultati testova za ispitivanje vijabiliteta na MRC-5 ćelijama .....	70
5.5.2.1.	Rezultati ispitivanja vijabiliteta pomoću MRC-5 ćelija MTT testom .....	71
5.5.2.2.	Rezultati ispitivanja vijabiliteta pomoću MRC-5 ćelija testom kisele fosfataze .....	75
5.5.3.	Rezultati testova za ispitivanje vijabiliteta na PBMC .....	79
5.5.3.1.	Rezultati testova za ispitivanje vijabiliteta na PBMC testom kisele fosfataze ...	79
5.5.4.	Rezultati određivanja prisustva ćelijske smrti dvostrukim aneksin-propidijum jodid bojenjem .....	83
5.5.5.	Rezultati merenja intracelularnog azotmonoksida (NO) i reaktivnih kiseoničnih (ROS) i azotnih (RNS) jedinjenja .....	86
<b>6.</b>	<b>DISKUSIJA .....</b>	<b>91</b>
6.1	Diskusija rezultata istraživanja .....	92
<b>7.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>99</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>101</b>
	<b>BIOGRAFIJA AUTORA .....</b>	<b>116</b>

## 1. UVOD I NAUČNA OSNOVA PROBLEMA

U svakodnevnoj stomatološkoj praksi, dentalne legure su često zastupljene kao gradivni materijali, kako za fiksne, tako i za mobilne zubne nadoknade. Dentalne legure imaju dugu tradiciju u stomatologiji, a zlato se pominje kao prvi korišćeni restaurativni metal u stomatologiji još pre 4000 godina (125). Tehnika livenja metala poznata je iz antičkog doba, ali tek pronalaskom aparata za livenje 1907. godine i primenom centrifugalne sile pri livenju počinje primena dentalnih legura u pravom smislu te reči (125). Bazne dentalne legure su uveli u stomatologiju Eardle i Prange 1930. godine. Ove legure, pored niske cene, odlikuje i mala specifična gustina, što ih čini pogodnim za upotrebu u stomatologiji (14, 40, 46, 89, 131).

Osnovni medicinski zahtev postavljen pred ove materijale je da nisu toksični po ljudski organizam. Međutim, način izrade nadoknada od dentalnih legura je u koliziji sa ovim zahtevom: dentalne legure se termički obrađuju, čime dobijaju bolja mehanička svojstva, ali se smanjuje njihov biološki kvalitet. Biološki kvalitet dentalnih legura objašnjava se njihovom biokompatibilnošću, a to, u širem smislu predstavlja harmoničan odnos nekog materijala i živih ćelija u njegovom okruženju. To je svojstvo materijala da u kontaktu sa živim tkivom ne izaziva štetne efekte. Biokompatibilnost je širok pojam. Kako bi se bliže definisao, nastali su još neki termini sa prefiksom bio-, a uloga im je da bliže objasne uticaj tj., interakciju materijala i živih ćelija. Biotolerantni su oni materijali koje tkivo toleriše, ali ih prepoznaje kao strana tela. Bioinertni su oni materijali na koje tkivo ne reaguje, a ćelije tkiva ih ne razlikuju od sopstvenih živih ćelija. Bioreaktivni su oni materijali koji svojim prisustvom u živom tkivu indukuju biološku reakciju ćelija i kao rezultat te reakcije dolazi do stvaranja hemijske veze između površine materijala i ćelija. Primer za bioreaktivnost, koja predstavlja najviši stupanj biokompatibilnosti, jeste osteointegracija u implantologiji. Materijali koji se u stomatologiji svakodnevno koriste trebalo bi da opravdaju naziv biomaterijali, s obzirom na to šta se od njih očekuje. Biokompatibilnost nekog materijala određuje se na dva načina: odgovorom organizma na prisustvo biomaterijala i uticajem biomaterijala na ćelije i tkiva u okruženju prilikom svoje degradacije. Biomaterijali, u zavisnosti od toga kakvu interakciju imaju sa tkivima sa kojima su u kontaktu, mogu biti biološki neaktivni ili bioaktivni, toksični ili netoksični, resorptivni ili neresorptivni i td.

Dentalne legure treba da budu postojane u specifičnoj korozijskoj sredini, kao što je usna duplja, dugi niz godina, (141). U takvoj sredini deluju mnogi individualni faktori domaćina: pH pljuvačke, termički uticaji, konzumacija začinjene hrane, alkohola, cigareta, bruksizam, uzimanje lekova, i td. Svi ovi uticaji dovode do prirodnog starenja legura.

Starenje materijala, kao univerzalni proces, ispoljava se kao: degradacija, korozija, habanje i zamor. Korozija je od posebnog značaja, imajući u vidu specifične uslove koji postoje u usnoj duplji (102, 124, 125).

Dentalna industrija teži stvaranju novih legura koje bi bile biokompatibilne i elektrohemijski otporne u korozionoj sredini, a istovremeno dobrih mehaničkih svojstava. Jasno je da idealna dentalna legura ne postoji, ali se na tržištu može naći veliki broj dentalnih legura različitog sastava, različitih fizičko-mehaničkih svojstava, različitog biološkog kvaliteta i upravo sva ta svojstva određuju njihovu pravu namenu i upotrebu u izradi stomatoloških nadoknada, (152).

Postoji veliki broj podela dentalnih legura, a najvažnija je podela dentalnih legura prema sadržaju plemenitih metala na: visokoplemenite, plemenite i bazne\*. Mnogi autori svoja istraživanja vezuju za svojstva određenih legura iz iste grupe kojoj pripadaju prema sastavu. Otpornost na koroziju je svojstvo dentalnih legura koje determiniše biološki potencijal ovih materijala, kao i njihovu mehaničku otpornost. Na osnovu ovih svojstava, napravljena je podela dentalnih legura (86) prema kojoj je u odnosu na otpornost na elektrohemijsku koroziju data podela na pet grupa, a kao referentni materijali korišćeni su Au i Zn.

---

\*ADA, Alloy Classification, 1984.

## 1.1. O razlozima istraživanja

Razlog za ovo istraživanje je proistekao iz problema koji je prisutan u svakodnevnoj stomatološkoj praksi. Naime, u većini zemalja koje nisu na visokom stepenu ekonomskog razvoja, ostaci od livenja se ne bacaju, već se ponovo tope i liju. Dobijeni odlivci nemaju više onakav sastav kakav su imali posle prvog topljenja, a kakav je sastav ovako dobijene nadoknade i kakav je biološki kvalitet iste, pitanje je kojim se bave mnogi naučnici (3, 25, 29, 85, 121). Ovakvo recikliranje dentalnih legura dovodi do toga da nadoknada dobijena na ovaj način ni po biološkim, ni po fizičko-mehaničkim svojstvima ne odgovara uputstvu za korišćenje i standardima proizvođača (67).

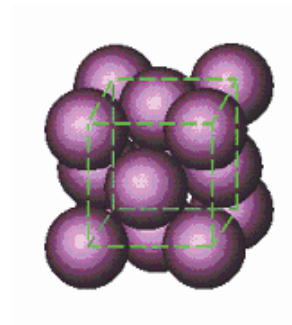
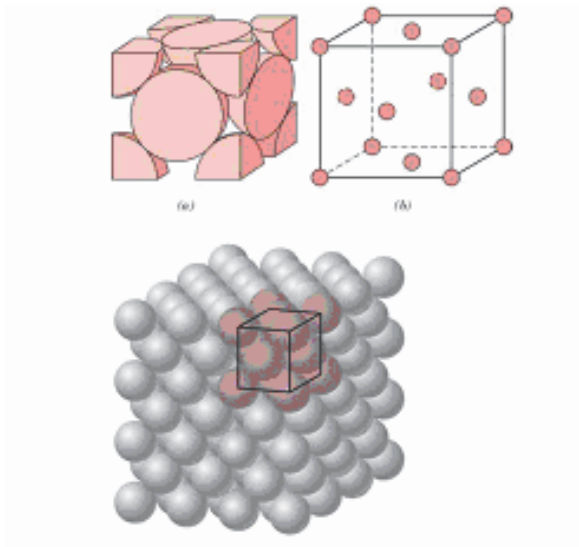
Brojni su klinički primeri, kao i podaci iz literature, koji govore o tome da ponovljena topljenja i livenja značajno utiču na povećanje citotoksičnosti dentalnih legura (3, 49, 68, 88, 117, 146). Suština ove pojave leži u činjenici da biološku reakciju ćelija izazivaju oslobođene čestice metala (97, 99), a reakcije koje se mogu javiti ispoljavaju se kao alergijske manifestacije (129, 131), lokalna prebojenost gingive (135), toksične inflamatorne manifestacije lokalnog tipa na oralnom epitelu (115, 116, 130, 134) i dr.

## 1.2. Naučna osnova problema

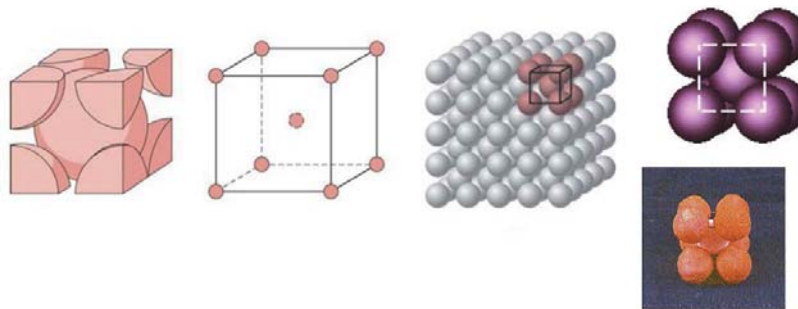
Da bi se dobio željeni odlivak dentalne legure se moraju zagrejati do određene temperature na kojoj su u tečnom stanju i tako se mogu izliti. Pri hlađenju dobijenog odlivka, dolazi do prelaska legure iz tečnog u čvrsto stanje, pri čemu dolazi do stvaranja kristalne rešetke. Kristalizacijom atomi unutar kristalne rešetke zauzimaju pravilan raspored, tj. grade prostornu rešetku.

- Svi metali, izuzev Mn i Hg, kristališu u jednoj od tri karakteristične metalne strukture:
- površinski centrirana kubna (fcc) slika 1,
  - prostorno centrirana kubna (bcc) slika 2 ili
  - gusto složena heksagonalna kristalna rešetka (hcp) slika 3.

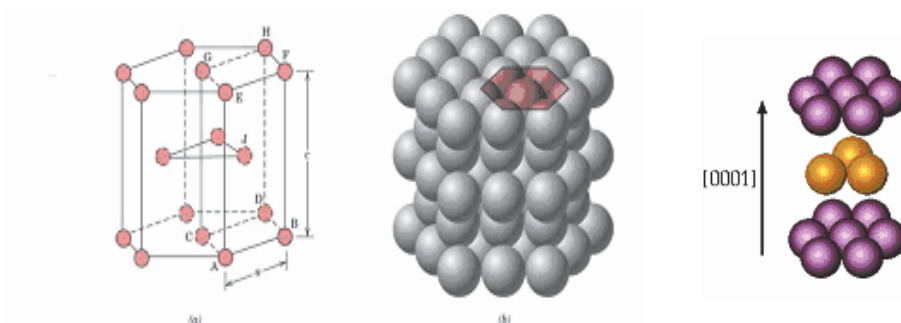




Slika 1. Površinski centrirana kubna rešetka (FCC). Atomi prisutni u temenima i preseku dijagonala



Slika 2. Prostorno centrirana kubna rešetka (BCC). Atomi su u temenima i preseku prostorne dijagonale



Slika 3. Gusto složena heksagonalna kristalna rešetka (HCP). Atomi su u temenima i u bazi šestougaone prizme, a tri atoma su u prostoru prizme

Dentalno tržište nudi veliki broj legura kako na bazi Co-Cr-Mo tako i na bazi Ni-Cr. Za sve njih može se zajednički reći da su to višekomponentni čvrsti rastvori, koji se mogu posmatrati kao pseudobinarne legure. Jednu komponentu čini čvrsti rastvor na bazi Co-Cr, odnosno Co-Cr-Mo (kod legure Dentalit C), odnosno Ni-Cr (kod legure Wiron 99) što predstavlja metalnu fazu. Drugu komponentu čine razna inermetalna jedinjenja, gde se ubrajaju i karbidi, a zajedno čine nemetalnu fazu.

Poznato je da Co i Cr imaju bliske atomske prečnike, što takođe važi i za Ni i Cr, što se vidi po položaju ovih elemenata u periodnom sistemu (slika 4).

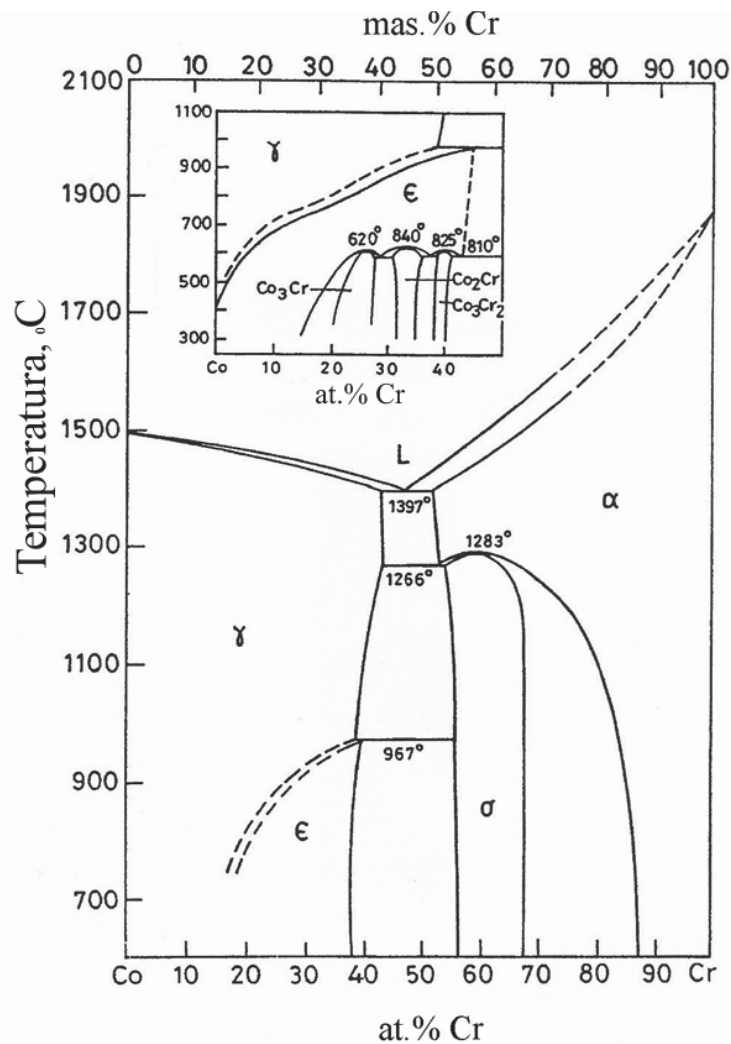
Laki metali		d-Prelazni elementi										Nemetali					Inertni gasovi																																																						
IA		Teški metali										III A					VIII																																																						
II A		Visokotopivi										IV A					He																																																						
		Krti					Kovni					V A																																																											
												VI A																																																											
												VII A																																																											
1 H 1s <sup>1</sup>	2 Li 2s <sup>1</sup>	3 Na 3s <sup>1</sup>	4 Be 2s <sup>2</sup>	5 B 2s <sup>2</sup> 2p <sup>1</sup>	6 C 2s <sup>2</sup> 2p <sup>2</sup>	7 N 2s <sup>2</sup> 2p <sup>3</sup>	8 O 2s <sup>2</sup> 2p <sup>4</sup>	9 F 2s <sup>2</sup> 2p <sup>5</sup>	10 Ne 2s <sup>2</sup> 2p <sup>6</sup>	11 Na 3s <sup>1</sup>	12 Mg 3s <sup>2</sup>	13 Al 3s <sup>2</sup> 3p <sup>1</sup>	14 Si 3s <sup>2</sup> 3p <sup>2</sup>	15 P 3s <sup>2</sup> 3p <sup>3</sup>	16 S 3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup>	17 Cl 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup>	18 Ar 3s <sup>2</sup> 3p <sup>6</sup>	19 K 4s <sup>1</sup>	20 Ca 4s <sup>2</sup>	21 Sc 4s <sup>2</sup> 3d <sup>1</sup>	22 Ti 4s <sup>2</sup> 3d <sup>2</sup>	23 V 4s <sup>2</sup> 3d <sup>3</sup>	24 Cr 4s <sup>1</sup> 3d <sup>5</sup>	25 Mn 4s <sup>2</sup> 3d <sup>5</sup>	26 Fe 4s <sup>2</sup> 3d <sup>6</sup>	27 Co 4s <sup>2</sup> 3d <sup>7</sup>	28 Ni 4s <sup>2</sup> 3d <sup>8</sup>	29 Cu 4s <sup>1</sup> 3d <sup>10</sup>	30 Zn 4s <sup>2</sup> 3d <sup>10</sup>	31 Ga 4s <sup>2</sup> 4p <sup>1</sup>	32 Ge 4s <sup>2</sup> 4p <sup>2</sup>	33 As 4s <sup>2</sup> 4p <sup>3</sup>	34 Se 4s <sup>2</sup> 4p <sup>4</sup>	35 Br 4s <sup>2</sup> 4p <sup>5</sup>	36 Kr 4s <sup>2</sup> 4p <sup>6</sup>	37 Rb 5s <sup>1</sup>	38 Sr 5s <sup>2</sup>	39 Y 5s <sup>2</sup> 4d <sup>1</sup>	40 Zr 5s <sup>2</sup> 4d <sup>2</sup>	41 Nb 5s <sup>1</sup> 4d <sup>4</sup>	42 Mo 5s <sup>1</sup> 4d <sup>5</sup>	43 Tc 5s <sup>1</sup> 4d <sup>6</sup>	44 Ru 5s <sup>1</sup> 4d <sup>7</sup>	45 Rh 5s <sup>1</sup> 4d <sup>8</sup>	46 Pd 4d <sup>10</sup>	47 Ag 5s <sup>1</sup> 4d <sup>10</sup>	48 Cd 5s <sup>2</sup> 4d <sup>10</sup>	49 In 5s <sup>2</sup> 5p <sup>1</sup>	50 Sn 5s <sup>2</sup> 5p <sup>2</sup>	51 Sb 5s <sup>2</sup> 5p <sup>3</sup>	52 Te 5s <sup>2</sup> 5p <sup>4</sup>	53 I 5s <sup>2</sup> 5p <sup>5</sup>	54 Xe 5s <sup>2</sup> 5p <sup>6</sup>	55 Cs 6s <sup>1</sup>	56 Ba 6s <sup>2</sup>	57 La* 6s <sup>2</sup> 5d <sup>1</sup>	72 Hf 6s <sup>2</sup> 5d <sup>2</sup>	73 Ta 6s <sup>2</sup> 5d <sup>3</sup>	74 W 6s <sup>2</sup> 5d <sup>4</sup>	75 Re 6s <sup>2</sup> 5d <sup>5</sup>	76 Os 6s <sup>2</sup> 5d <sup>6</sup>	77 Ir 6s <sup>2</sup> 5d <sup>7</sup>	78 Pt 6s <sup>1</sup> 5d <sup>9</sup>	79 Au 6s <sup>1</sup> 5d <sup>10</sup>	80 Hg 6s <sup>2</sup> 5d <sup>10</sup>	81 Tl 6s <sup>2</sup> 6p <sup>1</sup>	82 Pb 6s <sup>2</sup> 6p <sup>2</sup>	83 Bi 6s <sup>2</sup> 6p <sup>3</sup>	84 Po 6s <sup>2</sup> 6p <sup>4</sup>	85 At 6s <sup>2</sup> 6p <sup>5</sup>	86 Rn 6s <sup>2</sup> 6p <sup>6</sup>
87 Fr 7s <sup>1</sup>	88 Ra 7s <sup>2</sup>	89 Ac** 7s <sup>2</sup> 6d <sup>1</sup>	Plemeniti										Niskotopivi																																																										

\*Lantanidi } f-Prelazni elementi  
\*\*Aktinidi }

Slika 4. Periodni sistem elemenata

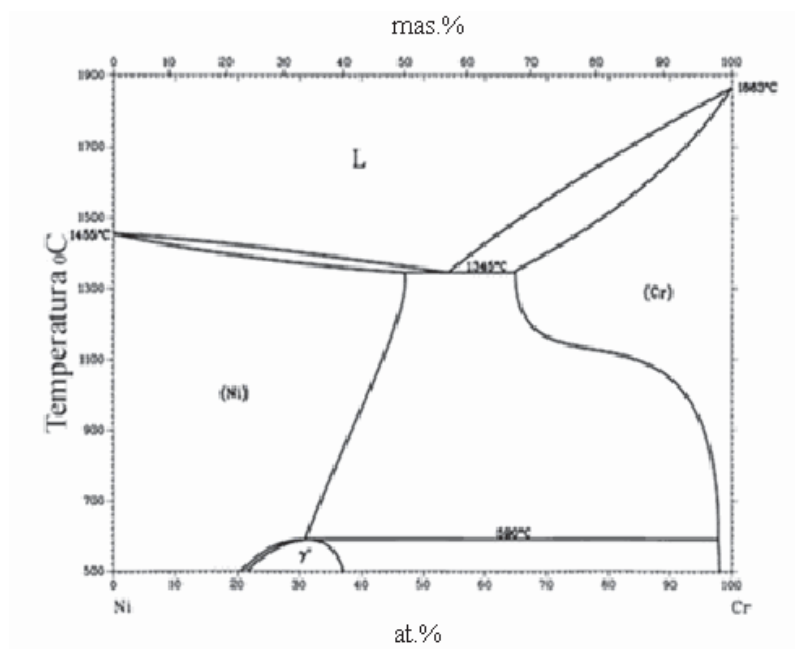
Iz tih razloga Ni i Cr i Co i Cr mogu obrazovati širok niz čvrstih rastvora (slika 5 i 6). U zavisnosti od njihovog međusobnog masenog odnosa i određene temperature, zapaža se zakonitost u njihovoj međusobnoj rastvorljivosti i formiranju određene kristalne rešetke, izdvajanjem primarnih kristala pri procesu hlađenja, odnosno pri prelasku iz tečnog u čvrsto stanje.

Na slici 5 prikazan je ravnotežni dijagram stanja Co-Cr. Za ovaj sistem je karakteristična eutektička reakcija na temperaturi od 1397°C, eutektičkog sastava 42 mas. (45 at.) % Cr. Na dijagramu se može uočiti nekoliko oblasti postojanja pojedinih faza:  $\gamma$ -Co (fcc),  $\epsilon$ -Co (hcp),  $\alpha$ Cr i intermetalna  $\sigma$  faza promenljivog hemijskog sastava sa aproksimativno 55-62 mas. (58-65 at.) % Cr. Još jedna bitna karakteristika ovog dijagrama stanja je uzak interval očvršćavanja što utiče na pojavu niskog stepena kristalne segregacije.



Slika 5. Ravnotežni dijagram stanja Co-Cr (60)

Ravnotežni dijagram stanja Ni-Cr (slika 6) karakteriše eutektička reakcija i peritektoidno formiranje  $\text{Ni}_2\text{Cr}$ . Generalno prihvaćena forma dijagrama se sastoji od jednostavnog eutektikuma na visokoj temperaturi (eutektička temperatura  $1345^\circ\text{C}$ ) sa reakcijom sređivanja na nižoj temperaturi. Peritektoidno razlaganje  $(\text{Ni}) + (\text{Cr})$  u  $\gamma'$  (sređenu  $\text{Ni}_2\text{Cr}$  fazu) na  $590^\circ\text{C}$  je prikazano na prihvaćenom dijagramu stanja Ni-Cr. Kao i u slučaju dijagrama stanja Co-Cr uočava se veoma uzak temperaturni interval očvršćavanja legura sa visokim sadržajem Ni.



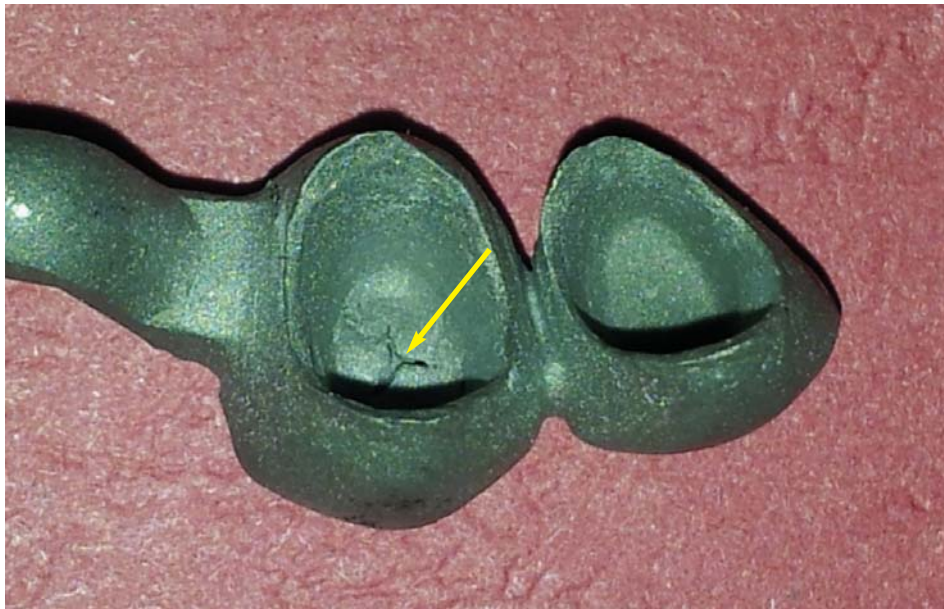
Slika 6. Ravnotežni dijagram stanja Ni-Cr (10)

Ponavljana topljenja i livenja dentalnih legura ne utiču samo na mikrostrukturu i fizičko-mehanička svojstva (105), već i na biološki kvalitet dobijenih nadoknada (24, 95, 109, 110, 140). Mikrostruktura materijala predstavlja osnovni parametar koji određuje njegova svojstva. Ukoliko se promeni mikrostruktura, promeniće se i fizička svojstva materijala. Čak i mala odstupanja od preporučenih uslova livenja od strane proizvođača, dovode do značajnih mikrostrukturnih promena Ni-Cr i Co-Cr dentalnih legura (69). Co, Cr i Mo mogu da grade karbide. Karbidi se talože na granicama zrna i vide kao zadebljanja. Što je temperatura livenja viša, to je razmak između čestica karbida veći. Takođe, što je viša temperatura livenja, brže je i hlađenje odlivka, te se tako dobija diskontinuirana struktura karbida. Temperature topljenja za legure na bazi Co su od 1400-1500°C, a za Ni-Cr legure 1275°C. Produženo grejanje, takođe, može dovesti do smanjenja kvaliteta dobijenih odlivaka.

Od temperature topljenja i livenja, kvaliteta vatrostalne mase i načina ulaganja, zavisi i poroznost dobijenog odlivka. Na poroznost utiče i veličina objekta, lokalizacija i prečnik ulivnih kanala i dr. Primeri grešaka u livenju prikazani su na slikama 7 i 8.



Slika 7. Greške u livenju uočljive na frezovanom mestu namenske krunice sa atečmenom



Slika 8. Greške u livenju vidljive na unutrašnjoj površini okluzalnog dela krunice

## 2. PREGLED LITERATURE

Primena legura zlata je, pored mnogih kvaliteta koje imaju, limitirana iz ekonomskih razloga. Zato se na tržištu može naći veliki broj tzv. baznih ili „špar-legura”, čija je cena pristupačnija. Kako iz dugogodišnje primene u praksi, tako i iz literaturnih podataka poznat je kvalitet dentalnih legura na bazi zlata. S obzirom na to da protetski radovi ostaju u ustima pacijenta dugi niz godina i da za to vreme trpe razne uticaje i promene, dentalna industrija poslednjih decenija teži razvoju takvih dentalnih legura koje bi bile i biološko-mehanički i ekonomski zadovoljavajuće.

Dobies, K. et al. sprovedli su u Poljskoj eksperimentalnu studiju na različitim Ni-Cr legurama i pratili su kontrakciju prilikom livenja (41). Ovo istraživanje je izvršeno u cilju savetovanja stručne javnosti o tome kako izabrati adekvatnu dentalnu leguru i tehnologiju izrade protetskog rada na legurama koje sadrže Ni. U zaključku ovog istraživanja autori nemaju eksplicitan odgovor, već potenciraju potrebu za daljim ispitivanjima legura na bazi Ni, jer se ove legure sve više koriste u struci kao zamena za plemenite legure, iz ekonomskih razloga. Stručna literatura obiluje referencama sa sličnim, a često i protivurečnim zaključcima.

### 2.1. Mikrostruktura baznih dentalnih legura

Gatin, E. et al. proučavali su Ni-Cr dentalne legure sa ciljem da se proceni kvalitet livenih dentalnih restauracija (56). Za potrebe izrade fiksnih i mobilnih zubnih nadoknada koriste se mnogobrojne dentalne legure, a to otežava procenu kvaliteta ovih materijala u tehničkom, biološkom i kliničkom smislu. Ovaj rad je u prvi plan stavio termičke faktore, topljenje i livenje, prilikom izrade zubnih nadoknada, kod Ni-Cr dentalnih legura, kao glavne razloge koji determinišu fizičko-hemijska svojstva i kvalitet dobijenih nadoknada. Pomoću elektronskog mikroskopa, prvo je izvršeno poređenje kvaliteta površine neobrađenog i obrađenog uzorka. Pomoću EDX analize utvrđene su znatne razlike između obrađenih i neobrađenih uzoraka. Autori naglašavaju da je testiranje Ni-Cr legura od velikog značaja za struku pre svega zbog njihove interakcije sa okolnim tkivima. Na osnovu dobijenih rezultata, autor zaključuje da je za kvalitet dobijenih nadoknada od presudnog značaja način zagrevanja, topljenja i izlivanja. Takođe, veoma je važna i procedura centrifugiranja i hlađenja, za koje se preporučuje da traju dovoljno dugo.

Kulmburg, A. et al. su proučavali mikrostrukturu Co-Cr-Mo dentalnih legura pomoću SEM-a i TEM-a (79). Testirane su dve dentalne legure, jedna sa 0,4%C, 30%Cr, 5%Mo i ostatak je bio Co, dok je druga legura bila sličnog sastava uz dodatak 1%Nb. Ova druga legura, koja ima dvofaznu mikrostrukturu posmatrana pod svetlosnim optičkim mikroskopom, ima znatno kompleksniju strukturu nego što se pretpostavlja. Slika dobijena pomoću TEM pokazala je da kod obe legure postoji veoma fina eutektička struktura zahvaljujući visokom sadržaju Co kao i  $M_{23}C_6$  i  $M_6C$  karbida, gde M predstavlja Co, Cr ili neki drugi metal. Takođe, legura sa Nb sadrži veoma fine niobium-karbonitride. Na osnovu otkrivene izuzetno fine ternarne eutektičke strukture moguće je objasniti dobru livnost ove dve legure.

De Oliveira Bauer, J. R. et al. ispitivali su mikrotvrdoću uzoraka Ni-Cr legura izlivenih pod različitim uslovima livenja (38). Uslovi livenja bili su: (1) vazduh i centrifugalna mašina za livenje, pod nekontrolisanim uslovima za livenje, (2) elektromagnetna indukcija, pod argonom u kontrolisanim uslovima, (3) elektromagnetna indukcija u vakuumu, (4) elektromagnetna indukcija u nekontrolisanim uslovima livenja. Testirane su tri legure: Ni-Cr-Mo-Ti, Ni-Cr-Mo-Be i Ni-Cr-Mo-Nb. Izvršeno je četiri livenja i izliveno je po pet cilindričnih uzoraka prečnika 1,6mm i dužine 15mm. Nakon izlivanja uzorci su postavljeni u smolu i polirani. Na osnovu rezultata, autori su doneli zaključak da mikrotvrdoća legura zavisi od njihovog sastava i načina livenja. Tvrdoća Ni-Cr legura je veća kada se lije u uslovima elektromagnetne indukcije na vazduhu pomoću centrifuge. Ozyegin L. S. et al. takođe su proučavali tvrdoću baznih dentalnih legura i došli do zaključka da tvrdoća raste sa povećanjem zastupljenosti karbida (105).

## 2.2. Korozija dentalnih legura

Korozija je jedan od faktora koji je pokazatelj starenja legure. Mnogi autori su proučavali koroziju dentalnih legura u različitim uslovima, Nascimento M. L. et al. (95), Roach M. et al. (112), Saji V. S. et al. (113), Venugopalan R., R. L. W. Messer (136), Wylie C. M. (153), Yfantis C. D. (156), Özdemir S. (157).

Ayad M. F. et al. proučavali su koroziju visoko plemenite legure zlata u izvornom obliku i nakon topljenja i livenja (12). Površinska struktura je proučavana skening elektronskom mikroskopijom (SEM), a kompozicija pojedinih elemenata pomoću energijske disperzione spektroskopije (EDX). Obe grupe uzoraka su posmatrane sa 3 strane. Zaključak pokazuje da obe grupe visoko plemenite legure zlata pokazuju pasivnost pod elektrohemijskim uslovima sličnim onim koji postoje u usnoj duplji.

Mnogi objavljeni radovi su potvrdili postojanje korozije kod dentalnih legura. Garhammer, P. et al. proučavali su prisustvo metala u biopsijama uzetih iz okoline dentalnih legura (55). Cilj rada bio je da se ispita prisustvo metala u biopsijama oralnih tkiva iz neposredne okoline metalnih nadoknada, gde su postojali znaci inflamacije ili diskoloracije i kontrolnih uzoraka koji nisu u blizini metalnih radova i bez prisustva ovih znakova, kod 28 pacijenata. Analiziran je sastav legura i upoređen je sa sastavom komponenti pronađenih u bioptiranim tkivima. Analiza tkiva izvršena je pomoću atomske apsorpcione spektroskopije. Takođe, izvršena je i rendgenostrukturalna analiza. U najvećem broju slučajeva (84%), najmanje jedan pronađeni metal koji je bio sastojak dentalne legure, pronađen je i u okolnom bioptiranom uzorku tkiva. Autori kao zaključak ovog rada navode da se metalne komponente skoro svih dentalnih legura za livenje mogu naći u okolnom tkivu.

Laurent, F. et al. vršili su komparaciju korozionog ponašanja dve dentalne legure (Ni-Cr i legure zlata), u prisustvu oralnih bakterija (*Actinomyces viscosus* ATCC 19246), (80). Ceo eksperiment izveden je u veštačkoj salivi u kojoj je uzgajen navedeni soj bakterija, uz dodatak sterilnog ekstrakta kvasca. Praćeni su: potencijal otvorenog kola, potenciodinamička kriva, polarizaciona otpornost i spektroskopska impendansa. Potencijal otvorenog kola je kod neplemenitih legura uvek niži nego kod legura zlata, a naseljavanje bakterija na površini metala stvara prekid u kolu. Spektroskopska impendansa pokazuje da elektrolitička rezistencija opada između uzoraka sa veštačkom salivom, kvascem i bakterijama, s tim što je u prisustvu bakterija kod legure zlata polarizaciona rezistencija bila u opadanju, a kod bazne legure je imala blagi porast. Uticaj bakterije *Actinomyces viscosus* može se objasniti razgradnjom sloja kiseonika u dodirnoj površini metala i elektrolita. Kod baznih legura razgradnja ovog sloja kiseonika dovela je do povećanja polarizacione rezistencije, dok se blagi pad istog parametra kod plemenite legure objašnjava prisustvom organskih i neorganskih metabolita koje otpuštaju bakterije u elektrolit. Skening elektronska mikroskopija nakon elektrohemijske analize je potvrdila odsustvo kontaminenata. Ovaj eksperiment je nedvosmisleno potvrdio uticaj bakterija na koroziono ponašanje dentalnih legura.

Garhammer, P. et al. ispitivali su sadržaj metala u salivi pacijenata sa i bez prisutnih metalnih restauracija (54). Analiziran je sastav legure za livenje kod svakog pacijenta koji je imao u ustima protetski rad od legure, pomoću EDX analize bioptiranog uzorka i kompariran je sa metalima pronađenim u salivi. Analiza salive izvršena je pomoću atomske apsorpcione spektroskopije. Hemijska analiza obuhvatala je Ag, Au, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, Ni, Pd, Pt, Sn i Zn. Metali Ag, Cr, Cu, Fe, Ni i Zn nađeni su u salivi pacijenata koji nisu imali metalne restauracije u ustima. Metali Ag, Au, Cr, Cu, Fe, Ni i Zn nađeni su u salivi pacijenata sa metalnim restauracijama i to u većoj koncentraciji nego u kontrolnoj



grupi. U 77% slučajeva najmanje jedan metal je pronađen u salivi pacijenta. Sadržaj metala je imao statistički značajnu razliku između ponavljanih uzoraka kod istog pacijenta, uzetih u različito vreme. Sadržaj metala u salivi zavisi od prisustva metalnih radova u ustima pacijenta, ali i od mnogih drugih faktora, te se, kako autori zaključuju, ovi podaci ne mogu koristiti kao siguran indikator za otpuštanje metala iz dentalnih legura.

Hani H. je ispitivao korozijske promene na površini krunica uklonjenih iz usta pacijenta koristeći SEM (Scanning Electron Microscopy) i EPMA (Electron Probe MicroAnalysis), (63). Posmatrana su 34 uzorka koji su podeljeni u 4 kategorije, zavisno od tipa legure. Komparirane su površine krunica i sveži preseki površine krunica, kao i rezultati ranijih istraživanja. Promene kod legura zlata bile su neznatne osim u malom sadržaju Cu. Promene kod Ni-Cr legura bile su na nivou dendritne strukture i rastvorljivosti, kao i smanjenja Ni i blagog povećanja Si i Cr.

Häsler P. A. je ispitivao hemijsku koroziju Ni-Cr legure. Pre ispitivanja biokompatibilnosti neophodno je ispitati koroziju legure (66). Ovo ispitivanje je obuhvatilo merenje anodne polarizacije u zavisnosti od pH sredine i sastava elektrolita. Rezultati su pokazali da ispitivana Ni-Cr legura ima dobru otpornost prema koroziji u odnosu na komercijalne legure sličnog sastava.

Liu J. S. Q. et al. su pratili otpuštanje elemenata iz Ni-Cr legure u veštačkoj salivi i rastvoru soli, a cilj im je bio da dokažu da li period imerzije i različiti imerzioni mediji i faktori utiču na ovu pojavu (82). Površina uzoraka legura je posmatrana pomoću SEM-a. Rezultati su pokazali da osim Ni u veštačkoj salivi, ni jedan drugi element nije pronađen nakon perioda od 7 dana. Nakon 30 dana akumuliran je oslobođeni Cr u oba medijuma i Ni u veštačkoj salivi. Nakon perioda od 82 dana zastupljenost Ni, Cr, Be, Al i Co je značajno povećana osim Mo u oba medijuma i Co u veštačkoj salivi. Ukupna količina otpuštenih elemenata u rastvoru soli bila je veća nego u veštačkoj salivi. Zaključak ovog rada pokazuje da se produženim periodom imerzije povećavao i broj i količina otpuštenih elemenata u medijumima. Dokazana je veća sklonost koroziji legura u rastvoru soli nego u veštačkoj salivi. Slično istraživanje je opisao i Sharma M. (120).

Liu Y. i Fujii H. pratili su otpuštanje metalnih jona sa restauracija izrađenih od legura metala (83). Uzeti su mali uzorci iz usta pacijenata sa površine metala i posmatrani su EDX fluorescentnom spektrometrijom. Kod 14 pacijenata od ukupno 120 uzoraka, postojala je sumnja na alergiju na metal. Deset najčešće prisutnih metala bili su: Ag, Cu, Au, Pd, Zn, Sn, Co, Cr, In i Mo. Vrsta i procenat sadržaja ovih elemenata u legurama iznosio je: 65,0%

Au-Ag-Pd, 2,5% Ag-Sn-Hg amalgam, 5,4% legura Ag, 14,6% legura Au i 10,1% legura Ni-Cr i Co-Cr. Autori izvode zaključak da u cilju prevencije alergije na metale kod pacijenata treba izbegavati više različitih metala koji sadrže Ni i Hg, u ustima istog pacijenta.

Ozdemir S. i Arikian A. proučavali su efekte ponavljano topljenja i livenja na količinu produkata korozije kod dve Ni-Cr legure (Wiron 99 i Willoroy), (103). Uzorci ispitivanih legura potopljeni su 2 meseca u Meyer-ov modifikovani Fusayama rastvor i zatim 7 dana u rastvor NaCl i mlečne kiseline. Merenje otpuštenih jona Ni, Cr i Mo vršeno je atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom. Pomoću SEM-a posmatrana je morfologija površine pre i posle testiranja korozije. Otpuštanje jona Ni i Cr iz legure Willoroy bilo je mnogo veće nego kod legure Wiron 99 u rastvoru NaCl i mlečne kiseline. Broj topljenja i livenja je značajno uticao na teksturu površine uzoraka, kao i na količinu otpuštenih korozivnih produkata.

Peraire M. et al. ispitivali su hemijski sastav, mikrostrukturu, mikrotvrdoću i otpuštanje jona kod visokoplemenite legure, plemenite legure, legure na bazi Ni i Ti legure (107). Testovi su rađeni pre i posle niza uzastopnih topljenja i livenja. Značajno povećanje tvrdoće po Vickersu usledilo je nakon petog topljenja i livenja kod obe plemenite legure i kod legure titana. Plemenite legure i legure na bazi Ni imale su veliku stabilnost posle sedmog topljenja i livenja, za razliku od Ti legure, gde se ne preporučuje ponavljanje topljenja i livenja.

U odnosu na plemenite legure, koje imaju veću otpornost na koroziju, bazne legure su neprestano tema za ispitivanje i sumnju. Ameer M. A. et al. (5) ispitivali su elektrohemijsko ponašanje Ni-Cr i Co-Cr legura u veštačkoj salivi, koristeći različite hemijske i elektrohemijske tehnike. Redosled stepena korozije gradiran je u veštačkoj salivi ovako: Wironit < Wirolloy < Wiron 99. Ovaj redosled se podudara sa rezultatima hemijskih istraživanja za određivanje kumulativne koncentracije jona. Autori zaključuju da veći stepen korozije koji ima Wiron 99 u odnosu na Wirolloy potiče od prisustva veće koncentracije Mo.

Savremena stomatologija, u cilju preventive, sve više koristi fluoride, aplikujući ih na različite načine. Amin, F. H. et al. (6) proučavali su efekat fluoridnih jona i pH na koroziona i citotoksična svojstva Ni-Cr legura. Koroziona svojstva Ni-Cr legura proučavana su, zavisno od načina aplikacije, u profilaktičkim rastvorima fluorida različite koncentracije. Takođe, praćen je i efekat različitih pH vrednosti u jednom od proučavanih rastvora, kao i biološka svojstva legura u korozionoj sredini, sa i bez nataloženih korozivnih produkata. Korozioni test je sproveden pomoću spektroskopske impedanse. Za test anodne polarizacije

korišćena je so NaF u koncentraciji 1000-20,000 ppm. Koncentracija F u rastvoru proračunata je hemijski i određena koristeći selektivnu elektrodu fluoridnog jona. pH jednog od rastvora varirao je od 3,5-9,0, a korozioni test je sproveden pre i posle polarizacije. Posle polarizacije sakupljen je elektrolit i analiziran je uz pomoć atomskog absorpcionog spektrometra, kako bi se utvrdile količine oslobođenih jona Ni i Cr. Pomoću senzitivnog testa na kulturi praćen je biološki efekat sa površine korodirane legure sa i bez akumuliranih produkata korozije. Rezultati su pokazali da upotrebom NaF rastvora u bilo kojoj koncentraciji i pri bilo kojoj pH, dolazi do povećanja polarizacione pasivnosti, dok prolongirana upotreba ovih rastvora smanjuje otpornost na koroziju. Kao rezultat korozije, otpušteni su joni Cr i Ni. Količina oslobođenih jona zavisila je od promene pH u medijumu. Kiseli medijum od pH 3,5, kao i bazni medijum od pH 9,0 imali su podjednako destruktivan efekat. Biološki test je pokazao da su akumulirani korozioni produkti glavni uzrok citotoksičnosti, dok je sama korodirana površina bez akumuliranih produkata imala smanjenu citotoksičnost.

Angelini, E. i Zucchi, F. (7) ispitivali su *in vitro* koroziju Co-Cr i Ni-Cr legura, kao i uticaj termičke obrade na rezistenciju na koroziju. Istraživanje je izvršeno na četiri Co-Cr legure i dve Ni-Cr legure. Uzorci su izlagani visokim temperaturama po 30 min. na 880°C, 980°C, 1080°C i polako hlađeni na vazduhu. Elektrohemijska karakterizacija izvršena je pomoću anodne krive u Ringerovom rastvoru i veštačkoj salivi na 37°C. U oba rastvora utvrđeno je da starenje na 880°C štetno utiče na otpornost na koroziju Co-Cr legura; pasivna zona je uska i pokazuje veliku gustinu. Nasuprot tome, uzorci tretirani na 1080°C pokazuju povećanu rezistenciju na koroziju. SEM je pokazala da su mikrostrukturne promene uzrokovale razliku u otpornosti na koroziju kod ispitivanih uzoraka dentalnih legura.

Bilhan, H. T. et al. proučavali su efekat mucina, IgA, uree i lizozima na koroziju različitih baznih dentalnih legura i Ti u veštačkoj salivi (18). Korozija dentalnih legura ima biološke, funkcionalne i estetske konsekvence. Mnoga istraživanja su dokazala da proteinski rastvori mogu da inhibiraju koroziju legura. Ovaj rad je ispitivao uticaj organskih konstituenata salive na koroziju dentalnih legura. Organski konstituenti salive su mucin, IgA, urea i lizozim koji se sreću u najvećim količinama u salivi, a najčešće korišćene legure u stomatologiji su Ti, Co-Cr-Mo, Ni-Cr-Mo i dentalni amalgami. U ovom radu proučavana je interakcija organskih konstituenata iz salive i dentalnih legura. Uzorci legura izloženi su cikličnoj polarizaciji u svakom od medijuma. Ni-Cr-Mo legure, kao i amalgami, pokazali su veliku osetljivost na koroziju u svim ispitivanim medijumima. Legura Co-Cr Mo je pokazala nešto veću otpornost na koroziju, dok je Ti pokazao veliku otpornost na koroziju u svim medijumima.

Braude, I. S. et al. (19) proučavali su fazni sastav Ni-Cr-Mo i Co-Cr-Mo dentalnih legura. Proučavana su fizičko-mehanička svojstva novih i pretopljenih legura, u uslovima zubotehničke laboratorije. Elektronskom mikroskopijom utvrđeno je da jednom topljena Co-Cr-Mo legura ne dovodi do gubitka komponenti, ali menja njihovu distribuciju unutar legure. Rendgen difrakcionom analizom novih i pretopljenih uzoraka legura, utvrđeno je da su obe ispitivane legure dvofazne, što je dokazano merenjem mikrotvrdoće i direktnom elektronskom mikroskopijom. Mikrotvrdoća druge faze premašuje matriks. U skladu sa faznim dijagramom ternarnog sistema Co-Cr-Mo i Ni-Cr-Mo legura, smatra se da druga faza predstavlja sigma fazu.

Chang, J. C. et al. su sprovedi studiju mikrobno zavisne korozije dentalnih legura (30). Mikrobno zavisna korozija je poznat problem u industriji dugi niz godina. Poznato je da mikroorganizmi utiču na koroziju metala i metalnih legura potopljenih u vlažnu sredinu. Pod sličnim uslovima, uticaj bakterija na koroziju metalnih materijala u usnoj duplji ostaje nepoznat. Cilj ovog rada bio je da se ispita koroziono ponašanje metalnih materijala u prisustva *Streptococcus mutans* i njegovih produkata rasta. Uzorci su napravljeni od: cpTi, Ti-6Al-4V, Ti-Ni, Co-Cr-Mo, 316L nerđajućeg čelika, 17Cr-4Ni nerđajućeg čelika i Ni-Cr legura. Korišćen je Gamry korozioni test i uzorci su izloženi: (1) Sterilnom Ringerovom rastvoru kao kontroli za (2), (2) *S. mutans* pomešan sa sterilnim Ringerovim rastvorom, (3) sterilan triptik soja-bujona kao kontrola za (4) i (4) sporedni produkti *S. mutans* pomešani sa sterilnim triptik soja-bujonom su korigovani za sve testirane uzorke. Korozioni parametri kao što su potencijal otvorenog kola ( $E_{OCP}$ ), korozioni potencijal ( $E_{CORR}$ ) i gustina struje ( $I_{CORR}$ ) su korigovani za sve testirane uzorke. Zaključeno je da: (1) *S. mutans* smanjuje  $E_{OCP}$  kod cpTi, Ti-6Al-4V, Ti-Ni i 316L nerđajućeg čelika i da sporedni produkti *S. mutans* smanjuju  $E_{OCP}$  kod Ti-6Al-4V, Ti-Ni, 316L nerđajućeg čelika i 17Cr-4Ni čistog nerđajućeg čelika. (2) *S. mutans* je povećao  $I_{CORR}$  kod 17Cr-4Ni nerđajućeg čelika i sporedni produkti *S. mutans* su smanjili  $I_{CORR}$  kod svih uzoraka. (3) *S. mutans* je smanjio  $E_{CORR}$  kod cpTi, Ti-6Al-4V i Ti-Ni i sporedni produkti *S. mutans* su redukovali  $E_{CORR}$  kod Ti-Ni, 316L nerđajućeg čelika, 17Cr-4Ni nerđajućeg čelika i Ni-Cr. (4) *S. mutans* je smanjio  $I_{PASS}$  kod cpTi i sporedni produkti *S. mutans* su smanjili  $I_{PASS}$  kod cpTi, 17Cr-4Ni nerđajućeg čelika i Ni-Cr legura.

Chen, C. C. et al. proučavali su zavisnost hemijskog sastava na koroziona svojstva Ni-Cr-Mo dentalnih legura u kiseloj veštačkoj salivi (31). Da bi se utvrdilo koroziono ponašanje ispitivanih uzoraka korišćeni su ciklični potenciodinamički i potenciostatski testovi, u deaerisanoj veštačkoj salivi sa pH 5 i na 37°C. Promene su praćene optičkim mikroskopom. Površinska hemijska karakterizacija rađena je rendgen fotoelektronskom

spektroskopijom i Auger-ovom elektronskom spektroskopijom, prateći potenciostatske testove. Rezultati su pokazali da je otpornost na koroziju ispitivanih uzoraka Ni-Cr-Mo legure u vezi sa formiranjem pasivnog filma na površini, koji sadrži  $\text{Ni(OH)}_2$ , NiO,  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  i  $\text{MoO}_3$ . Potencijal tačkaste korozije i zona pasivizacije bili su statistički različiti u okviru različitih Ni-Cr-Mo legura. Ni-Cr-Mo legure sa većim sadržajem Cr (21%) i Mo (8%) imale su znatno veću zonu pasivizacije na polarizacionoj krivoj i bile su imune na tačkastu koroziju zahvaljujući visokom sadržaju Cr (max. 31-35%) i Mo (max. 12%) u površinskom pasivizirajućem sloju. Prisustvo Ti u ovim legurama u malim količinama (4%) nije imalo efekta na otpornost na koroziju.

Huang, H. H. (65) proučavao je efekat hemijskog sastava na koroziono ponašanje Ni-Cr-Mo dentalnih legura u kiseloj veštačkoj salivi. Da bi se dokazalo koroziono ponašanje testirane legure, korišćeni su ciklični potenciodinamički i potenciostatski testovi, u deaerisanoj veštačkoj salivi sa pH 5,0 na 37°C. Promene su posmatrane optičkim mikroskopom. Hemijska karakterizacija površinske strukture izvršena je rendgen-fotoelektronskom spektroskopijom i Auger-ovom elektronskom spektroskopijom, prateći potenciostatske testove. Rezultati su pokazali da na rezistenciju na koroziju važan uticaj ima pasivizirajući sloj na površini, koji sadrži  $\text{Ni(OH)}_2$ , NiO,  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  i  $\text{MoO}_3$ . Potencijal tačkaste korozije i zona pasivizacije bili su statistički različiti kod različitih uzoraka Ni-Cr-Mo legura. Legure sa više Cr (više od 21,0%) i Mo (do 8,0%) imali su znatno veću zonu pasivizacije na polarizacionoj krivoj i bile su otporne na tačkastu koroziju zahvaljujući visokom sadržaju Cr (31,0-35,0%) i Mo (maksimalno do 12,0%) u površnom pasivizirajućem sloju. Prisustvo Ti u količini manjoj od 4,0% nije imalo efekta na rezistenciju na koroziju.

Cheng, T. P. et al. su proučavali uticaj Be na otpornost na koroziju Ni-Cr legura (33). Osnovna uloga Be u dentalnim legurama je da olakša livenost tokom procesa topljenja i livenja. U ovom radu proučavan je uticaj Be koji je dodavan u masenim procentima 0,5, 1,0 i 2,0, kao i njegov uticaj na mikrostrukturu sedam testiranih Ni-Cr i NP2 legura. Uzorci legura su postavljeni u Ringerov rastvor na 37°C. Rezultati eksperimenta pokazuju da dodavanje Be ima veoma značajan uticaj na smanjenje potencijala tačkaste korozije, potencijala otvorenog kola, otpornost pasivnog sloja i nasuprot tome povećanje kapacitivnosti pasivnog sloja. Prisustvo Be u velikoj meri smanjuje debljinu pasivnog sloja i smanjuje otpornost na koroziju.

Cheng, H. et al. ispitivali su uticaj pretapanja Ni-Cr legure na snagu veze sa keramikom (32). Koristili su uzorke Ni-Cr legure koja je pretapana od 1-5 puta koji su,

prema ISO 9693 standardu, liveni u vakuumu sa argonom. Na osnovu ove studije autori su zaključili da nije bilo nikakve razlike u kvalitetu veze između legure metala i keramike ni kod jednog uzorka, bez obzira na broj pretapanja.

Craig, R. G. i C. T. Hanks (35) ispitivali su citotoksičnost eksperimentalnih dentalnih legura u kulturi ćelija. Ispitivano je dvadeset i devet eksperimentalnih legura i šest čistih metala. Ovo istraživanje je pokazalo da su čisti metali, Au, Pd i Ti bili najmanje citotoksični, a zatim Ag, Ni i na kraju Cu. Jednofazne legure sa različitim sadržajem Cu i bez visokog sadržaja Pd i Au imale su visoku citotoksičnost, kao i višefazne legure koje su imale čak i visok sadržaj Au i Ag. Pd je pozitivnije nego Au uticao na bolju biokompatibilnost legura koje su sadržale Cu. Jednofazne legure sa sastavom tipičnim kao za metalokeramičke radove imale su dobru biokompatibilnost, kao i bazne legure na kojima se formirao adherentni oksidni sloj na površini.

Dentalne legure tokom korozionog procesa mogu da otpuste jone Ni i da u skladu sa njihovom interakcijom sa oralnim tkivima, dovedu do karakterističnih promena imunog sistema ćelija. D'Anto V. et al. (36), Mutlu-Sagesen L. (94), Nejatidanesh F. (98), Saji V. (114), Wataha J. C. (148), proučavali su uticaj Ni na ekspresiju funkcionalno različitih površinskih antigena kod makrofaga. Ekspresija površinskih antigena CD 14, CD 40, MHC klasa 1, MHC klasa 2, CD 80, CD 86, CD 54 analizirana je protočnom citometrijom. Bakterijski endotoksin lipopolisaharid (LPS) korišćen je kao pozitivna kontrola, da bi indukovao ekspresiju antigena. Ćelije su stimulisane pomoću  $\text{NiCl}_2$  i u prisustvu i odsustvu LPS. Nakon ekspozicije od 6, 24 i 48h, LPS je uzrokovao porast svih površinskih antigena. Rezultati su pokazali da  $\text{NiCl}_2$  može da indukuje povećanu regulaciju ekspresije površinskih antigena, ali da u visokim koncentracijama smanji esencijalne funkcije makrofaga stimulisanih sa LPS.

De March, P. et al. proučavali su koroziju dentalnih legura i njihovih odlivaka u veštačkoj salivi neutralne pH vrednosti (37). Mereni su potencijal otvorenog kola i otpornost na polarizaciju. Elektrohemijsko ponašanje između katodne oblasti i oksidacija rastvora, karakterizirani su pomoću ciklične polarizacije. Ispitivana je i moguća galvanska korozija legura i odlivaka. Polarizaciona otpornost bila je visoka ili veoma visoka. Tokom imerzije, najplemenitija legura bila je najotpornija, dok je Ni-Cr legura odmah pasivizirana. Do oksidacije plemenitih elemenata došlo je samo kada su uzorci bili eksponirani veoma visokim potencijalima koji su mogući samo u veštačkim uslovima. Do problema sa galvanskom korozijom može doći jedino ako su i legura i odlivak eksponirani u salivi. Takva korozija može dovesti do pucanja protetskih radova.

Denizoglu, S. et al. ispitivali su otpuštanje jona iz dve bazne legure pod različitim pH uslovima (39). Ispitivane su dve dentalne legure, Co-Cr i Ni-Cr. Izrađeni uzorci su potopljani u veštačku salivu na pH 4, pH 5 i pH 7. Količina prisutnih jona u rastvorima merena je nakon jednog meseca pomoću atomske apsorpcione spektrofotometrije. Statistička analiza je pokazala da pH vrednost značajno utiče na ukupno otpuštanje jona i otpuštanje jona Co, ali ne i Ni ili Cr. Tip legure nije uticao na ukupno otpuštanje jona, ali je značajno uticalo na otpuštanje jona Cr. Interakcija legure i pH značajno je uticala na ukupno otpuštanje i otpuštanje jona Cr. Da bi se sprečilo otpuštanje metalnih čestica, dentalne restauracije bi trebalo, kad god je to moguće, izrađivati od plemenitih legura i legura otpornih na koroziju.

Dong, H. et al. proučavali su koroziono ponašanje dentalnih legura u različitim tipovima elektrolizovane vode (43). Koristeći sedmodnevni imerzioni test, praćeno je koroziono ponašanje ispitivanih dentalnih legura (plemenitih legura, legura zlata, Au-Ag-Pd, Ag legura, Co-Cr i Ti legura), u različitim tipovima elektrolizovane vode: jako kiseloj, slabo kiseloj i neutralnoj. Najupadljivija promena boje na površini i rastvorljivost konstituenta zapažena je kod visoko kisele, a najmanja kod neutralne elektrolizovane vode, kod plemenitih, zlatnih, Au-Ag-Pd i Ag legura. Naročito je bilo izraženo otpuštanje Au iz legura zlata u visoko kiseloj sredini. Co-Cr legura je imala veću korozijon otpornost i otpornost na promenu boje u visoko kiseloj sredini nego u slabo kiseloj i neutralnoj. Rendgenskom mikroanalizom otkriveno je da su korozioni produkti kod plemenitih legura bili srebrohloridni kristali, a kod Co-Cr oksidi kobalta i hroma. Ti je bio otporan u sva tri rastvora. Neutralan rastvor imao je najslabiju korozionu aktivnost, a ekvivalentno tome i najslabiju baktericidnu aktivnost.

Eftekhari, A. (46) proučavao je uticaj Be u legurama Ni-Cr-Mo. Ispitivan je efekat Be, dodatog leguri u različitim količinama, na koroziju u elektrolitnom rastvoru veštačke salive. Kao kvantitativni faktor za površinsku analizu legura pre i posle potapanja u veštačku salivu korišćena je fraktalna dimenzija. Fraktalna dimenzija površine elektrode određena je najpouzdanijim metodom u ovom kontekstu, vremenski zavisnom graničnom difuzijom za sistem koji podrazumeva difuziju prema površini elektrode. Rezultati su pokazali da povećanje količine Be u leguri značajno povećava koroziju. To je povezano sa porastom fraktalne dimenzije i hrapavošću površine elektrode, a u izradi stomatoloških radova neophodno je postići glatku i sjajnu površinu. Sa metodološke tačke gledano, korišćenje fraktalne analize površine legure (maskiranje površine metala slojem Au) je efikasan metod za ispitivanje površine stomatoloških radova. Ovaj pristup je naročito pogodan kod ispitivanja korozije različitih legura i metala, gde promena površinske strukture ima značajnu ulogu.

Khamis, E. i M. Seddik (72) su proučavali koroziju kod ponavljanih topljenja i livenja baznih dentalnih legura. Pri tom su uzorci Ni-Cr i Co-Cr komercijalnih legura topljeni i liveni 4 puta i izliveni i testirana su njihova koroziona svojstva u salivi i slanom rastvoru. Za eksperiment su koristili potenciokinetičku tehniku za analizu elektrohemijskih karakteristika anodne polarizacione krive. Najbitnija promena koju su otkrili bila je rapidno povećanje postojeće gustine iznad kritičnog potencijala koji predstavlja potencijal tačkaste korozije. Eksperimentalni podaci su pokazali da potencijal otvorenog kola ne onemogućava razliku između 4 ispitivane dentalne legure u ovom istraživanju. Kod legure Willoroy, povećanje broja topljenja i livenja, dovodi do povećanja potencijala tačkaste korozije i na taj način se otpornost na koroziju povećava nakon topljenja i livenja. Takođe, utvrđeno je da Willoroy korodira 26 puta brže nego Wironit, u istim rastvorima. Legure koje su sadržale Co i Mo imale su veću otpornost na koroziju nego legure na bazi Ni i na to nije uticalo ponavljano topljenje i livenje. U hloridnom rastvoru legura Ni-Cr bila je veoma podložna tačkastoj koroziji, dok se Co-Cr legura ponašala kao plemenite legure. Otpornost na koroziju ispitivane 4 neplemenite legure bila je prema sledećem redosledu: Biocast > Wironit > Cobond > Wirroloy. Za razliku od rezultata ovog istraživanja, postoje i suprotna mišljenja, gde autori tvrde da veći stepen korozije potiče od prisustva veće koncentracije Mo (5).

Mareci, D. et al. proučavali su elektrohemijska svojstva pet baznih dentalnih legura na bazi Ni i Co u veštačkoj salivi (87). Korelacija između sadržaja Cr, Mo i V i korozionog ponašanja izražena je PREN indeksom (**P**itting **R**esistance **E**quivalent **N**umber). Vreme držanja uzoraka u medijumu utiče na stepen korozije, tj., vrednosti korozije opadaju u zavisnosti od vremena držanja uzoraka u medijumu i u zavisnosti od pasivizacije. Mikroskopska analiza površine legura pokazala je da pasivizacija ne utiče na tip korozije koji se javlja.

### **2.3. Biokompatibilnost dentalnih legura**

Da bi se neka zubna nadoknada izradila od dentalnih legura ona mora proći fazu livenja. Tom prilikom se ingot (dentalna legura u izvornom obliku), topi pod različitim uslovima i iz čvrstog prevodi u tečno stanje i lije. Nakon livenja i hlađenja odseca se odlivak od ostatka legure i dalje se standardnim putem obrađuje. Međutim, taj ostatak legure često se ne baca, već se ponovo koristi za izradu zubnih nadoknada, uz dodatak nove količine legure, najčešće do 50%. Ako dobijeni odlivci imaju nepoznat hemijski sastav, jasno je da je potpuno nepoznat biološki kvalitet takve legure, Hornez J. C. (64), Tripuraneni S., C. (133). Biokompatibilnost kao primarni uslov koji svi biomaterijali moraju da ispune, osnovni je



parametar kojim bi stomatolog trebalo da se rukovodi pri izboru dentalne legure, Messer R. L. W. (91), Stamenković D. (123), Tripuraneni S. C. (133), Wataha J. C. (149), Yang H. C. (154), Özen J. (158).

Za ispitivanje biokompatibilnosti koristi se veliki broj standardizovanih testova *in vivo* i *in vitro*. Naučnici su podeljenih mišljenja u pogledu davanja prednosti testovima koji za kratko vreme daju rezultate (*short therm* testovi), Nelson S. K. et al. (96) ili testovima koji omogućavaju duži kontakt ispitivanih materijala sa medijumom (*long therm* testovi). Wataha J.C. i Lockwood P.E. (144) proučavali su otpuštanje elemenata iz dentalne legure u medijum kulture ćelija u periodu od 10 meseci. Ovim istraživanjem došli su do zaključka da treba dati prednost *long therm* testovima, jer daju bolje i sigurnije rezultate vezane za biološki rizik od otpuštanja elemenata iz legure.

Koren V. T. et al. (177) testirali su toksičnost legura koje sadrže 5,0-70,0% Ni. Uzorci ispitivanih legura su implantirani u femoralni mišić 360 belih pacova. Zatim su posmatrana tkiva koja su bila u direktnom kontaktu sa legurama, kao i regionalni limfni čvorovi. Dobijene rezultate autori su protumačili kao biološki indiferentne. Proučavanjem toksičnosti nikla bavili su se mnogi istraživači. Nikl je poznat po svom alergogenom i citotoksičnom dejstvu na ćelije i tkiva sa kojima dolazi u neposredni kontakt, Wataha J. C. (145), Wataha J. C. (147).

Ristić LJ. et al. (111) posmatrali su pojavu diskoloracije gingive kod prisustva fiksnih radova u ustima pacijenata. Praćene su 184 promene kod pacijenata oba pola, a prosek starosti pacijenata bio je 52 godine. Pacijenti su podeljeni u četiri grupe prema vrstama legura od kojih su bili izrađeni protetski radovi. Kod 10 pacijenata postojala je indikacija za ekstrakciju zuba i sa tih zuba su uzeti uzorci tkiva za histopatološku analizu. Rezultati su pokazali diskoloraciju gingive kod sve četiri ispitivane grupe, a ova pojava je bila najčešća kod radova izrađenih od Ni-Cr legura (43,5%), a najređa kod legura zlata (26,5%). Histopatološkom analizom nađene su čestice metala u ćelijama tkiva. Siva prebojenost gingive bila je posledica prisustva metalnih čestica u tkivu.

Al-Hiyasat, A. S. (1) opisao je u *in vitro* studiji otpuštanje jona iz sedam komercijalnih dentalnih legura i testirao je njihov toksični efekat. Testirane legure bile su: jedna visoko plemenita (Bioherador N), a ostalih šest bile su bazne legure i to četiri Ni-Cr (Remanium CS, Heranium NA, Wiron 99, CB Soft), jedna Co-Cr (Wirobond C) i jedna na bazi Cu (Thermobond). Napravljeno je po deset uzoraka oblika diska od svake testirane legure i svi uzorci svih sedam legura kondicionirani su u destilovanoj vodi na 37°C, 72h ili 168h.

U rastvoru za kondicioniranje praćeno je otpuštanje jona, a njihov toksični efekat testiran je MTT testom, uz pomoć Balb C fibroblasta. Rezultati su pokazali da je otpuštanje jona bilo veće nakon 168h, nego nakon 72h. Uzorak visoko plemenite legure pokazao je najmanje otpuštanje elemenata (samo Zn), bez citotoksičnog efekta. Najveće otpuštanje elemenata pokazali su uzorci legura Cu i Ni-Cr (CB Soft), a njihovi uzorci su pokazali značajno veće otpuštanje elemenata od ostalih uzoraka. Uzorci legure Co-Cr pokazali su značajno veću citotoksičnost od uzoraka visoko plemenite legure. Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da je otpuštanje elemenata u proporciji sa vremenom kondicioniranja. Prisustvo Cr i Mo u legurama štiti ih od rastvaranja, dok Cu utiče na povećanu koroziju, rastvorljivost i povećanu citotoksičnost. Isti autor je godinu dana kasnije, Al-Hiyasat, A. S. (2) proučavao citotoksični efekat uzoraka ovih istih sedam dentalnih legura. Po deset uzoraka od svake legure pripremljenih kao u prethodnom radu postavljeno je u kulturu tkiva sa suspenzijom koja sadrži Balb / C 3T3 fibroblaste i inkubirano 3 dana na 37° C. Nakon 3 dana ispitana je vijabilnost ćelija pomoću MTT testa. U rezultatima ovog rada tumačena je korelacija citotoksičnosti legura u odnosu na njihov sastav. Visoko plemenita legura je pokazivala značajno manju citotoksičnost od uzoraka ostalih ispitivanih legura. Najveću citotoksičnost su pokazali uzorci legure koja sadrži Cu, zatim CB Soft, a obe ove legure su bile značajno više citotoksične od ostalih. U zaljučku se navodi da je citotoksičnost svake od testiranih legura bila zavisna od njihovog sastava. Razlika je postojala u citotoksičnosti između različitih uzoraka legura iz iste grupe. Na vijabilnost ćelija veoma je uticalo prisustvo Cu. Otpuštanje elemenata je fenomen koji je predmet proučavanja velikog broja publikacija, ne samo zbog promena u samoj strukturi metala, već, pre svega, zbog posledica koje otpušteni joni izazivaju u kontaktu sa živim ćelijama, Wataha J. C. (138), Wataha J. C. (139), Wataha J. C. (142).

Al-Hiyasat, A. S. (4) je ova ispitivanja dalje proširio i u ovom radu ispitivao citotoksičnost uzoraka dentalnih legura različitog sastava, nakon njihovog kondicioniranja u destilovanoj vodi. Ispitivana je citotoksičnosti sedam dentalnih legura nakon što su bile tretirane u destilovanoj vodi. Testirane su: jedna visoko-plemenita legura (Bioherador N) i šest baznih legura, od kojih četiri Ni-Cr legure (Remanium CS, Heranium NA, Wiron 99, CB Soft), jedna Co-Cr legura (Wirobond C) i jedna Cu bazna legura (Thermobond). Po deset uzoraka u obliku diska od svake legure su kondicionirane u destilovanoj vodi, na 37° C, 72 ili 168h. Uzorci su postavljeni u kulturu tkiva sa suspenzijom Balb / C 3T3 fibroblasta. Nakon trodnevne inkubacije vijabilnost ćelija je ispitivana MTT testom. Rezultati pokazuju da je razlika u citotoksičnosti u vezi sa različitim sastavom legura i vremenom kondicioniranja. Statističkim metodom ANOVA dokazano je da postoji statistički značajna razlika u citotoksičnosti različitih legura. Bioherador N je bio znatno manje toksičan od

svih ostalih legura posle 72h. Nakon 168h, njegova citotoksičnost se nije razlikovala od citotoksičnosti Remanium CS, Wiron 99, i Wirobond C. Thermobond i CB Soft bili su znatno više toksični od ostalih legura. Autori zaključuju da citotoksičnost baznih legura koje ne sadrže Cu, nakon kondicioniranja od 168h u destilovanoj vodi, čini te legure po nivou citotoksičnosti komparabilnim sa visokoplemenitim legurama.

Isti autor u nastavku svog istraživanja (3) ispituje zavisnost citotoksičnosti od sastava dentalnih legura i otpuštanja elemenata, a na to presudan uticaj može da ima ponavljano topljenje i livenje. U ovoj studiji testirano je pet dentalnih legura, i to: dve Ni-Cr (Remanium CS i Wiron 99), jedna Ni-Cr sa Cu (CB Soft), jedna Co-Cr (Wirobond C) i jedna Cu (Thermobond). Izliveni su uzorci u obliku diska i to tako što su prvu grupu činili uzorci sa 100% novom legurom, drugu grupu su činili uzorci sa dodatkom 50% nove legure i 50% ponovo topljene i livene legure i treću grupu su činili uzorci sa 100% prethodno topljenim i livenom legurom. Citotoksičnost je ispitivana pomoću MTT testa na Balb/C 3T3 fibroblastima. Testirano je po šest uzoraka od svake legure. Takođe, praćeno je i otpuštanje elemenata. U dobijenim rezultatima prikazano je da su od sve tri grupe ispitivanih uzoraka najmanju citotoksičnost imali uzorci legura Remanium CS i Wiron 99, zatim slede Wirobond C, CB Soft i Thermobond. Statistički metod ANOVA dokazao je značajnu razliku između ispitivanih grupa. Takođe, ponovljeno topljenje i livenje je dovelo do povećanja citotoksičnosti svih ispitivanih uzoraka, kao i do povećanja otpuštanja elemenata. Prisustvo Cu u uzorcima značajno je uticalo na njihovu citotoksičnost. Ponavljano topljenje i livenje je više uticalo na povećanje citotoksičnosti Co-Cr nego Ni-Cr legure.

Bagchi, D. et al. (13) proučavali su citotoksičnost i oksidativne mehanizme različitih formi hroma. Hrom postoji najčešće u dva stanja: kao trovalentan i kao šestovalentan. Šestovalentni Cr se koristi u industriji i dokazano je toksičan, mutagen i karcinogen. Mehanizmi ispoljavanja ovih štetnih dejstava nisu do kraja objašnjeni, ali veliki broj naučnih radova dokazuje da šestovalentni Cr indukuje oksidativni stres, oštećenja DNK, apoptotičnu smrt ćelija i dovodi do alteracije gena. Trovalentni Cr je, sa druge strane, esencijalan za pravilnu funkciju insulina i neophodan je za pravilan metabolizam proteina, masti i ugljenih hidrata i priznat je kao dijetetski suplement. U ovom radu vršena je komparativna analiza efekata trovalentnog i šestovalentnog Cr u zavisnosti od koncentracije i vremena, na porast produkcije reaktivnih kiseoničnih grupa (ROS) i peroksidaciju lipida, povećanje ekskrecije urinarnih lipidnih metabolita, DNK fragmentaciju i apoptotičku smrt ćelija u oba, *in vitro* i *in vivo*, modela. Šestovalentni Cr je pokazao znatno veću citotoksičnost od trovalentnog Cr.

Bumgardner, J. D. et al. (20) istraživali su ćelijski odgovor na metalne jone otpuštene iz Ni-Cr dentalne legure. Postoji sumnja da zbog osetljivosti na koroziju, legure Ni-Cr imaju povišen potencijal otpuštanja elemenata kao što su Ni i Be. U ovom radu praćeno je otpuštanje metalnih jona iz četiri komercijalne Ni-Cr legure u trodnevnom testu na ćelijama u kulturi. Praćena je korelacija otpuštanja elemenata, merena atomskom absorpcionom spektroskopijom, u odnosu na promenu morfologije ćelija, vijabilnost i proliferaciju. Rezultati su pokazali da testirane legure i njihovi korozioni produkti nisu uticali na ćelijsku morfologiju i vijabilnost, ali su uticali na smanjenje proliferacije. Vrsta i kolićina oslobođenih metalnih jona, koja se slagala sa korozionim svojstvima, takođe je bila u korelaciji sa smanjenjem ćelijske proliferacije nakon 72 sata. Jedna od testiranih legura koja je imala najmanje izraženo smanjenje proliferacije ćelija, otpustila je najmanju kolićinu korozionih produkata, zahvaljujući svojoj otpornosti na koroziju, visokom sadržaju Cr i Mo i homogenom sloju oksida na površini. Ostale testirane legure koje su bile osetljive na ubranu koroziju otpuštale su više metalnih jona, što je bilo u korelaciji sa smanjenjem inkorporiranja timidina. Kolićina metalnih jona rasla je proporcionalno dućini trajanja testa kod svih testiranih legura, ali nije bila u proporciji sa ukupnom kolićinom legure. Joni Ni su oslobođeni u nešto većoj kolićini nego kod ukupne kolićine legure, dok su joni Be otpušteni 4-6 puta više nego kod ukupne kolićine. Povećano otpuštanje jona Be bilo je povezano sa smanjenom proliferacijom ćelija.

Ista grupa autora proućavala je dve Ni-Cr legure, sa manje i više Cr i Mo, sa i bez Be (21). Prisustvo oksida Be na površini legure sa malo Cr i Mo bilo je povezano sa povećanom korozijom i povećanom osetljivošću na ubranu koroziju. Sloj oksida kod druge legure sa više Cr i Mo, bio je u vezi sa smanjenom korozijom i otpornosti na pucanje usled korozije. Rezultati ovog rada potvrdili su zaključke prethodnih radova ove grupe autora da prisustvo Be u legurama smanjuje otpornost na koroziju i ostavlja osnovanu sumnju o mogućem otpuštanju toksićnih metalnih jona.

U svom radu vezanom za efekte baznih dentalnih legura na citoskeletne filamente humanih fibroblasta u kulturi, Can, G. et al. (23) proućavali su bazne legure koje se često koriste u praksi, kako bi otkrili da li su strukturne alteracije ćelija povezane sa upotrebom ovih legura. Napravljeno je po deset uzoraka oblika diska od šest razlićitih baznih dentalnih legura. Po pet uzoraka je ispolirano, a ostalih pet je peskirano. Svi uzorci su direktno uronjeni u humane fibroblaste, 120h. Nakon toga, ćelije su fiksirane i obojene antitelima protiv glavnih citoskeletnih elemenata, aktina, vimentina i mikrotubula, imunofluorescentnom metodom bojenja. Vršena je 3D analiza pomoću konfokalnog laserskog mikroskopa, kako bi se utvrdila citoskeletna alteracija. Autori zaključuju da se na osnovu rezultata ovog *in*

*in vitro* eksperimenta može potvrditi da obe grupe legura, Ni-Cr i Co-Cr, posebno njihovi peskirani uzorci mogu imati štetan uticaj na aktin i citoskelet.

Grill, V. et al. proučavali su uticaj dentalnih legura na proliferaciju ćelija i uređenje fibronektina na humanim fibroblastima u kulturi (58). Testirano je šest jednofaznih dentalnih legura i određivana je korelacija između stepena proliferacije ćelija i uređenja fibronektina (FN) u kulturi humanih fibroblasta. Za detekciju proliferacije ćelija korišćeni su imunocitohemijske metode pomoću inkorporacije 5-bromodeoksiuridina (BrdU) i organizacije fibronektina u humanim fibroblastima. Najupadljivija razlika u rezultatima u odnosu na kontrolne uzorke detektovana je nakon 120 i 168h, a legura sa najvećim sadržajem Au imala je najveću biokompatibilnost u odnosu na sve ostale testirane uzorke i ponašala se najbližije kontrolnim uzorcima. Nasuprot tome, fibroblasti eksponirani ostalim uzorcima imali su znatno drugačije ponašanje od kontrolne grupe. Može se zaključiti da postoji korelacija između organizacije FN i procenta BrdU pozitivnih ćelija i da ovi parametri zavise od prisustva različitih legura. Autori u zaključku naglašavaju da opservacija uređenja FN i stepen proliferacije ćelija mogu biti moćno sredstvo za određivanje biokompatibilnosti dentalnih legura. U prilog tome, isti autori nastavljaju istraživanja i u svom daljem radu prate *in vitro* stepen proliferacije ćelija i uređenje fibronektina kao parametara biokompatibilnosti dentalnih legura (59). Sproveli su kratkotrajni test (72-96h) *in vitro*, pri čemu su ispitivali biokompatibilnost četiri jednofazne dentalne legure. Praćena je korelacija stepena proliferacije i organizacija proteina ekstracelularnog matriksa, fibronektina, u kulturi humanih fibroblasta. Dokazali su da je stepen proliferacije u zavisnosti od ekspresije fibronektina. Legura sa najviše Au bila je najviše biokompatibilna od svih, jer se slično ponašala kao kontrolni uzorci. Nasuprot tome, fibroblast koji su bili u dodiru sa legurom sa najvećim procentom Ag imala je najveće odstupanje u ponašanju u odnosu na kontrole. Autori u zaključku navode da postoji korelacija između organizacije fibronektina i procenta BrdU pozitivnih ćelija i da ti parametri variraju u zavisnosti od sadržaja legure.

Hanawa, T. et al. ispitivali su citotoksičnost oksida, fosfata i sulfida koji se mogu formirati na dentalnim legurama, pomoću agar metode (62). Kod Ni-Cr, Co-Cr legura i nerđajućeg čelika, kobalt oksid i hrom oksid imali su visoku citotoksičnost, dok oksid gvožđa nije bio toksičan. Sulfidi koji se mogu formirati na površini legura srebra, bili su citotoksični. Oksidi i fosfati TiAl i hidroksiapatit nisu bili citotoksični, što ih čini pogodnim za upotrebu u implantologiji. Ne samo valenca elementa nego i hemijska grupa vezana za element može da utiče na citotoksičnost metala, tj., dentalnih legura.

Jiao, S. et al. ispitivali su citotoksičnost devet komercijalnih dentalnih legura pri čemu su uzorke testiranih legura prvo postavljali direktno na L929 ćelije (prvi medijum) i nakon 48h ćelije su prikupljene i zatim prenešene u novi medijum (70). Nakon 0 i 4 dana ćelije su posmatrane spektrometrom i SEM-om. Metalni joni rastvoreni u prvom medijumu analizirani su atomskom apsorpcionom spektroskopijom. Rezultati su pokazali da se citotoksični efekat legure na bazi Cu pripisuje sposobnosti Cu da utiče na citoinhibiciju, da se visoka biokompatibilnost Ni-Cr legure i nerđajućeg čelika 8-18 tumači formiranjem zaštitnog oksidnog sloja sa Cr, a kod Ni-Ti legure taj sloj je bio TiO. Legure Ag- Pd-Au-Cu i Ag-Zn nisu imale značajnu citotoksičnost zahvaljujući hemijskoj stabilnosti sastavnih elemenata. Autori smatraju da citotoksičnost ispitivanih dentalnih legura zavisi od prisustva nekih metalnih elemenata.

Cortizo, M. C. et al. sproveli su *in vitro* studiju da bi ispitali biokompatibilnost metala i metalnih komponenti u dentalnim materijalima (34). Test je izveden na osteoblastima UMR106 u kulturi. Ćelije su eksponirane uzorcima Ag, Cu, Au, Pt, Pd i Ni/Ti na različit inkubacioni period. Kao parametri biokompatibilnosti praćeni su broj preživelih ćelija, mitotički indeks, morfologija ćelija i aktivnost alkalne fosfataze kao pokazatelja i markera osteoblastnog fenotipa. Sadržaj metalnih jona praćen je u medijumu pomoću atomske absorpcione spektrofotometrije. Rezultati su pokazali da su najtoksičniji Cu i Ag, dok su Au, Pd, Pt i Ni/Ti bili biokompatibilni u kulturi osteoblasta. Ag i Cu su indukovali velike morfološke promene na UMR106 i nakon 48h samo manji broj ćelija je opstao (<5,0%). Rezultati su bili u korelaciji sa količinom oslobođenih jona metala u medijumu. U zaključku autori navode da su UMR106 ćelije u kulturi odgovarajuće za ispitivanje biokompatibilnosti metala.

Elshahawy, W. et al. proučavali su otpuštanje elemenata iz četiri različita dentalna materijala i to: Au, Ni-Cr, keramika za CAD-CAM i nerđajući čelik (48). Svi uzorci su ispolirani i očišćeni ultrazvukom i etanolom. Nakon što su potopljeni u 0,9% NaCl i 1% mlečnu kiselinu, 7 dana na 37°C, otpuštanje elemenata mereno je masenom spektroskopijom sa induktivno spregnutom plazmom. Dva čista imerziona rastvora korišćena su kao negativna kontrolna grupa. Veće otpuštanje elemenata bilo je evidentno kod svih metala u rastvoru mlečne kiseline, osim kod Ag. Kod legure Au postojala je značajna razlika između Zn i drugih oslobođenih elemenata u rastvoru NaCl, a to je otkrilo značajnu razliku između Pd i Ag ili Cu, čije je otkrivanje bilo važnije nego Zn, mada bez statističke značajnosti, u rastvoru mlečne kiseline. U oba rastvora, NaCl i mlečnoj kiselini, iz Ni-Cr legure otpušteno je značajno više Ni nego drugih elemenata. Isto je primećeno i za Fe kod nerđajućeg čelika. Bilo je značajno većeg otpuštanja K nego Al kod CAD-CAM keramike u rastvoru Na-Cl.

Isti autori (49) ispitivali su na iste četiri grupe materijala, kao u prethodnom radu, citotoksičnost otpuštenih elemenata. Slične količine elemenata Pd, Ag, Zn, Cu, Cu, Ni, Cr, Mo, Be, Fe, Al i K pripremljene su kao rastvori soli. Kao pozitivna kontrola korišćeni su rastvori deset puta veće koncentracije, a kao negativna kontrola rastvori bez elemenata. Citotoksičnost je ispitivana na L-929 fibroblastima miša u rastvoru soli, nakon inkubacionog perioda od 7 dana. Tripan plavim testom isključivanja određen je procenat vijabilnih ćelija. Rezultati su pokazali značajnu razliku u citotoksičnosti različitih elemenata u rastvoru soli. Najmanji procenat vijabilnih ćelija u odnosu na koncentraciju otpuštenih elemenata evidentiran je kod Zn, Cu i Ni, što znači da su to najtoksičniji elementi. Za Be i Ag može se reći da su srednje toksični. Najmanje toksični su Fe, Cr, Mo, Al, Pd i K. Zaključak ovog istraživanja pokazuje da su Zn i Cu oslobođeni iz legura zlata i Ni oslobođen iz legura Ni-Cr imali najveći toksični efekat.

Fu, J. et al. proučavali su oksidativni stres kao komponente Cr indukovane citotoksičnosti kod osteoblasta miša (53). Poznato je da dentalne legure otpuštaju jone u okolna tkiva i izazivaju citotoksične efekte, ali mehanizmi tih štetnih dejstava još uvek su nepoznati. U tom smislu ćelijski oksidativni stres može biti pravac ćelijskog odgovora na metalne jone. Osnovna ideja ovog istraživanja bila je da se dokaže hipoteza da oksidativni stres posreduje u hromom indukovanoj citotoksičnosti. Sa tim ciljem osteoblasti miša su eksponirani različitim koncentracijama  $\text{Cr}^{6+}$  ili  $\text{Cr}^{3+}$ , u ili bez prisustva antioksidansa N-acetilcisteina (NAC). Ćelijska vijabilnost, diferencijacija i intracelularne ultrastrukturne alteracije proučavane su MTT testom, testom aktivnosti alkalne fosfataze i transmissionom elektronskom mikroskopijom. Rezultati su pokazali da je oksidativni stres umešan u  $\text{Cr}^{6+}$  indukovanu citotoksičnost na osteoblastima, a NAC može da pruži zaštitu osteoblastima protiv oksidativnog stresa koji indukuje  $\text{Cr}^{6+}$ . Prema ovim rezultatima,  $\text{Cr}^{3+}$  nema značajnu citotoksičnost na osteoblaste.

Lu, Y. et al. u svom eksperimentu pošli su od pretpostavke da legure na bazi Ni mogu biti potencijalni izazivači imunološki uzrokovane hipersenzitivnosti (84). Samo nekolicina literarnih podataka postoji na temu *in vivo* proučavanja suprotnih efekata imunoloških alteracija kao što su urtikarija, respiratorne bolesti, kontaktni dermatitis uzrokovan Ni, mikroskopska hematurija i proteinurija, oštećenja hepatocita i renalno oštećenje. Dentalne legure na bazi Ni koje se koriste u stomatologiji mogu biti uzročnici nastanka imunološki izazvane hipersenzitivnosti. Površina metala koja se nalazi na rubu metalokeramičkih radova nije uvek prekrivena keramikom, te dolazi u dodir sa elektrolitima u usnoj duplji i joni metala bivaju otpušteni u okolnu sredinu, čime dolaze u kontakt sa tkivima i ćelijama u neposrednoj blizini ili bivaju digestivnim putem rasejani kroz organizam.

Ukoliko ovi joni nisu biokompatibilni, može doći do oštećenja i rizika od senzitivizacije i toksičnosti, ukoliko su apsorbirani u određenoj količini. Iz ovog razloga je važno odrediti biokompatibilnost na dugi vremenski period za legure na bazi Ni.

## 2.4. Alergije izazvane dentalnim legurama

Hamano, H. et al. proučavali su alergijske reakcije na konstituente dentalnih legura (61). Učestalost pojave alergija je u porastu, a time i broj alergija na gradivne stomatološke materijale. Od 263 pacijenta koji su prijavili da sumnjaju na postojanje alergije, kod 184 je postojala sumnja na alergiju na metale u stomatološkim radovima i urađen im je pač test. Od 168 pozitivnih pacijenata u pač testu, 128 su imali alergiju na metale iz dentalnih legura. Rezultati su pokazali da: (1) pet elemenata koji su najčešće bili izazivači ovih promena su Hg, Co, Ni, Cr i Pd; (2). Najzastupljeniji metali u dentalnim legurama su: Zn, Ag, Cu, Au i Pd, a najčešće korišćena legura je Au-Ag-Pd; (3) najveća tendencija za koincidenciju između alergena i metala pronađena je kod Co-Cr-Ni legura i Pd, Ni i Cr; (4) u slučaju palmoplantarne pustuloze alergogeni metal je bio upravo onaj koji se nalazio u leguri u ustima pacijenta.

Klötzer, W. T. (73) pratio je kod metala i dentalnih legura koroziju, toksikološka svojstva i senzibilizaciju. Autor potencira pravilan izbor dentalne legure kako bi se pre svega čuvalo zdravlje pacijenta. Na izbor dentalne legure ne treba da utiče njena cena, već kvalitet. Autor posebno skreće pažnju da legure sa Be ne treba koristiti u praksi. Zdravlje zubnih tehničara je čak i više ugroženo pri obradi legura sa Be nego zdravlje pacijenata. Takođe, ovaj autor je došao do zaključka da su legure sa Ni znatno manje alergogene nego što se smatra.

Kulak, Y. i A. Aarikan (78) pratili su uticaj baznih dentalnih legura na nivo IgE i neke krvne parametre. Iako se legure na bazi nikla veoma često koriste u stomatologiji, osnovana je sumnja u njihovu toksičnost. Alergogeni potencijal nikla i toksični efekat Ni i Be mogu ugroziti ne samo pacijente, već i zubne tehničare. U ovom istraživanju praćene su dve grupe: 19 studenata koji su protekle 2 godine radili u zubotehničkoj laboratoriji na obradi baznih legura i 21 student koji nikada pre nije bio u kontaktu sa baznim legurama. Ova druga grupa je predstavljala i kontrolu. Uzeti su uzorci krvi studentima iz obe grupe i praćeni su: eritrociti, trombociti, leukociti, limfociti, granulociti i monociti i meren je nivo IgA. Svi uzorci krvi su ponovo uzeti nakon 8 meseci. Postojao je statistički značajan pad broja eritrocita i trombocita u testiranoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu. Inicijalne



vrednosti broja limfocita i monocita nisu pokazale statistički značajnu razliku pri ponovljenom merenju između obe grupe. Takođe, ni vrednosti IgE nisu se statistički značajno razlikovale. Zaključak autora ovog rada bio je da bazne legure, koje sadrže Ni, Cr, Be i Co nisu uticale na povećanje senzitivnosti tokom perioda trajanja ovog testa.

Merk, H. F. et al. pratili su pojavu alergijskih reakcija kod pacijenata sa različitim vrstama zubnih nadoknada izrađenih od različitih dentalnih legura (90). Sproveden je epikutani pač test, a uzorci legura napravljeni su za potrebe ovog testa u obliku pločica. Najveći broj alergijskih reakcija bio je kod legura na bazi Ni, kao i kod legura sa Co. Primećena je pojava alergijskih reakcija i kod legure zlata koja je sadržala Co (Verinor). Prema učestalosti pojave alergijskih reakcija iza pomenutih legura sledile su Pd-Ag legure, kao i Au legure, a najniži alergijski potencijal evidentiran je kod Pd legura. Za dve bazne legure, izrazito jake alergijske reakcije bile su uočljive kod pasiviziranih uzoraka. Alergijske reakcije su bile intenzivnije nego kod uzoraka koji nisu bili pasivizirani.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

U nauci o materijalima je odavno postignut konsenzus da mikrostruktura bitno utiče na svojstva materijala. Polazeći od ove činjenice i od iskustva Klinike za stomatološku protetiku Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, postavljena je radna hipoteza:

*više puta topljena dentalna legura ima izmenjenu mikrostrukturu, koja uzrokuje promenu njenih fizičko – mehaničkih svojstava i smanjenje biološkog kvaliteta (biokompatibilnosti).*

Osnovna ideja ovog rada je bila da se dokaže promena dentalnih legura na nivou mikrostrukture, nastala višestrukim topljenjem i livenjem, koja je odgovorna za promenu bioloških svojstava ispitivanih dentalnih legura. U cilju dokazivanja radne hipoteze postavljeni su bliži ciljevi istraživanja:

1. ispitati mikrostrukturu i citotoksičnost jednom topljenih i livenih uzoraka dve dentalne legure u cilju utvrđivanja njihovih svojstava. Rezultati ovih ispitivanja poslužiće kao referentne vrednosti;
2. ispitati i utvrditi mikrostrukturne promene koje se javljaju kod testiranih dentalnih legura, kao posledicu više ponavljanih topljenja i livenja;
3. ispitati hemijski sastav odabranih i više puta topljenih i livenih dentalnih legura;
4. izmeriti i pratiti promene tvrdoće testiranih više puta livenih dentalnih legura;
5. ispitati citotoksičnost dentalnih legura posle više puta ponovljenih termičkih obrada i korelirati broj livenja i citotoksičnost;
6. utvrditi korelaciju između nastalih mikrostrukturnih promena i citotoksičnosti ispitivanih dentalnih legura.

## 4. MATERIJAL I METOD ISTRAŽIVANJA

Ispitivanja su vršena na dve različite dentalne legure koje imaju veoma široku primenu u stomatološkoj praksi.

U cilju dokazivanja radne hipoteze o negativnom uticaju broja ponavljanog topljenja i livenja na biološke karakteristike dentalnih legura, obe legure su izložene ponavljanim termičkim obradama, odnosno ponovljenom topljenju i livenju.

Kod dobijenih uzoraka svih grupa izvršena su biološka istraživanja u cilju utvrđivanja citotoksičnosti, dok je za utvrđivanje mikrostrukturnih karakteristika primenjena standardna tehnika ispitivanja materijala. Na uzorcima komercijalnih legura na bazi Co-Cr sistema (Dentalit C) i legura na bazi Ni-Cr sistema (Wiron 99), praćene su promene mikrostrukture u zavisnosti od broja ponavljanog topljenja i livenja, odnosno zagrevanja do temperature livenja i hlađenja.

### 4.1. Materijal istraživanja

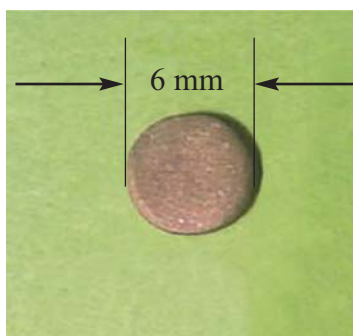
Za ispitivanje u ovoj studiji korišćene su sledeće dentalne legure: Ni-Cr legura (Wiron 99) i Co-Cr legura (Dentalit C). U tabeli 1 dat je hemijski sastav ispitivanih legura.

Tabela 1. Hemijski sastav ispitivanih legura (mas.%), prema deklaraciji proizvođača

Tip legure	Komercijalni naziv legure	Ni	Co	Cr	Mo	Nb	Si, Fe, C, Cu, Mn i ostali elementi
Ni-Cr	Wiron 99 (Bego, Germany)	65,00	0	22,50	9,50	1,00	Si-1,0; Fe-0,5; Ce-0,5; C-0,02
Co-Cr	Dentalit C (Sanitaria, Austria)	0	60,00	30,00	5,50	1,00	Si, Fe, Cu, Mn, C

#### 4.1.1. Topljenje i livenje uzoraka dentalnih legura

Test uzorci dentalnih legura su liveni u zubotehničkoj laboratoriji Klinike za stomatološku protetiku, Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Uzorci legura oblika diska, prečnika 6 mm i debljine 1 mm (slika 9) izliveni su u indukcionom aparatu u prisustvu vazduha. Kao polazna sirovina korišćeni su ingoti komercijalnih Ni-Cr i Co-Cr legura. Temperature livenja su izabrane po preporuci proizvođača i iznosile su 1420°C za leguru Wiron 99 i 1450°C za leguru Dentalit C. U tabeli 2 su dati uslovi livenja i pregled označavanja uzoraka u radu. Nakon livenja izvršeno je odsecanje ulivnih kanala sa izlivenih uzoraka.



Slika 9. Izliven, neobrađen uzorak Co-Cr dentalne legure (Dentalit C)

Tabela 2. Označavanje uzoraka u radu i uslovi livenja

Komercijalni naziv legure	Oznaka legure	Uslovi livenja	Broj uzoraka
Wiron 99	W1	Ni-Cr legura jednom topljena u indukcionom aparatu u prisustvu vazduha i izlivena u uslovima zubotehničke laboratorije	25
	W4	Ni-Cr legura četiri puta topljena u indukcionom aparatu u prisustvu vazduha i izlivena u uslovima zubotehničke laboratorije	25
	W8	Ni-Cr legura osam puta topljena u indukcionom aparatu u prisustvu vazduha i izlivena u uslovima zubotehničke laboratorije	25
Dentalit C	D1	Co-Cr legura jednom topljena u indukcionom aparatu u prisustvu vazduha i izlivena u uslovima zubotehničke laboratorije	25
	D4	Co-Cr legura četiri puta topljena u indukcionom aparatu u prisustvu vazduha i izlivena u uslovima zubotehničke laboratorije	25
	D8	Co-Cr legura osam puta topljena u indukcionom aparatu u prisustvu vazduha i izlivena u uslovima zubotehničke laboratorije	25
Ukupan broj uzoraka			150

### 4.1.2. Priprema uzoraka

Zamešano je testo samovezujućeg akrilata, prema recepturi proizvođača. Kalupi su napunjeni zamešanim akrilatnim testom i u njih su utisnuti uzorci dentalnih legura. Tako formirani uzorci su podvrgnuti mehaničkom mokrom brušenju silicijumkarbidnim papirnim diskovima, finoće od 600 do 1200, a zatim poliranju dijamantskom pastom. Posmatranje sadržaja pora u uzorcima vršeno je u nenagriženom stanju, a mikrostrukturna karakterizacija izvršena je na nagriženim uzorcima. Nagrizanje uzoraka vršeno je pomoću rastvora 10 ml HNO<sub>3</sub> + 40 ml HCl (uzorci Ni-Cr legure) i 15 ml HNO<sub>3</sub> + 15 ml CH<sub>3</sub>COOH + 60 ml HCl + 15 ml H<sub>2</sub>O (uzorci Co-Cr legure), poznatom metodom, (28, 135, 149).

### 4.1.3. Reagensi i rastvori

Za potrebe ovog istraživanja korišćeni su: medijum za uzgajanje ćelija RPMI-1640, obogaćen je sa 10% serumom fetusa govečeta (FCS, od engl. **F**etal **C**alf **S**erum), fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom (PBS, od engl. **P**hosphate **B**uffer **S**aline), propidijum jodid, 3-4,5 dimetiltiazol-2,5 difeniltetrazolijum bromid (MTT), dimetil-sulfoksid (DMSO), (Superlab, Novi Beograd, Srbija), Annexin V-FITC (AnnV), (Biotium, Hayward, CA), dihidrorodamin-123 i DAF-FM diacetat (Molecular Probes, Eugene, OR), tripsin (Difco, Detroit, MI, SAD), p-nitro-fenol fosfat.

Medijum za gajenje ćelija bio je RPMI-1640 obogaćen sa 20 mM puferom HEPES, 50 μM 2-merkaptetanolom, 2mM L-glutaminom, 100 IJ/ml penicilina, 60 mg/ml gentamicina, 10 mM natrijum piruvatom. Komponente sistema komplementa koje su se nalazile u FCS-u su inaktivirane na 56°C u trajanju od 30 minuta, da bi zatim bio dodavan u medijum u koncentraciji od 10%, kako bi se postigli optimalni uslovi za kultivaciju ćelija. Za pripremanje ćelija korišćen je PBS bez dvovalentnih katjona, sa dodatkom 2 % FCS označen kao preparativni medijum. Rastvor tripsina (0,25 %) u PBS-u uz dodatak 0,02 % EDTA je služio za odlepljivanje adherentnih ćelija od podloge. Za brojanje ćelija služio je rastvor boje tripan plavo (0,1 %) u PBS-u. Za određivanje relativne brojnosti metabolički aktivnih ćelija korišćen je rastvor MTT (0.5 mg/ml) u medijumu za kultivaciju ćelija.

#### 4.1.4. Ćelijske linije

Ćelijske linije korišćene u ovom istraživanju su: ćelijska linija mišjeg fibrosarkoma L929 (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, UK) i humani embrionalni fibroblasti (MRC-5 dobijena iz American Type Culture Collection, Rockville, MD, SAD). Ćelije su gajene u sterilnim plastičnim flašicama - falkonima (25cm<sup>3</sup>) u hranljivom medijumu (RPMI-1640 suplementiranom sa 2 mM L-glutaminom, 5x10<sup>-5</sup> M 2-mercaptoethanol, antibioticima i 0,01% natrijum piruvatom) obogaćenom sa 10% inaktivisanog FCS. Uslovi inkubacije podrazumevaju precizno definisane uslove rada (temperatura od 37°C, vlažna atmosfera i koncentracija CO<sub>2</sub> od 5 %).

#### 4.1.5. Priprema i kultivacija adherentnih ćelijskih linija

L929 i MRC-5 su adherentne ćelije, koje prilikom rasta formiraju veze sa dnom posude u kojoj se gaje. Pre početka eksperimenta neophodno je raskinuti veze ćelija sa podlogom, kako bi se ćelije sakupile za potrebe testa.

##### 4.1.5.1. Tripsinizacija

Tripsinizacija je postupak kojim se adherirane ćelije na dnu posude u kojoj su gajene odlepljuju sa dna, kako bi se moglo pristupiti njihovom brojanju. Tripsinizacija je vršena tako što je medijum u kojem su ćelije gajene prosut, zatim su falkoni (sterilne plastične flašice za gajenje ćelija, zapremine 25cm<sup>3</sup>) oprani 2 puta sa po 5 ml PBS (da bi se uklonile mrtve i neadherirane ćelije), kako bi se uklonio FCS kao i višak preostalog medijuma. Zatim je kulturi ćelija dodavano 500-1000 µl rastvora tripsina, čija je uloga bila da raskine međućelijske veze, ali i veze ćelija sa podlogom. Dodavanjem medijuma za kultivaciju u falkone sa odlepljenim ćelijama, zaustavljen je dalji proces tripsinizacije. Ovako prikupljene ćelije su centrifugirane 5 minuta na 500g. Talog dobijen na ovaj način resuspendovan je u 1ml svežeg medijuma za kultivaciju. Zatim se pristupilo brojanju ćelija.

##### 4.1.5.2. Bojenje ćelija

Broj ćelija je određivan bojenjem tripan plavim. Tripan plavo je boja koja ulazi u citoplazmu ćelija koje imaju oštećenu membranu, dok žive ćelije ostaju nebojene. Ćelije su mešane sa tripan plavim u odnosu 1:1 ili 1:10. Brojanje ćelija vršeno je pod svetlosnim mikroskopom u komori po Burker-Turku, a broj ćelija po ml suspenzije je računat kao:

$$\frac{\text{broj ćelija}}{\text{broj polja}} \times \text{faktor razblaženja} \times 10^6$$

Nakon određivanja broja raspoloživih ćelija, podešen je njihov broj koji je bio neophodan za eksperimentalni rad.

#### **4.1.5.3. Izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi**

Heparinizovana periferna krv zdravog donora centrifugirana je na 120g 10 minuta. Uočena su dva sloja: žućkasti gornji sloj koji predstavlja plazmu, i donji crveni sloj u kojem se nalaze eritrociti. Po 1 ml gornjeg sloja seruma pažljivo je nanet na 4ml fikola (Lymphocyte separation medium). Potom su epruvete sa datim sadržajem centrifugirane 2 minuta na 800g. Kao rezultat dobijena su tri prstena: gornji žuti, koji predstavlja krvne pločice, donji sloj fikola i između njih sloj leukocita. Ćelije su nakon toga isprane dva puta u PBS-u na 700g 10 minuta i potom resuspendovane u RPMI medijumu (koji je suplementiran antibioticima i sadrži 10% FCS-a). Ćelije su bojene tripan plavom bojom (koja boji mrtve ćelije) i Turkovom bojom (koja boji leukocite) kako bi se razlikovale žive od mrtvih ćelija.

#### **4.1.6. Priprema uzoraka za biološke eksperimente**

Uzorci legura oblika diska, izliveni su kao što je opisano u poglavlju 4.1.1., a zatim su mokro brušeni i polirani. Nakon toga, uzorci su oprani deterdžentom, isprani tekućom vodom, pa destilovanom vodom i na kraju 70% etanolom. Nakon toga je svaki uzorak sterilisan UV svetlom, sa svake strane po 15min.

#### **4.1.7. Priprema ćelija za biološke eksperimente**

Za određivanje vijabiliteta ćelija MTT testom adherentne ćelije su sađene u gustini  $7 \times 10^3$  po bunarčiću.

Za analizu vijabilnosti ćelija testom kisele fosfataze adherentne ćelije su sađene u gustini  $3 \times 10^4$ , a neadherentne u gustini  $1 \times 10^5$  po bunarčiću.

Za citofluorimetrijske analize adherentne ćelije su sađene u gustini  $5 \times 10^4$ , a neadherentne u gustini  $1 \times 10^5$  po bunarčiću.

## 4.2. Metod istraživanja

### 4.2.1. Mikrostrukturalna karakterizacija legura

Uzorci Ni-Cr legure nagrižani su u rastvoru 10 ml HNO<sub>3</sub> + 40 ml HCl, a Co-Cr legura u rastvoru 15 ml HNO<sub>3</sub> + 15 ml CH<sub>3</sub>COOH + 60 ml HCl + 15 ml H<sub>2</sub>O. Polirani (nenagriženi uzorci) posmatrani su korišćenjem svetlosnog mikroskopa (Karl Zeiss Axiovert 25) koji je opremljen digitalnom kamerom Panasonic WV-CD50. Nagriženi uzorci su analizirani korišćenjem svetlosnog mikroskopa (Karl Zeiss Axiovert 25) i skenirajućeg elektronskog mikroskopa SEM FEI Quanta 200, formiranjem slike sekundarnih (SE) i povratnih elektrona (BSE). Na nagriženim uzorcima izvedena je kvantitativna mikrohemijska analiza pomoću „Oxford Instrumental INCA X-sight” sistema za energetska-disperzivnu spektroskopsku analizu EDS, povezanog sa SEM Quanta 200 metodom analize po površini, liniji i u tački (57, 81, 108, 109).

### 4.2.2. Rendgenostrukturalna analiza (XRD)

Rendgenostrukturalna analiza vršena je na uzorcima koji su korišćeni za mikrostrukturalnu karakterizaciju. Ispitivanja su urađena na rendgenskom difraktometru za prah firme „Siemens” model D500 PC sa CuK<sub>α</sub> zračenjem, korišćenjem Ni filtra pri naponu od 35 kV i struji od 20 mA. Identifikacija faza izvršena je pomoću programskog paketa DIFFRACT<sup>plus</sup> uz korišćenje JCPDS (*Internacional Centre for Diffraction Data*) baze podataka. Snimanje je izvršeno u opsegu uglova 2θ, od 30° do 90°, kontinuiranim skeniranjem brzinom od 0,01° 2θ/s. Takođe, merene su širine maksimuma na polovini visine (*Full Width at Half Maximum-FWHM*) u literaturi poznato i pod nazivom poluširina refleksije (*B*), (71).

### 4.2.3. Merenje makro i mikro tvrdoće

Makro i mikro tvrdoća merena je na nagriženim metalografskim uzorcima primenom uređaja Buehler SemiMacro Vickers 5112 HV112 i Buehler MicroMet 5101 Vickers sa opterećenjem od 1kgf u trajanju od 5s i 25gf u trajanju od 10s, respektivno. U radu su dati srednje vrednosti merenja makro i mikro tvrdoće sa odgovarajućom greškom merenja.



## **4.2.4. Testovi za određivanje vijabiliteta**

### **4.2.4.1. MTT test**

MTT test se bazira na redukciji MTM (3-4,5 dimetiltiazol-2,5 difeniltetrazolijum bromid, tetrazolijumska so) u formazan, kao rezultat mitohondrijalne aktivnosti živih ćelija. MTT je supstanca žute boje koja se u živim ćelijama redukuje u formazan purpurne boje, pod dejstvom mitohondrijalnih reduktaza.

Nakon kultivacije, medijum sa ćelijama je uklanjan i 50 µl MTT rastvora dodavano je u svaki bunarčić sa 96 mesta. Ploče su inkubirane 1h na 37°C. Da bi se rastvorio formazan, čija količina je proporcionalna intenzitetu ćelijske respiracije, dodavan je DMSO. Absorbanca je merena na 570nm automatskim čitačem za mikrotitarske ploče (LKB 5060-006). Vrednosti dobijene merenjem na konkretnoj talasnoj dužini proporcionalne su broju vijabilnih ćelija, odnosno intenzitetu ćelijske respiracije (2, 3, 4, 27, 53, 104).

### **4.2.4.2. Test vijabiliteta merenjem kisele fosfataze**

Ovaj test je zasnovan na hidrolizi p-nitro-fenol fosfata intracelularnim kiselim fosfatazama u p-nitro fenol, u vijabilnim ćelijama. Jedinjenje koje se dobija je bezbojno, ali povećanjem pH u rastvoru, rastvor postaje bazan i žuto prebojen. Vrednost pH se menja dodavanjem NaOH.

Nakon eksperimentom predviđene kultivacije, kulturama je dodato 50 µl supstrata za kiselu fosfatazu (rastvor koji sadrži p-nitro-fenil-fosfat, TritonX i 0,3% Na-acetat). Ova reakcija je prekinuta pomoću 50 µl 1,3M NaOH nakon 2 sata inkubacije na 37°C. Intenzitet boje određen je merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 405nm automatskim čitačem za mikrotitarske ploče (LKB 5060-006, LKB, Beč, Austrija).

### **4.2.4.3. Određivanje prisustva ćelijske smrti dvostrukim aneksin-propidijum jodid bojenjem**

U cilju detekcije apoptoze protočnom citofluorimetrijom, korišćeno je dvostruko bojenje aneksin/propidijum-jodid. Osnovna karakteristika rane apoptoze jeste translokacija fosfatidilserina sa unutrašnje na spoljašnju stranu membrane. Ovaj fenomen moguće je detektovati bojenjem Aneksinom V, koji se u prisustvu kalcijumovih jona vezuje za

fosfatidilserin sa visokim afinitetom. Propidijum-jodid je korišćen zbog svoje osobine da se veže za dvostruki heliks DNK, s obzirom da je permeabilitet ćelija u kasnoj fazi apoptoze narušen i da je time omogućen ulazak ove boje u ćeliju.

U ovom eksperimentu ćelije (PBMC i fibroblasti) su zasejane u petoplikatima u ploče sa 96 bunarčića ravnog dna i uzgajane u hranljivom medijumu. Posle 48h inkubacije ćelije su resuspendovane, kolekcionirane i bojene prema uputstvu proizvođača. Nakon resuspendovanja u 100 µl Ann/PI rastvora, ćelije su inkubirane 15 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi. Reakcija je prekinuta dodavanjem čistog Annexin Binding Buffer-a, a zatim su ćelije analizirane FACSCalibur protočnim citometrom. Ćelije u ranoj apoptozi detektovane su kao aneksin +/- propidijum-jodid -, dok su kao dvostruko pozitivne ćelije označene one koje su bile u kasnoj apoptozi ili sekundarno nekrotične ćelije.

#### **4.2.4.4. Merenje intracelularnog azotmonoksida (NO) i reaktivnih kiseoničnih (ROS) i azotnih (RNS) jedinjenja**

Produkcija reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta detektovana je primenom DHR boje. Reč je o nepolarnom jedinjenju koje lako ulazi u ćelije u kojima postaje fluorescentno nakon reakcije sa reaktivnim kiseoničnim i azotnim vrstama. U ovom testu ćelije su prvo obojene pomoću 1µM dihidrorodamina-123, 20 min., zasejane u petoplikatima, a potom eksponirane uzorcima dentalnih legura. Nakon perioda kultivacije u trajanju od 24h, ćelije su oprane i resuspendovane u PBS. Detekcija produkcije ROS i RNS izvršena je pomoću protočnog citometra (FACSCalibur), a analiza pomoću softverskog programa CellQuestPro, (13).

Za kvantifikaciju unutarćelijskog NO korišćen je DAF-FM diacetat (74, 75, 76). To je fluorescentna boja koja pasivno difunduje kroz ćelijske membrane, a deacetilacijom ćelijskim esterazama biva zarobljena u citoplazmi ćelija. Sam DAF-FM ima svoju fluorescencu koja se dramatično povećava nakon reakcije sa NO, kada nastaje derivat benzotriazola (74, 75, 76). Za merenje intracelularnog NO ćelije su inkubirane 1h na 37°C, sa 2µM DAF-FM, indikatorom za NO, u RPMI 1640 10%, bez fenol crvenog. Ćelije su zatim oprane i inkubirane još 15min. na 37°C u svežem RPMI 1640, kako bi se postigla kompletna deesterifikacija intracelularnih diacetata. Zatim su ćelije resuspendovane u PBS i analizirane pomoću protočnog citometra.

### 4.3. Statistička obrada podataka

Informacije o rezultatima istraživanja date su preko osnovnih pokazatelja deskriptivne statistike. Od pokazatelja centralne tendencije izračunate su aritmetička sredina i medijana. Varijabilitet podataka kvantifikovan je preko standardne devijacije, standardne greške aritmetičke sredine i koeficijenta varijacije.

Izbor metoda za statističku analizu determinisan je postavljenim hipotezama i karakteristikama podataka. U radu, izbor između alternativnih metoda izvršen je u skladu sa vrednostima koeficijenta varijacije. Koeficijent varijacije je korišćen kao aproksimativni kriterijum, za proveru pretpostavke o distribuiranosti podataka po modelu normalne raspodele, na kojoj se zasniva parametarska statistika.

U radu su proveravane hipoteze o jednakosti uzoraka poređenjem srednjih vrednosti. Za proveru hipoteze o jednakosti tri i više sredina u slučaju homogenih podataka u uzorcima ( $C_V < 30\%$ ) korišćen je parametarski model metoda analize varijanse, a u slučaju heterogenih podataka ( $C_V > 30\%$ ) neparametarski Kruskal Wallis-ov model analize varijanse. Testiranje razlike dve srednje vrednosti u slučaju homogenih podataka u uzorcima ( $C_V < 30\%$ ) izvršeno je testom najmanje značajne razlike (LSD), dok je u slučaju heterogenih podataka ( $C_V > 30\%$ ) primenjen Mann-Whitney-ev test.

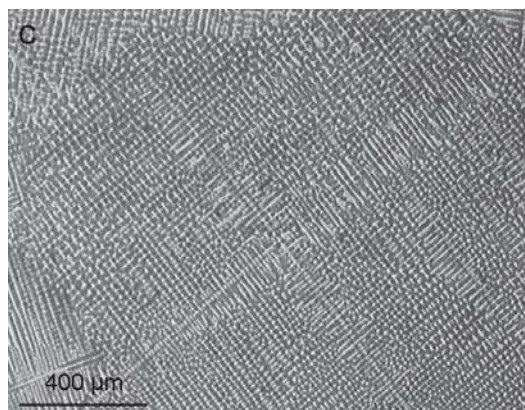
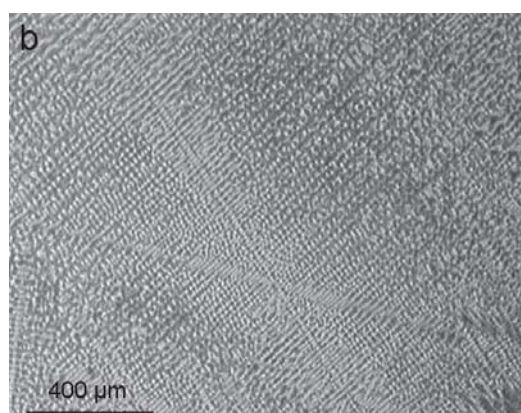
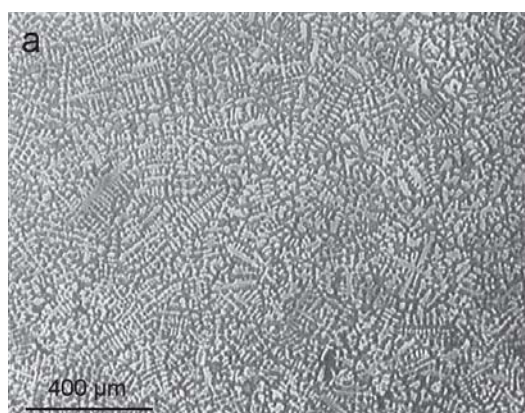
Za ocenu značajnosti razlike tri prosečne vrednosti vezanih merenja (posle 24, 48 i 72h) korišćena je parametarska analiza varijanse za ponovljena merenja, u slučaju homogenih vrednosti u uzorcima, a u slučaju heterogenih podataka primenjena je Friedman-ova analiza varijanse. Pojedinačna poređenja tj. poređenja prosečnih vrednosti dva vezana uzorka, izvršena su na bazi rezultata t-testa za zavisne uzorke ( $C_V < 30\%$ ) i Wilcoxon-ovog testa ekvivalentnih parova ( $C_V > 30\%$ ).

Statistička analiza eksperimentalnih rezultata izvršena je upotrebom paketa STATISTICA v. 6.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, USA).

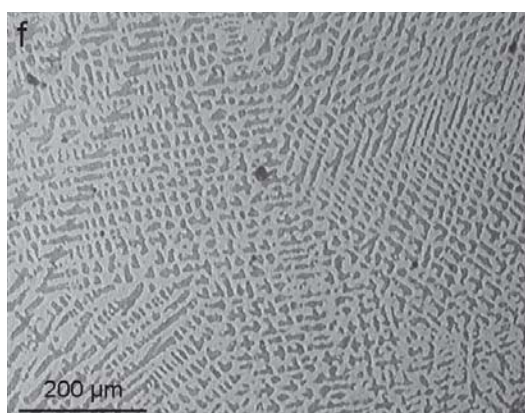
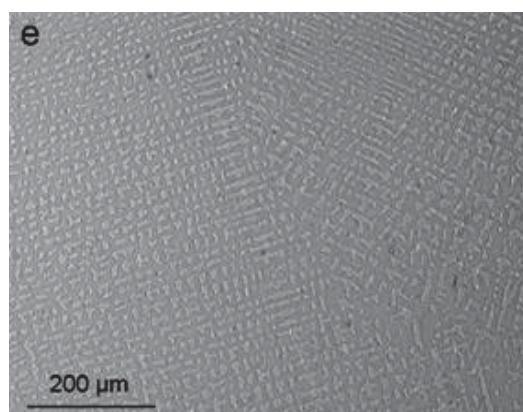
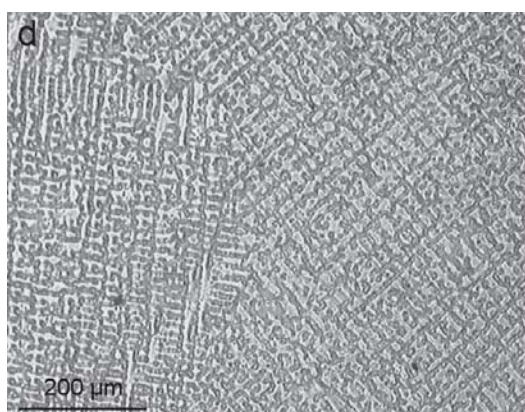
## 5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 5.1. Rezultati ispitivanja mikrostrukturne karakterizacije uzoraka dentalnih legura

Tipična dendritna struktura uzoraka ispitivanih dentalnih legura nakon različitog broja topljenja i livenja prikazana je na slici 10, Wiron 99 (a-c) i Dentalit C (d-f). Mikrostruktura jednom topljenih i livenih uzoraka ispitivanih dentalnih legura je tipična dendritna struktura koja pokazuje razliku u hemijskom sastavu. Dendritne grane sadrže manje legirajućih i pratećih elemenata u poređenju sa međudentritnim prostorom. Karakteristične su i različite faze nepravilnog oblika u međudentritnom prostoru. Zbog takvog različitog hemijskog sastava uzorci se nagrízaju različitom brzinom (9). Na osnovu navedenog čak i pri manjim povećavanjima, uočavaju se promene u mikrostrukтури sa povećanjem broja topljenja i livenja. Ove promene su znatno izraženije kod legure Dentalit C.



Slika 10 (a-c). Tipična mikrostruktura Ni-Cr dentalne legure nakon (a) prvog; (b) četvrtog i (c) osmog topljenja i livenja, dobijena optičkom mikroskopijom



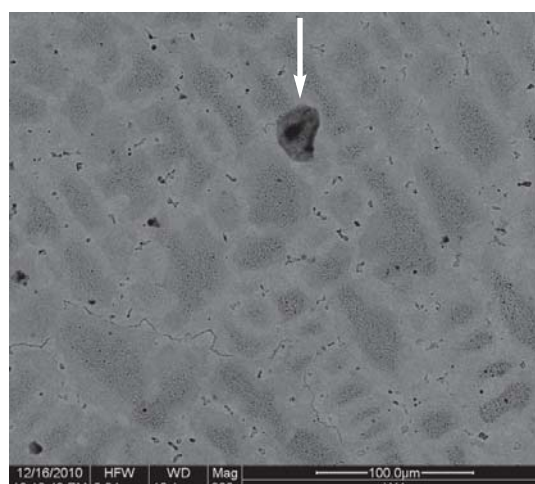
Slika 10 (d-f). Tipična mikrostruktura Co-Cr dentalne legure nakon (d) prvog; (f) četvrtog i (g) osmog topljenja i livenja, dobijena optičkom mikroskopijom

Skenirajuća elektronska mikroskopija nam daje malo više informacija o strukturi dentalnih legura.

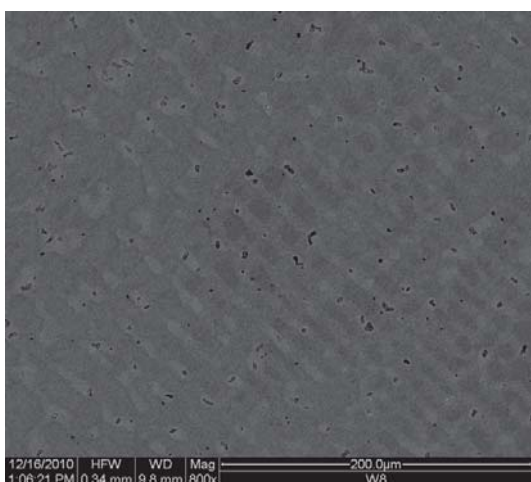
Na slici 11 (a-c) prikazane su SEM mikrofotografije mikrostrukture legure Wiron 99 nakon (a) prvog, (b) četvrtog i (c) osmog topljenja i livenja. Na osnovu binarnog dijagrama stanja je poznato da Ni-Cr sistem pokazuje široku oblast rastvorljivosti u čvrstom stanju Cr u Ni (slika 6). U složenom sistemu kao što je Wiron 99 pored čvrstog rastvora uočavaju se i faze u međudendritnom prostoru nepravilnog oblika, koje menjaju svoj raspored u zavisnosti od broja topljenja i livenja, slika 11 (a-c).



W1(a)



W4 (b)



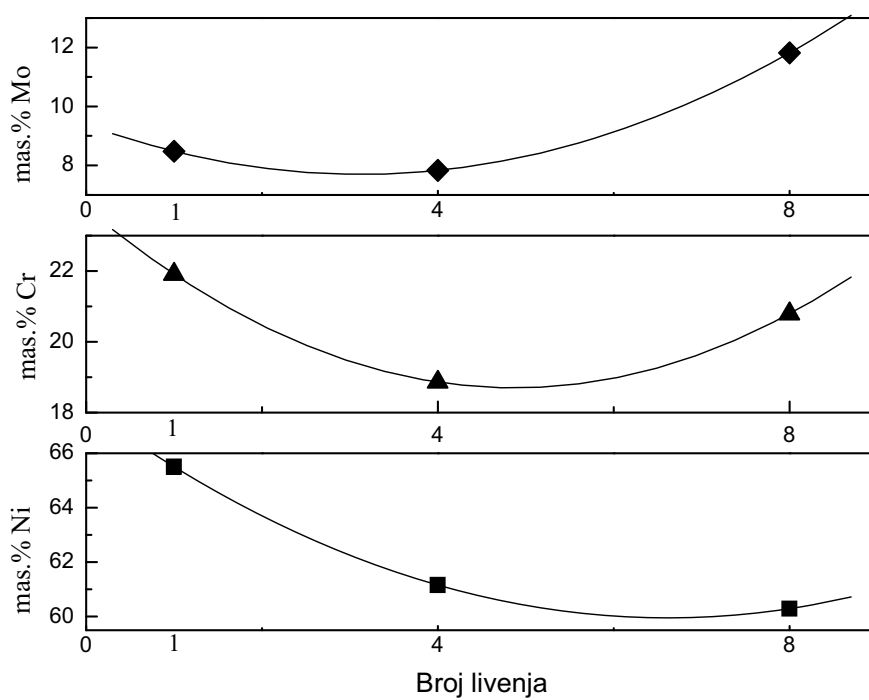
W8(c)

Slika 11 (a-c), SEM mikrofotografije strukture legure Wiron 99 dobijene nakon (a) prvog; (b) četvrtog i (c) osmog topljenja i livenja. Prikazana je površina na kojima je rađena EDS analiza. Na slici 11b strelica označava mikro-lunker

Rezultati EDS analize po površini prikazanoj na slici 11 (a-c) uzoraka legure W1, W4 i W8 prikazani su u tabeli 3, a trend promene glavnih legirajućih elemenata prikazan je na slici 12.

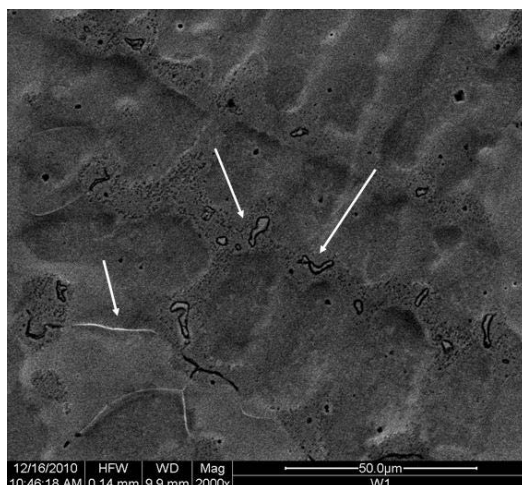
Tabela 3. Hemijski sastav legure Wiron 99 određen EDS analizom (mas.%).

Legura	Zona	Ni	Cr	Mo
W1	Površina	65.51	21.91	8.48
W4	Površina	61.16	18.86	7.83
W8	Površina	60.29	20.79	11.82

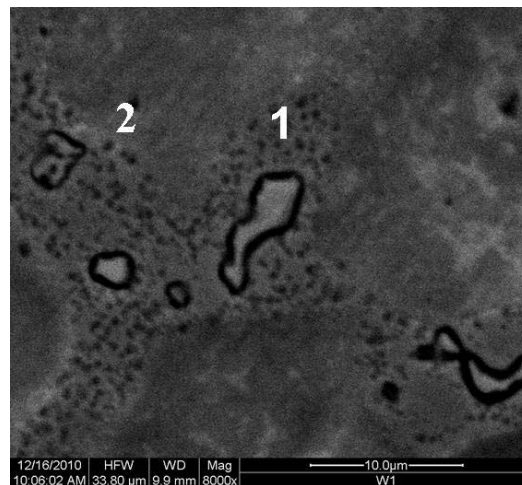


Slika 12. Promena glavnih legirajućih elemenata (Ni, Cr, Mo) u leguri Wiron 99 sa promenom broja topljenja i livenja.

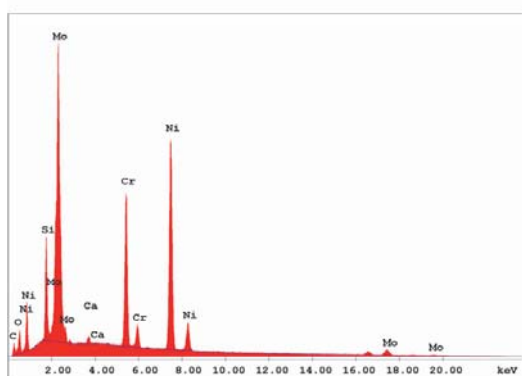
EDS analiza faza u međudendritnom prostoru (slika 13, a i b) ukazuje da se radi o složenim karbidima čiji su odgovarajući EDS spektri prikazani na slici 13, c i d.



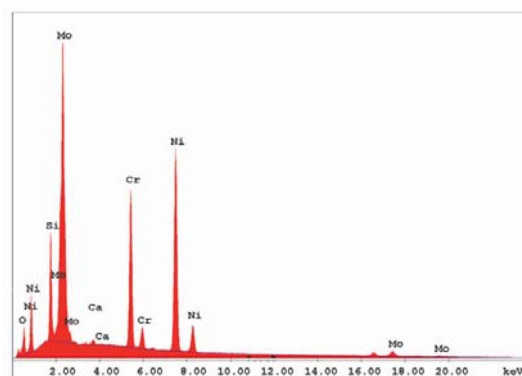
(a)



(b)



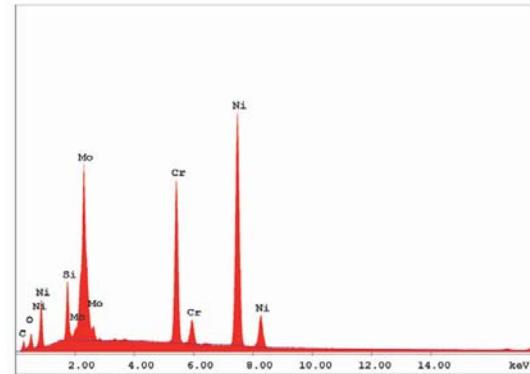
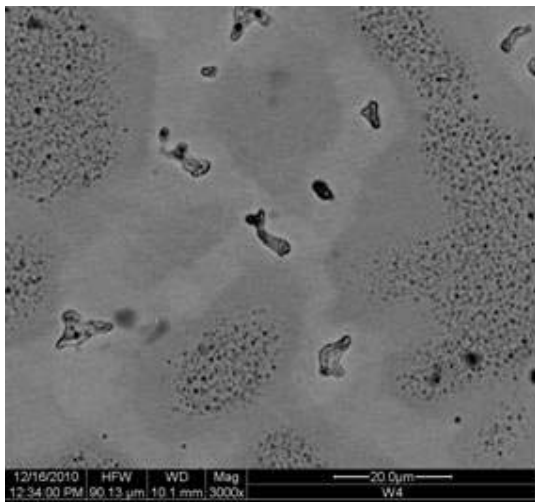
(c)



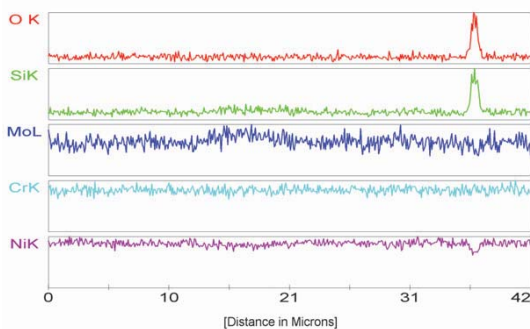
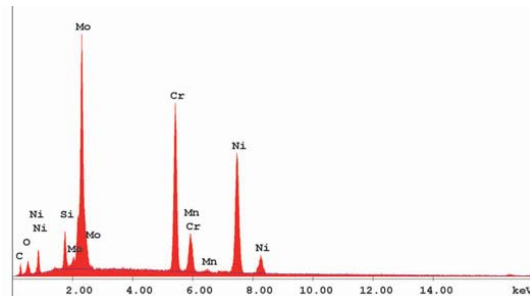
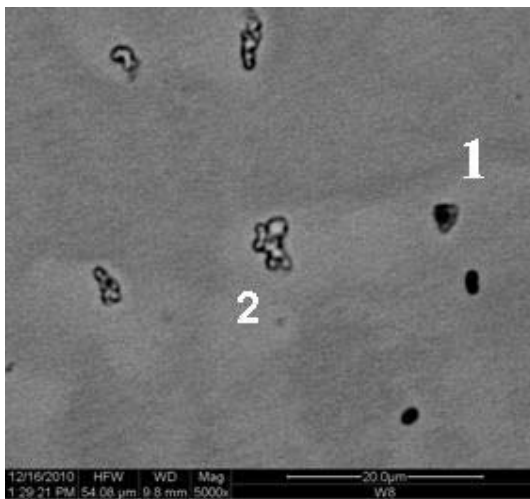
(d)

Slika 13. SEM mikrofotografije i EDS spektri uzorka legure W1  
(a) sa uočenim fazama u međudendritnom prostoru,  
(b) morfologija analiziranih faza,  
(c) EDS spektar faze 1 u međudendritnom prostoru,  
(d) EDS spektar faze 2 u međudendritnom prostoru.



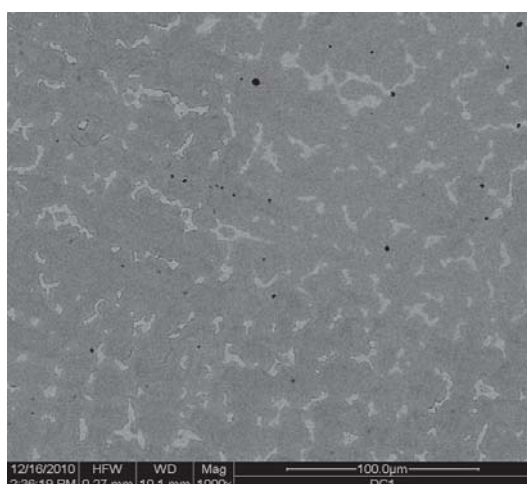


Slika 14. SEM mikrofotografija uzorka legure W4, sa uočenim fazama u međudendritnom prostoru, sa EDS spektrom faze u centru mikrofotografije.

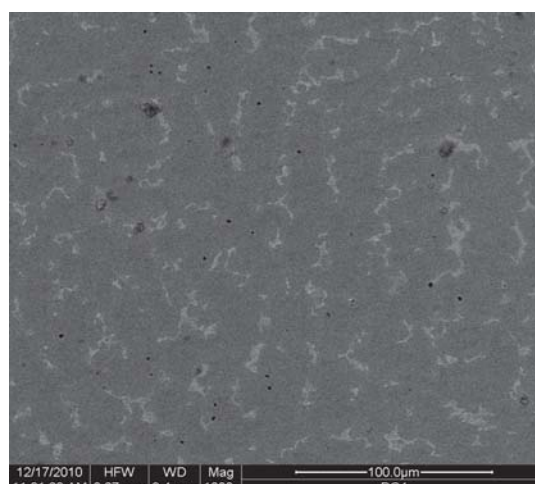


Slika 15. SEM mikrofotografija uzorka legure W8 sa linijskim spektrom (1) i EDS analizom faze (2).

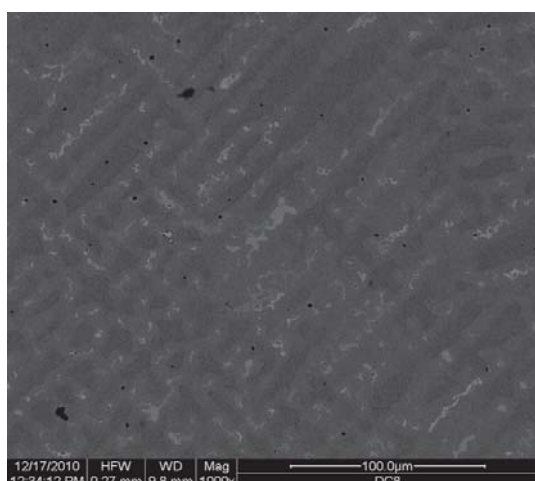
Na slici 15 prikazan je deo mikrostrukture legure Wiron 99 nakon osmog topljenja i livenja. Uočeno je prisustvo različitih faza. Linijskom EDS analizom prikazanoj na slici utvrđeno je da se u slučaju faze 1 radi zapravo o oksidnom uključku  $\text{SiO}_2$ .



D1 (a)



D4 (b)



D8 (c)

Slika 16. (a-c), SEM mikrofotografije strukture legure Dentor C dobijene nakon (a) prvog; (b) četvrtog i (c) osmog topljenja i livenja. Površina na kojima je rađena EDS analiza.

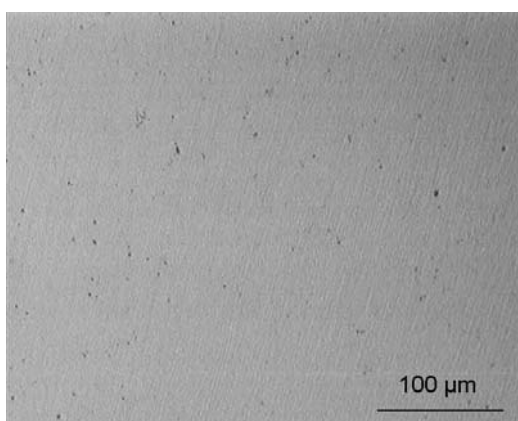
Livenjem se dobija tipična dendritna, nehomogena struktura. U tabeli 4 su prikazani zbirni rezultati EDS analize legure Dentalit C za sva tri uslova livenja D1, D4 i D8 i to rađeni površinski za oblast dendrit, međudendritni prostor i zbirno obe oblasti, slika 16. Uočavaju se da se razlike u hemijskom sastavu smanjuju sa povećavanjem broja livenja i topljenja i livenja, odnosno dobija se homogenija struktura. Ovo je takođe u saglasnosti sa rezultatima mikrotvrdoće, gde se razlika u nivou vrednosti mikrotvrdoće smanjuje sa povećanjem broja topljenja i livenja.

Tabla 4. Hemijski sastav pojedinih zona dendritne strukture legure Dentalit C određen EDS analizom (mas.%).

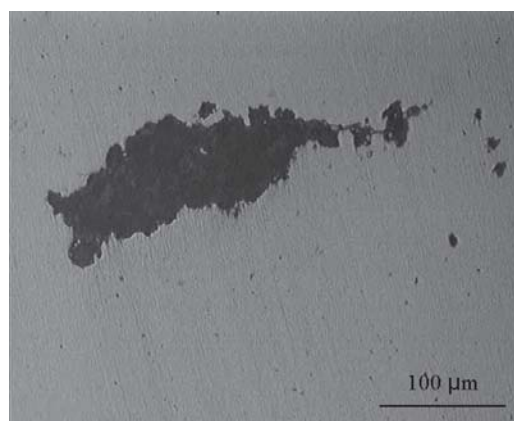
Legura	Zona	Co	Cr	Mo	Fe	Si
D1	Dendrit	65,10	27,72	4,89	1,19	1,10
	Međudend. prostor	49,08	28,23	17,22	0,83	1,68
	Površina	60,57	27,33	7,10	1,01	1,26
D4	Dendrit	61,49	28,55	4,97	0	0,48
	Međudend. prostor	53,41	24,67	12,29	1,17	1,58
	Površina	61,86	28,13	5,96	1,27	0,79
D8	Dendrit	65,40	24,79	4,92	1,09	0,92
	Međudend. prostor	60,51	26,20	8,17	0,98	1,11
	Površina	62,43	25,83	6,78	1,06	0,74

## 5.2. Poroznost odlivaka

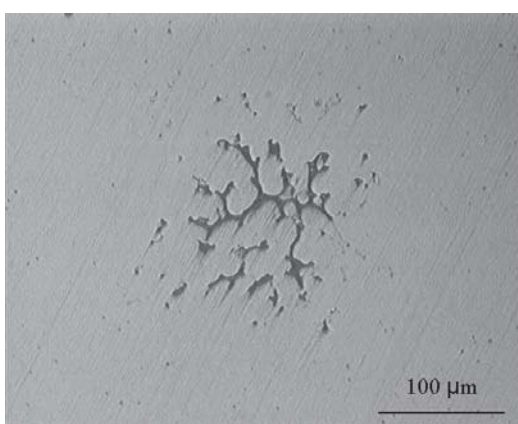
Jedna od najčešćih grešaka koje se javljaju kod livenja je poroznost koja je uslovljena pojavom dva fenomena. Prvi je poroznost uslovljena zapreminskim skupljanjem pri prelazu iz tečnog u čvrsto stanje. Drugi fenomen je gasna poroznost uslovljena izdvajanjem gasova u toku livenja i javlja se u obliku okruglih pora ili lunquera, kako na površini, tako i u unutrašnjosti uzorka. Ovakvi defekti se ne mogu ukloniti u toku postupka brušenja i poliranja. Za razliku od legura zlata koje se koristi u stomatološkoj praksi kod kojih je linearna kontrakcija pri prelazu iz tečnog u čvrsto stanje oko 1,25%, za bazne dentalne legure je karakteristična nešto viša vrednost zapreminskog skupljanja oko 2,12 – 2,24%. Na slikama 16 i 17 su prikazane tipične greške na ispitivanim uzorcima.



a) uzorakW1



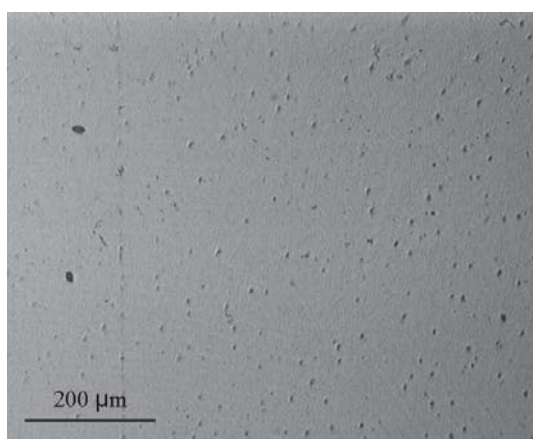
b) uzorakW4



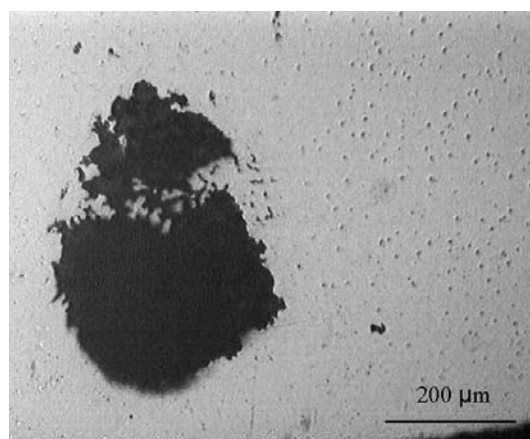
c) uzorakW8

Slika 16. SEM mikrofotografije Ni-Cr legure (Wiron 99).

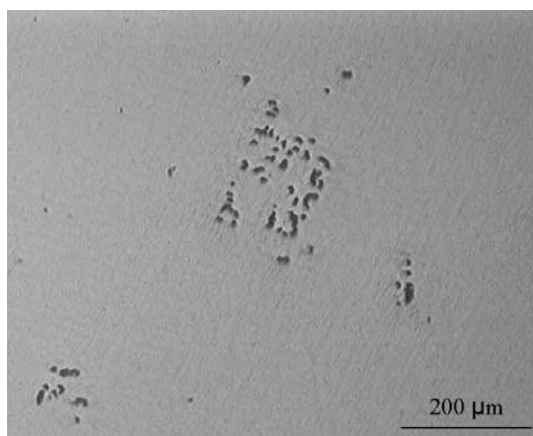
- a) - mikroporoznost
- b) - lunke u odlivku usled nedolivenosti
- c) - lokalizovana poroznost



a) uzorak D4



b) uzorak D4



c) uzorak D8

Slika 17. SEM mikrofotografije Co-Cr legure (Dentalit C).

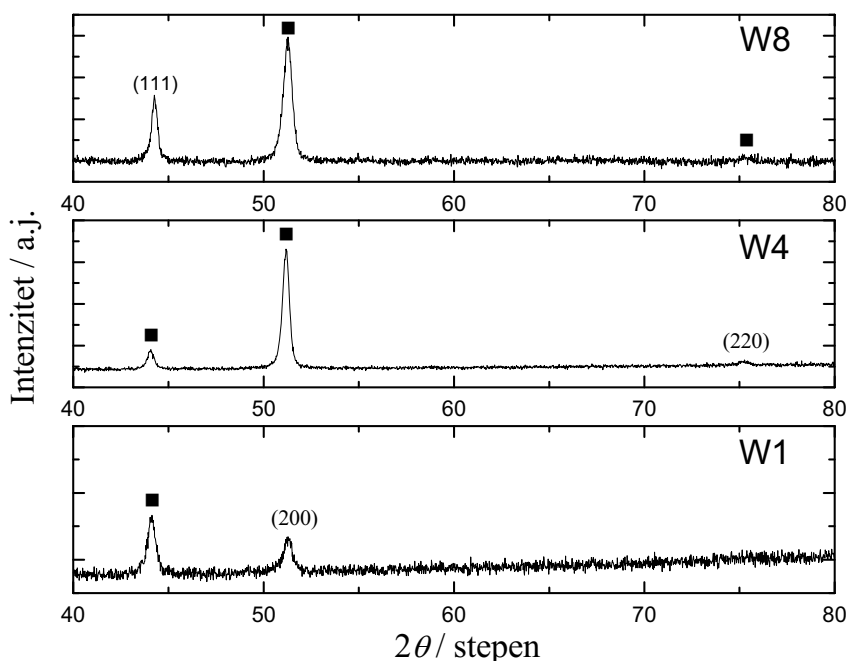
- a) - mikroporoznost
- b) - luncker u odlivku usled nedolivenosti
- c) - lokalizovana poroznost

### 5.3. Rezultati rendgenostrukturne analize (XRD)

Za dobro poznavanje strukture materijala potrebno je pre svega poznavanje kristalne strukture. Mehaničke, termičke, magnetne, optičke i hemijske osobine materijala direktna su posledica strukturnih osobina. Struktura i osobine materijala, tj. njihovo karakteristično ponašanje u datim uslovima određuju njegovu primenu.

### 5.3.1. Rezultati rendgenostrukturne analize uzoraka legure Wiron 99

Rendgenogrami dentalne legure na bazi Ni-Cr sistema (Wiron 99) nakon prvog, četvrtog i osmog topljenja i livenja prikazani su na slici 18. Na svim rendgenogramima uočene su samo refleksije površinski centrirane kubne kristalne rešetke (fcc) čvrstog rastvora  $\alpha$ -Ni (■). Identifikacija faze izvršena je pomoću programskog paketa DIFRACT<sup>plus</sup> uz korišćenje JCPDS (*Internacional Centre for Diffraction Data*), broj PDF kartice 4-0850. Može se videti da sa povećanjem broja topljenja i livenja legure, menjaju relativni intenziteti difrakcionih maksimuma sa ravni  $(111)_{\text{fcc}}$ ,  $(200)_{\text{fcc}}$  i  $(220)_{\text{fcc}}$ . Takođe se menja i preferentna orijentacija kristalita sa  $(111)_{\text{fcc}} \rightarrow (200)_{\text{fcc}}$ . Razlog ovakvom ponašanju se može tražiti u promeni hemijskog sastava legure tokom sukcesivnog topljenja i livenja, odnosno ugradnji legirajućih elemenata u tačno određene ravni. Ovakvo objašnjenje se može dati i za pojavu refleksija sa ravni  $(220)_{\text{fcc}}$  koje nisu uočene na rendgenogramu uzorka koji je jednom topljen i liven, W1.



Slika 18. Rendgenogrami legure Wiron 99 nakon prvog (W1); četvrtog (W4) i osmog topljenja i livenja (W8).

■ – površinski centrirana kubna kristalna rešetka čvrstog rastvora  $\alpha$ -Ni

Poznato je da se širine maksimuma na rendgenogramima mogu koristiti za određivanje stepena kristaliniteta, odnosno dimezija kristalnih regiona u kojima struktura nije bitno narušena, odnosno pravilna je (71). Za određivanje veličine kristalita u ovom radu korišćena je Scherrer-ova formula (22, 132).

$$D_{hkl} = \frac{0.89\lambda}{\beta \cos \theta}$$

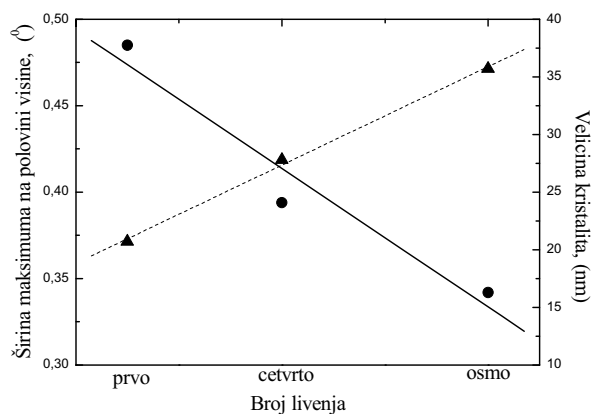
gde je:

- $D_{hkl}$  – debljina kristalita, odnosno prosečna dimenzija kristalita u pravcu normalnom na niz ravni sa kojih difraktuju rendgenski zraci ( $\text{Å}$ )\*,
- $\lambda$  – talasna dužina upotrebljenog rendgenskog zračenja ( $\text{Å}$ ), u ovom slučaju  $\text{CuK}_\alpha$  zračenje ( $\lambda = 1.5406 \text{ Å}$ )
- $B$  – širina difrakcione linije nastala usled strukturnih faktora i izračunata je kao  $\beta = B - b$ , gde je  $B$  širina na poluvisini refleksije difrakcionog maksimuma, a  $b$  je korekcija instrumentalnog širenja
- $\theta$  – Bragg-ov ugao.

Sa povećanjem broja topljenja i livenja legure, širina difrakcionih maksimuma koji odgovaraju ravni  $(111)_{\text{fCC}}$  se smanjuju, dok se veličina kristalita, odnosno stepen sredečnosti povećava, slika 19. Kada bi kristali bili savršeni onda bi širina difrakcione linije zavisila od instrumentalnih faktora i bila bi mala. Predmet proučavanja su realne složene legure koje su složeni polikristalni agregati koji poseduju blokmozaičnu strukturu. To znači da je svako kristalno zrno izgrađeno od više kristalita. Kristaliti su delovi kristalnog zrna sa kojih se rendgenski zraci koherentno rasipaju. Između kristalita, susednih regiona jednog kristalnog zrna, nema međuprostora. Dele ih granice podzrna. I sa jedne i sa druge strane granice subzrna (dislokacione linije) isti je atomski raspored. Međutim, svaki kristalit je malo pomeren u odnosu na drugi.

---

\*dozvoljena je upotreba ovih jedinica u kristalografskim tekstovima ( $1 \text{ Å} = 0.1 \text{ nm}$ )



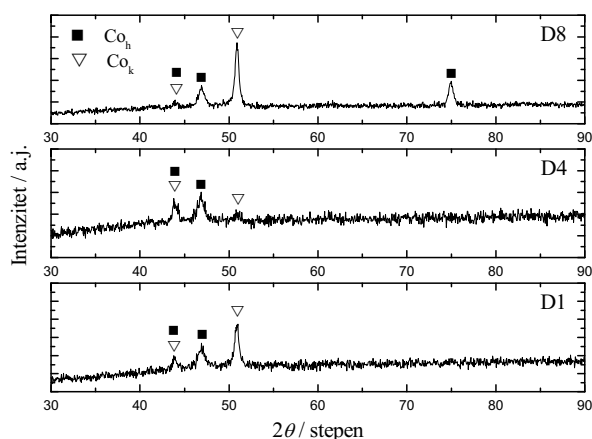
Slika 19. Promena širine maksimuma  $(111)_{fcc}$  (●) i veličine kristalita (▲) sa povećanjem broja topljenja i livenja

### 5.3.2. Rezultati rendgenostrukturne analize uzoraka legure Dentalit C

U leguri na bazi Co-Cr sistema (Dentalit C) mnoga svojstva nastaju kao posledica kristalne prirode Co. Kobalt stvara jedinstvene legure zato što, po ravnotežnim dijagramima stanja ima dve alotropske modifikacije. Čist kobalt na niskim temperaturama (do  $\approx 420^{\circ}\text{C}$ ) ima gusto složenu heksagonalnu kristalnu rešetku (hcp) prostorne grupe  $P6_3/mmc$ , a od navedene temperature do temperature topljenja površinski centriranu kubnu rešetku (fcc), prostorne grupe  $Fm3m$ . Legirajući elementi: Fe, Ni, Mn i C imaju tendenciju da stabilizuju fcc strukturu i povećaju energiju greške u redosledu, dok elementi Cr, Mo, V i Si stabilizuju hcp strukturu i smanju energiju greške u redosledu (9).

Rendgenogrami dentalne legure na bazi Co-Cr sistema, Dentalit C nakon prvog, četvrtog i osmog topljenja i livenja prikazani su na slici 20. Analiza rendgenograma ukazuje na prisustvo dve kristalne strukture, odnosno faze u uzorcima legure u stanju D1, D4 i D8 uz korišćenje PDF kartica Co (fcc) 15-0806 i Co (hcp) 5-0806. Može se pretpostaviti da dendritni i međudendritni region odgovaraju hcp i fcc strukturi (113). Kao i kod Wiron-a 99 i kod Dentalit-a C se uočava da sa povećanjem broja topljenja i livenja dolazi do pojave refleksija sa ravni visokih indeksa, što može da bude posledica ugradnje novih atoma sa niskim vrednostima atomskih prečnika.





Slika 20. Rendgenogrami legure Dentalit C nakon prvog (D1), četvrtog (D4) i osmog topljenja i livenja (D8).

■ – Co<sub>h</sub> heksagonalna kristalna rešetka,  
▽ – Co<sub>k</sub> površinski centrirana kubna rešetka

## 5.4. Rezultati merenja makro i mikrotvrdoće ispitivanih dentalnih legura

Makrotvrdoća, kao bitan pokazatelj mehaničkih karakteristika legure i uslova livenja postepeno se smanjuje sa 328,5 na 282,8 MPa sa povećanjem broja livenja kod legure Dentalit C (tabela 5 i slika 21), što iznosi 13,91%. Sličan trend pokazuje i promena vrednosti makrotvrdoće legure Wiron 99, kod koje smanjenje iznosi 11,71%.

Tabela 5. Statistički pokazatelji makrotvrdoće ispitivanih legura

Legura	Broj livenja	Broj pon. (n)	Aritmetička sredina	Stand. devijacija	Koeficijent varijacije (c <sub>v</sub> u %)	Stand. greška
Dentalit C	Prvo	3	328,500	2,193	0,668	1,266
	Četvrto	3	321,067	1,350	0,421	0,780
	Osmo	3	282,833	3,513	1,242	2,028
Wiron 99	Prvo	3	190,467	2,212	1,161	1,277
	Četvrto	3	158,400	2,364	1,493	1,365
	Osmo	3	168,167	1,856	1,103	1,071

Pri merenjima vrednosti u uzorcima su bile homogene (c<sub>v</sub><30%). Takođe, prema rezultatima Leveneovog testa (F=0,694; p=0,638) varijanse uzoraka nisu se značajno razlikovale, pa je testiranje razlika prosečnih makrotvrdoća ispitivanih uzoraka izvršeno parametarskim modelom analize varijanse i t-testom.

Rezultati dvofaktorske analize varijanse (tabela 5) ukazuju da se legure Dentalit C i Wiron 99 vrlo značajno razlikuju po prosečnoj makrotvrdoći. Pri različitom broju topljenja i livenja prosečna makrotvrdoća dentalnih legura se razlikuje vrlo značajno. Vrednosti

parcijalnih eta kvadrata (tabela 6) ukazuju na vrlo jaku zavisnost makrotvrdoće od pojedinačnog uticaja legure (99,9%) i broja livenja (98,2%) kao i njihovog zajedničkog uticaja (96,3).

Tabela 6. Rezultati dvofaktorske analize varijanse za makrotvrdoću

Izvor varijabiliteta	Stepeni slobode	F	P	Parcijalni eta kvadrat
Legura	1	1926,46	<0,001**	0,999
Broj livenja	2	59,31	<0,001**	0,982
Legura x broj livenja	2	39,19	<0,001**	0,963

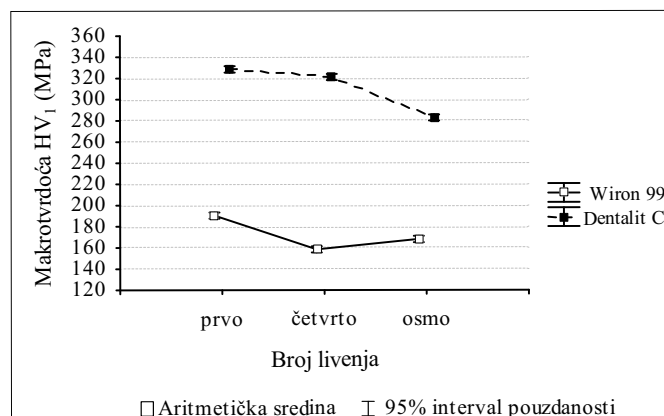
p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Dalje, testiranjem razlike između parova uzoraka, t-testom, dobijeni su rezultati (tabela 7) na osnovu kojih se može zaključiti da se uzorci po makrotvrdoći međusobno značajno razlikuju. Pri tom, najmanje se po makrotvrdoći razlikuju uzorci legure Dentalit C topljen i liven jedan i četiri puta (p=0,021) i uzorci legure Wiron 99 topljeni i liveni četiri i osam puta (p=0,003). Posmatrane legure topljene i livene isti broj puta vrlo značajno (p<0,001) se razlikuju po prosečnoj makrotvrdoći. Nivoi značajnosti svih ostalih razlika prosečnih makrotvrdoća su niži od 0,001.

Tabela 7. Nivoi značajnosti razlika prosečnih makrotvrdoća uzoraka legura Dentalit C i Wiron 99 topljenih i livenih jedan, četiri i osam puta, na bazi t-testa

Ispitivani uzorak	D 4	D 8	W 1	W 4	W 8
D1	0,021*	<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**
D4		<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**
D8			<0,001**	<0,001**	<0,001**
W1				<0,001**	<0,001**
W4					0,003**

0,01<p<0,05 razlika je značajna (\*), p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)



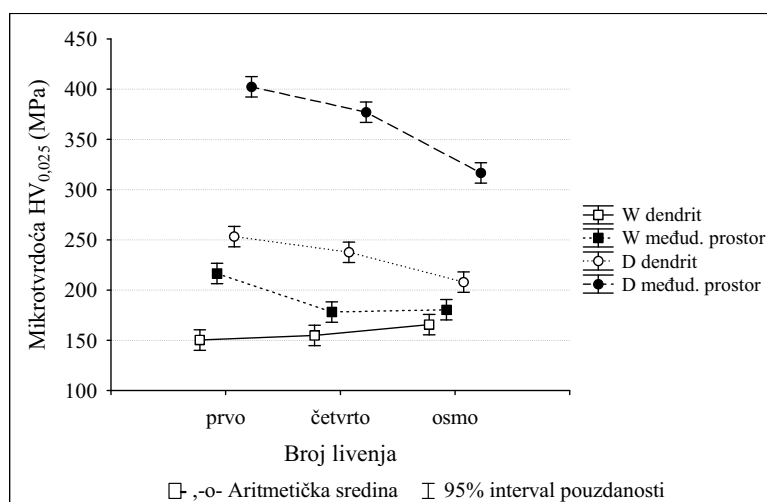
Slika 22. Promena makrotvrdoće legura Wiron 99 i Dentalit C u zavisnosti od broja topljenja i livenja

Na osnovu jasne razlike u strukturi, dendrit-međudendritni prostor (tabela 8, slika 22), bilo je moguće meriti vrednosti mikrotvrdoće pojedinih zona kod legura Wiron 99 i Dentalit C.

Kada je u pitanju legura Dentalit C, uočava se pad vrednosti mikrotvrdoće i dendritne i međudendritne oblasti sa povećanjem broja topljenja i livenja (slika 23). Kod legure Wiron 99 mikrotvrdoća dendrita se povećava sa povećanjem broja topljenja i livenja, a mikrotvrdoća međudendritnog prostora za leguru livenu četiri puta je manja nego kod legure livene jedan i osam puta (slika 23).

Tabela 8. Statistički pokazatelji mikrotvrdoće u dendritnoj i međudendritnoj zoni ispitivanih legura livenih različit broj puta

Legura	Zona	Broj livenja	Broj pon. (n)	Aritmetička sredina	Stand. devijacija	Koeficijent varijacije ( $c_v$ u %)	Stand. greška
Dentalit C	dendrit	prvo	3	253,267	8,545	3,374	4,933
		četvrto	3	237,667	3,868	1,628	2,233
		osmo	3	208,000	6,935	3,334	4,004
	međud. prostor	prvo	3	402,433	4,272	1,062	2,467
		četvrto	3	377,033	24,080	6,387	13,903
		osmo	3	316,667	5,200	1,642	3,002
Wiron 99	dendrit	prvo	3	150,267	2,597	1,728	1,499
		četvrto	3	154,933	3,550	2,291	2,050
		osmo	3	165,633	4,974	3,003	2,872
	međud. prostor	prvo	3	216,533	4,528	2,091	2,614
		četvrto	3	178,167	4,652	2,611	2,686
		osmo	3	180,433	5,138	2,848	2,967



Slika 23. Promena mikrotvrdoće legura Wiron 99 i Dentalit C u zavisnosti od broja topljenja i livenja u dendrit-međudendritnom prostoru

S obzirom na istu veličinu uzoraka, mada je Leveneov test pokazao da varijanse uzoraka nisu homogene ( $F=36,982$ ;  $p<0,001$ ), kao i homogenost podataka u svim uzorcima ( $c_v<30\%$ ), ispitivanje značajnosti razlika u mikrotvrdoći sprovedeno je trofaktorskom

analizom varijanse sa faktorima: legura, broj livenja i zona posmatranja. Prosečne mikrotvrdoće razlikovale su se za nivoe svih faktora i nivoe interakcija po dva faktora (tabela 9). Prema eta kvadratima (tabela 9), koji se kreću između 64,6% i 99,9%, svi faktori pojedinačno, po dva faktora posmatrana zajedno kao i tri analizirana faktora posmatrana istovremeno uticali su vrlo značajno na mikrotvrdoću.

Tabela 9. Rezultati trofaktorske analize varijanse za mikrotvrdoću

Izvor varijabiliteta	Stepeni slobode	F	p	Parcijalni eta kvadrat
Dentalna legura	1	1926,46	<0,001**	0,999
Broj livenja	2	59,31	<0,001**	0,988
Zona	1	863,42	<0,001**	0,832
Legura x broj livenja	2	39,19	<0,001**	0,973
Legura x zona	1	294,52	<0,001**	0,766
Broj livenja x zona	2	21,94	<0,001**	0,925
Legura x broj livenja x zona	2	2,95	0,071	0,646

p>0,05 razlika nije značajna, p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Dalje, testiranje razlika između dve prosečne vrednosti mikrotvrdoća izvršeno je preko t-testa.

Kada se analizira odnos nivoe samo faktora broj livenja, na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da postoji vrlo značajna razlika (p<0,001) između mikrotvrdoće uzoraka jedan i četiri, jedan i osam, kao i četiri i osam puta livenih. Rezultati testiranja interakcije legure i broja livenja (Tabela 10) ukazuju na vrlo značajnu (p<0,001) razliku između uzoraka legura Dentalit C i Wiron 99 isti ili različit broj puta livenih, vrlo značajnu razliku uzoraka legure Dentalit C različit broj puta livenih i vrlo značajnu razliku mikrotvrdoće uzorka od legure Wiron 99 livenog četiri puta u odnosu na uzorke od iste legure livene jedan i osam puta.

Tabela 10. Nivoi značajnosti razlika prosečne mikrotvrdoće uzoraka dentalnih legura Dentalit C i Wiron 99 livenih jedan, četiri i osam puta, na bazi t-testa

Ispitivani uzorak	D 4	D 8	W 1	W 4	W 8
D1	<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**
D4		<0,001**	0,002**	<0,001**	0,046*
D8			<0,001**	<0,001**	<0,001**
W1				0,024*	0,201
W4					0,001**

p>0,05 razlika nije značajna, 0,01<p<0,05 razlika je značajna (\*), p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Prema nivoima značajnosti t-testa za interakciju faktora legura i faktora zona merenja (tabela 11), koji su manji od 0,001, može se zaključiti da se mikrotvrdoća u oblasti dendrita i međudendritnom prostoru kod legure Dentalit C i kod legure Wiron 99 vrlo

značajno razlikuje, a vrlo značajno se razlikuju i mikrotvrdoće u istoj oblasti pri upotrebi različitih legura.

Tabela 11. Nivoi značajnosti razlika mikrotvrdoće legura Dentalit C i Wiron 99 u zoni dendrita i međudendritnom prostoru, na bazi t-testa

Ispitivani uzorak	D 4	D 8	W 1	W 4	W 8
D1	<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**
D4		<0,001**	0,002**	<0,001**	0,046*
D8			<0,001**	<0,001**	<0,001**
W1				0,024*	0,201
W4					0,001**

p>0,05 razlika nije značajna, 0,01<p<0,05 razlika je značajna (\*), p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Mikrotvrdoća se u oblasti dendrita statistički značajno ne razlikuje pri jednom i četiri livenja (p=0,278) i četiri i osam livenja (p=0,066), a u oblasti međudendritnog prostora vrlo značajno se razlikuje (p<0,001), tabela 12. Pri upotrebi uzoraka jednom, četiri i osam puta livenih utvrđena je statistički vrlo značajna razlika (p<0,001) u mikrotvrdoći u zoni dendrita i međudendritnom prostoru.

Tabela 12. Uticaj broja livenja uzoraka dentalnih legura na mikrotvrdoću u zoni dendrita i međudendritnom prostoru, na bazi nivoa značajnosti t-testa

Broj livenja oblast	Prvo/međud. prostor	Četvrto dendrit	Četvrto/međud. prostor	Osmo dendrit	Osmo/međud. Prostor
Prvo/dendrit	<0,001**	0,278	<0,001**	0,006**	<0,001**
Prvo/međud. Prostor		<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**
Četvrto/dendrit			<0,001**	0,066	<0,001**
Četvrto/međud. Prostor				<0,001**	<0,001**
Osmo/dendrit					<0,001**

p>0,05 razlika nije značajna, p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Rezultati t-testa za poređenje nivoa sva tri faktora (tabela 12) ukazuju da su sa povećanjem broja topljenja i livenja, kod obe legure, značajnije promene u mikrotvrdoći u međudendritnom prostoru nego u dendritu. Sa porastom broja topljenja i livenja promene mikrotvrdoće u dendritnoj zoni kod posmatranih legura se kreću u suprotnom smeru, odnosno kod legure Dentalit C mikrotvrdoća opada, a kod legure Wiron 99 raste. Pri tom, intenzivnija je promena kod legure Dentalit C.

Mikrotvrdoća u međudendritnom prostoru pokazuje opadajuću tendenciju sa povećanjem broja topljenja i livenja posmatranih legura. I u ovoj oblasti intenzivnija je promena kod legure Dentalit C (tabela 13).

Tabela 13. Nivoi značajnosti razlika prosečne mikrotvrdoće uzoraka legura Dentalit C i Wiron 99 u dendritnoj i međudendritnoj oblasti topljenih i livenih jedan, četiri i osam puta, na bazi t-testa

Uzorak	D1 međud.	D4 dendrit	D4 međud.	D8 dendrit	D8 međud.	W1 dendrit	W1 međud.	W4 dendrit	W4 međud.	W8 dendrit	W8 međud.
D1 dendrit	<0,001**	0,001**	<0,001**	0,035*	<0,001**	<0,001**	0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**
D1 međud.		<0,001**	<0,001**	<0,001**	0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**
D4 dendrit			<0,001**	0,012*	<0,001**	0,509	0,001**	<0,001**	<0,001**	0,037*	<0,001**
D4 međud.				<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**	0,233	<0,001**	<0,001**	<0,001**
D8 dendrit					<0,001**	<0,001**	0,981	<0,001**	0,011*	<0,001**	0,023*
D8 međud.						<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**
W1 dendrit							<0,001**	<0,001**	<0,001**	0,138	0,010*
W1 međud.								<0,001**	<0,001**	0,085	0,748
W4 dendrit									0,001**	<0,001**	0,001**
W4 međud.										<0,001**	<0,001**
W8 dendrit											0,044*

Kada je legura Wiron 99 u pitanju, sa povećanjem broja topljenja i livenja smanjuje se razlika u vrednosti mikrotvrdoće između dendrita i međudendritnog prostora, odnosno struktura postaje homogenija. Mikrotvrdoća dendritnog regiona raste, a međudendritnog opada, što ukazuje na sasvim drugačiju raspodelu hemijskih elemenata.

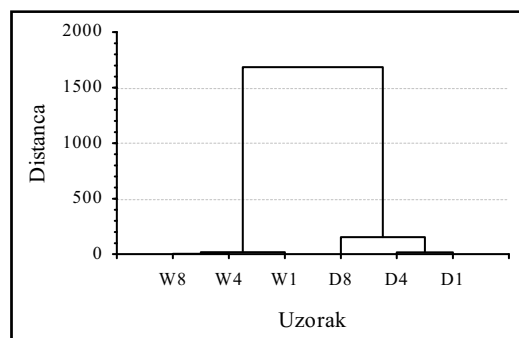
U cilju dobijanja informacije o razlici uzoraka prema mikrotvrdoći u dendritu i međudendritnom prostoru istovremeno, urađena je diskriminaciona analiza. Na osnovu rezultata ove analize može se zaključiti da se uzorci vrlo značajno razlikuju prema mikrotvrdoći ( $F=57,572$ ;  $p<0,001$ ). Pri tom, samo se uzorci legure Wiron 99 liveni četiri i osam puta statistički značajno ne razlikuju po mikrotvrdoći ( $p=0,099$ ), tabela 14. Po mikrotvrdoći vrlo značajno se razlikuju i uzorci dve legure liveni isti broj puta.

Tabela 14. Nivoi značajnosti razlika mikrotvrdoće u dendrit-međudendritnom prostoru uzoraka legura Dentalit C i Wiron 99 livenih jedan, četiri i osam puta, prema Mahalanobis-ovom kvadratnom odstojanju

Ispitivani uzorak	D 4	D 8	W 1	W 4	W 8
D1	<b>0,002**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
D4		<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>0,001**</b>
D8			<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
W1				<b>0,005**</b>	<b>0,002**</b>
W4					0,099

0,01< $p$ <0,05 razlika je značajna (\*),  $p$ <0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Na dendrogramu (slika 24) koji je rezultat grupisanja uzoraka prema sličnosti mikrotvrdoće pomoću klaster analize zasnovane na Mahalanobis-ovom kvadratnom odstojanju i Ward-ovom metodu povezivanja uzoraka, uočava se da su uzorci iste legure međusobno sličniji po mikrotvrdoći, kao i da je veća sličnost uzoraka legure Wiron 99 topljene i livene različit broj puta. Na osnovu distance između grupa uzoraka legure Dentalit C i legure Wiron 99 može se zaključiti da su u pitanju legure vrlo različite po mikrotvrdoći, kao što je kvantifikovano diskriminacionom analizom.



Slika 24. Sličnost uzoraka legura Wiron 99 i Dentalit C prema mikrotvrdoći u dendrit-međudendritnom prostoru

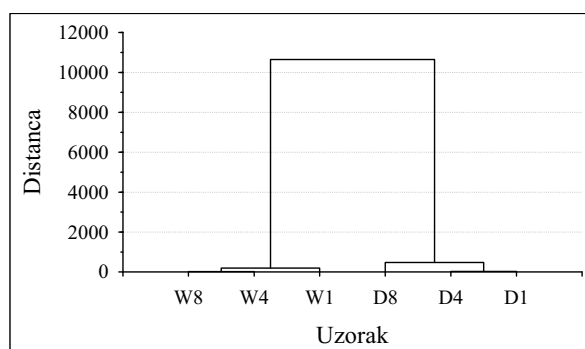
Rezultati diskriminacione analize ukazuju da se uzorci legura Dentalit C i Wiron 99 livenih jedan, četiri i osam puta vrlo značajno razlikuju po makrotvrdoći i mikrotvrdoći u obe zone posmatrano istovremeno ( $F=63,673$ ;  $p<0,001$ ). Uključivanjem i makrotvrdoće u analizu uzorci legure Dentalit C i legure Wiron 99 su se vrlo značajno razdvojili ( $p\leq 0,005$ ), tabela 15. Po tvrdoći vrlo značajno se razlikuju i uzorci dve legure liveni isti broj puta.

Tabela 15. Nivoi značajnosti razlika makrotvrdoće i mikrotvrdoće u dendrit-meždendritnom prostoru uzoraka legura Dentalit C i Wiron 99 livenih jedan, četiri i osam puta, prema Mahalanobis-ovom kvadratnom odstojanju

Ispitivani uzorak	D 4	D 8	W 1	W 4	W 8
D1	<b>0,004**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
D4		<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
D8			<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
W1				<b>0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
W4					<b>0,005**</b>

0,01< $p$ <0,05 razlika je značajna (\*),  $p$ <0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

U cilju detaljnije analize tvrdoće uzoraka od ispitivanih legura urađen je dendrogram (slika 25) na osnovu Mahalanobis-ovog kvadratnog odstojanja i Ward-ovog metoda povezivanja. I u ovom slučaju se uočava da su uzorci iste legure međusobno sličniji po tvrdoći, kao i da je veća sličnost uzoraka legure Wiron 99 topljene i livene različit broj puta. Na osnovu distance između grupa uzoraka legure Dentalit C i legure Wiron 99 može se zaključiti da su u pitanju legure vrlo različite po tvrdoći na šta je ukazao nivo značajnosti razlika određen diskriminacionom analizom. Uvođenjem makrotvrdoće u analizu povećala se oko šest puta distanca između legura, a povećane su i distance između uzoraka.



Slika 25. Sličnost uzoraka legura Wiron 99 i Dentalit C prema mikro i makrotvrdoći



## 5.5. Rezultati testova za ispitivanje vijabiliteta

U cilju preciznijeg određivanja biokompatibilnosti uzoraka ispitivanih dentalnih legura odabrani su tipovi ćelija koji bi najadekvatnije simulirali mikrosredinu u koju bi u realnim uslovima uzorak bio postavljen.

Istraživanje je sprovedeno u nekoliko faza. U prvoj fazi je najpre evaluiran toksičan uticaj uzoraka ispitivanih dentalnih legura na vijabilnost ćelija mišjeg fibrosarkoma L929, dok je u sledećem segmentu ispitivan njihov efekat na odgovarajućim primarnim fibroblastima humanog porekla, kao i mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravog donora.

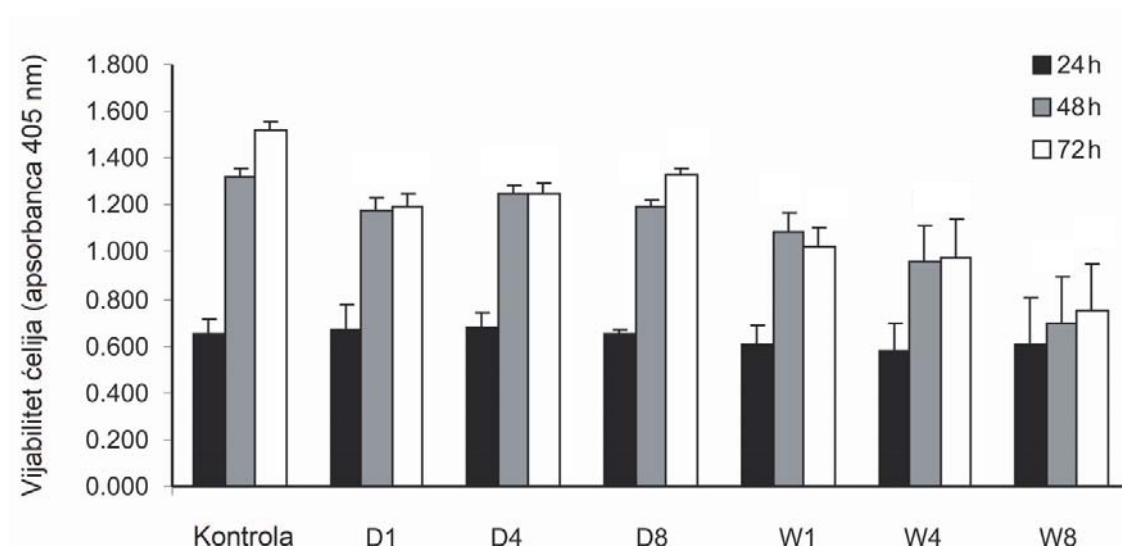
### 5.5.1. Rezultati testova za ispitivanje vijabiliteta na L929 ćelijama

Kako bi se dobile inicijalne informacije o biokompatibilnosti ispitivanih uzoraka kao i ispitao uticaj ponavljano topljenja i livenja na isti, testiran je vijabilitet linije L929 ćelija mišjeg fibrosarkoma kultivisanih u prisustvu uzoraka dentalnih legura nakon 24, 48 i 72h, a njihova vijabilnost je određivana pomoću dva testa: MTT testa i testa kisele fosfataze.

#### 5.5.1.1. Rezultati ispitivanja vijabiliteta L929 ćelija MTT testom

Rezultatima dobijenim MTT testom (slika 26) ustanovljen je pad u intenzitetu mitohondrijalne respiracije već 24h po izlaganju testiranim dentalnim legurama D1, D4, D8, W1, W4 i W8 u poređenju sa respiracijom ćelija u kontroli. Narednih 48h kultivacije ukazali su na povećanje broja vijabilnih ćelija u svim testiranim uzorcima u korelaciji sa vremenom kultivacije. Ono što je međutim bilo očigledno, fenomen je bio drastično niži u odnosu na isti u kontrolnom uzorku. Nakon trodnevne kultivacije, respiracija izmerena u svim kulturama izloženim dentalnim materijalima je pokazala drastično niže vrednosti u poređenju sa relevantnom kontrolom koju čine ćelije gajene u medijumu na plastici. Ukoliko između intenziteta respiracije i broja ćelija u kulturi postoji pozitivna korelacija, ovaj fenomen se može protumačiti sniženom stopom proliferacije i/ili povećanom smrtnošću ćelija kultivisanih u prisustvu dentalnih materijala, bez jasne zavisnosti od broja topljenja i livenja.

Ono što, međutim, predstavlja manjkavost MTT testa jeste činjenica da niže vrednosti respiracije detektovane u svim ćelijama izloženim delovanju D ili W uzoraka, mogu biti posledica manjeg broja živih ćelija u kulturi izloženoj dentalnim legurama, ali i sniženog nivoa respiracije po ćeliji.



Slika 26. Efekat uzoraka ispitivanih dentalnih legura D1, D4, D8, W1, W4 i W8 na L929 ćelije detektovan MTT testom

#### Statistička obrada rezultata MTT testa

Vijabilitet L929 ćelija utvrđen MTT testom povećavao se u prisustvu svih uzoraka dentalnih legura sa produžetkom vremena inkubacije (tabela 16). Najhomogeniji su bili podaci dobijeni za kontrolni uzorak, mada se heterogenost podataka povećavala sa protokom vremena. Pri merenju posle 24h inkubacije ćelija, najheterogeniji vijabilitet ćelija je bio izražen kod uzorka D4 ( $c_v=53,47\%$ ), a zatim W4 ( $c_v=46,49\%$ ). Takođe, vrednosti su bile heterogene za merenja u prisustvu uzoraka legura D8 ( $c_v=31,90\%$ ) i W8 ( $c_v=31,90\%$ ). I posle 48h najveće variranje vijabiliteta ćelija utvrđeno je u prisustvu uzorka D4 ( $c_v=69,67\%$ ), a heterogeni su bili i rezultati merenja uzoraka W8 ( $c_v=47,80\%$ ) i W4 ( $c_v=44,41\%$ ). Posle inkubacije u trajanju od 72h maksimalna heterogenost konstatovana je za W1 ( $c_v=36,89\%$ ). Koeficijenti varijacije preko 30% dobijeni su za vijabilitet za uzorke W4 ( $c_v=35,42\%$ ) i D8 ( $c_v=31,77\%$ ). Najhomogenije vrednosti za vijabilitet L929 ćelija ispitivan MTT testom dobijene su za kultivaciju od 72h, a najheterogenije za kultivaciju od 48h.

Tabela 16. Osnovni statistički pokazatelji vijabiliteta L929 ćelija određenog na osnovu MTT testa, za različit period kultivacije

Vreme inkubacije	Ispitivani uzorak	Broj pon. (n)	Aritmetička sredina	Medijana	Stand. devijacija	Koeficijent varijacije (%)	Stand. greška
24h	K	5	0,039	0,038	0,002	4,948	0,001
	D1	5	0,017	0,017	0,004	26,419	0,002
	D4	5	0,037	0,039	0,020	<b>53,474</b>	0,009
	D8	5	0,019	0,017	0,006	<b>31,901</b>	0,003
	W1	5	0,018	0,020	0,005	25,888	0,002
	W4	5	0,024	0,021	0,011	<b>46,491</b>	0,005
	W8	5	0,027	0,024	0,009	<b>33,102</b>	0,004
48h	K	5	0,120	0,123	0,011	9,279	0,005
	D1	5	0,039	0,040	0,005	11,575	0,002
	D4	5	0,058	0,042	0,041	<b>69,671</b>	0,018
	D8	5	0,038	0,038	0,010	25,273	0,004
	W1	5	0,057	0,053	0,015	26,982	0,007
	W4	5	0,049	0,046	0,022	<b>44,411</b>	0,010
	W8	5	0,056	0,054	0,027	<b>47,802</b>	0,012
72h	K	5	0,331	0,343	0,067	20,348	0,030
	D1	5	0,091	0,080	0,024	26,683	0,011
	D4	5	0,066	0,059	0,016	24,923	0,007
	D8	5	0,100	0,101	0,032	<b>31,775</b>	0,014
	W1	5	0,104	0,097	0,038	<b>36,891</b>	0,017
	W4	5	0,130	0,125	0,046	<b>35,417</b>	0,021
	W8	5	0,068	0,072	0,020	29,759	0,009

S obzirom na heterogenost podataka u navedenim uzorcima statistička analiza je izvršena neparametarskim testovima zasnovanim na medijanama, kao adekvatnim prosečnim vrednostima.

Prosečan vijabilitet ćelija značajno se razlikovao u kontrolnoj grupi i u ispitivanim ćelijama sa prisutnim uzorcima ispitivanih dentalnih legura Dentalit C i Wiron 99 posle 24h ( $p=0,030$ ) i 48h ( $p=0,020$ ), a vrlo značajno ( $p=0,002$ ) posle 72h (tabela 17). Sa produžetkom vremena inkubacije razlike u broju vijabilnih ćelija su bile sve izraženije, tj., značajnije ( $0,030 > 0,020 > 0,002$ ).

Na osnovu rezultata MTT testa primenjenog na L929 ćelije, posle 24h kultivacije u kontrolnoj grupi vijabilitet ćelija je bio vrlo značajno ( $p=0,008$ ) veći u odnosu na vijabilitet ćelija u prisustvu uzoraka legura D1, D8 i W1, a značajno ( $p=0,044$ ) veći u odnosu na vijabilitet ćelija pri upotrebi uzorka W4 (tabela 17). Razlike nisu bile značajne između prosečnog vijabiliteta ćelija kada je korišćen kontrolni uzorak i uzorci D4 ( $p=0,916$ ) i W8 ( $p=0,113$ ).

Posle 48h kultivacije, samo se vijabilitet ćelija u prisustvu uzorka D4 nije statistički značajno ( $p=0,059$ ) razlikovao od vijabiliteta ćelija u kontrolnoj grupi (tabela 17).

Na kraju kultivacionog perioda (posle 72h), rezultati za vijabilnost ostvarenu u prisustvu ispitivanih uzoraka sa dentalnim legurama su se vrlo značajno ( $p=0,009$ ) razlikovali od rezultata dobijenih u kontrolnom uzorku.

Tabela 17. Rezultati Kruskal Wallis-ove analize varijanse za poređenje vijabiliteta L929 ćelija u prisustvu ispitivanih uzoraka legura, nakon inkubacionog perioda od 24, 48 i 72h, na osnovu MTT testa

Vreme inkubacije	Ispitivani uzorci	H vrednost	p (nivo značajnosti)
24h	K,D1,D4,D8,W1,W4 i W8	13,981	<b>0,030*</b>
	D1, D4 i D8	3,020	0,221
	W1, W4 i W8	3,386	0,184
48h	K,D1,D4,D8,W1,W4 i W8	15,072	<b>0,020*</b>
	D1, D4 i D8	0,457	0,796
	W1, W4 i W8	0,570	0,763
72h	K,D1,D4,D8,W1,W4 i W8	20,567	<b>0,002**</b>
	D1, D4 i D8	4,940	0,085
	W1, W4 i W8	5,670	0,059

p>0,05 razlika nije značajna, 0,01<p<0,05 razlika je značajna (\*), p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Tri uzorka legure Dentalit C, kao i tri uzorka legure Wiron 99, nisu se razlikovala prema efektu na vijabilitet posle 24h, 48h i 72h (tabela 17). Međutim, rezultati Mann-Whitney U-testa (tabela 18) ukazuju na značajnu ( $p=0,047$ ) razliku u vijabilnosti ćelija, posle 24h kultivacije, između uzoraka u prisustvu dentalne legure Wiron 99 topljene i livene jedan i osam puta, kao i na značajnu ( $p=0,021$ ) razliku između uzoraka u prisustvu D1 i W8. Posle 48h inkubacije (tabela 18) ustanovljena je značajna razlika u vijabilitetu između broja ćelija u kulturi u prisustvu uzoraka W1 i D1 ( $p=0,028$ ) i D8 ( $p=0,045$ ). U prisustvu uzorka D1 vijabilitet ćelija je bio statistički značajno niži u poređenju sa vijabilitetom ćelija u prisustvu uzoraka legura D8 ( $p=0,047$ ) i W4 ( $p=0,028$ ), u toku 72h inkubacije. Takođe, posle 72h, u kulturi u prisustvu uzorka legure W8 bilo je značajno ( $p=0,047$ ) manje živih ćelija u poređenju sa uzorcima kultivisanim u prisustvu iste legure topljene i livene manji broj puta, kao i u uzorku D8.

Tabela 18. Nivoi značajnosti razlika vijabiliteta L929 ćelija, na osnovu MTT testa, pri periodu inkubacije 24h, 48h i 72h u prisustvu uzoraka dentalnih legura Dentalit C i Wiron 99, topljenih i livenih jedan, četiri i osam puta, na bazi Mann-Whitney U-testa

Vreme inkubacije	Ispitivani uzorci	D 1	D 4	D 8	W 1	W 4	W 8
24h	K	<b>0,008**</b>	0,916	<b>0,008**</b>	<b>0,008**</b>	<b>0,044*</b>	0,113
	D1		0,117	0,754	<b>0,402</b>	0,463	<b>0,021*</b>
	D4			0,175	0,117	<b>0,245</b>	0,602
	D8				0,917	0,600	<b>0,295</b>
	W1					0,463	<b>0,047*</b>
	W4						0,463
48h	K	<b>0,009**</b>	0,059	<b>0,009**</b>	<b>0,009**</b>	<b>0,009**</b>	<b>0,009*</b>
	D1		0,675	0,753	<b>0,028*</b>	0,602	0,117
	D4			0,528	0,465	<b>0,917</b>	0,754
	D8				<b>0,045*</b>	0,600	<b>0,249</b>
	W1					0,465	0,917
	W4						0,602
72h	K	<b>0,009**</b>	<b>0,009**</b>	<b>0,009**</b>	<b>0,009**</b>	<b>0,009**</b>	<b>0,009*</b>
	D1		0,076	0,754	<b>0,465</b>	0,175	0,249
	D4			<b>0,047*</b>	0,117	<b>0,028*</b>	0,917
	D8				0,917	0,251	<b>0,047*</b>
	W1					0,465	<b>0,047*</b>
	W4						<b>0,047*</b>

p>0,05 razlika nije značajna, 0,01<p<0,05 razlika je značajna (\*), p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Kod svih ispitivanih uzoraka prosečan vijabilitet L929 ćelija, određen MTT testom, statistički značajno ili vrlo značajno se razlikovao između inkubacionih perioda različite dužine (tabela 19, rezultati Friedman-ove analize varijanse). U kontroli i kulturama ćelija u kojima je korišćena legura Dentalit C livena jedan i osam puta utvrđene su značajne razlike u efektima na vijabilnost ćelija između dužine kultivacije od 24h i 48h, 24h i 72h, kao i 48h i 72h (tabela 19, rezultati Wilcoxon-ovog testa ekvivalentnih parova). Efekti uzoraka legura D4 i W1 značajno (p=0,043) su se razlikovali posle 48h i 72h u odnosu na efekte u toku 24h. Statistički značajne (p=0,043) promene u vijabilnosti ćelija između 24h i 48h prema 72h inkubacije desile su se u kulturi ćelija u kojoj je korišćen uzorak legure W4. Prisustvo testiranog uzorka legure Wiron 99 topljenja i livenja osam puta prouzrokovalo je značajnu razliku u vijabilitetu ćelija posle 72h u odnosu na vijabilitet nakon 24h inkubacije (tabela 19, rezultati Wilcoxon-ovog testa ekvivalentnih parova).

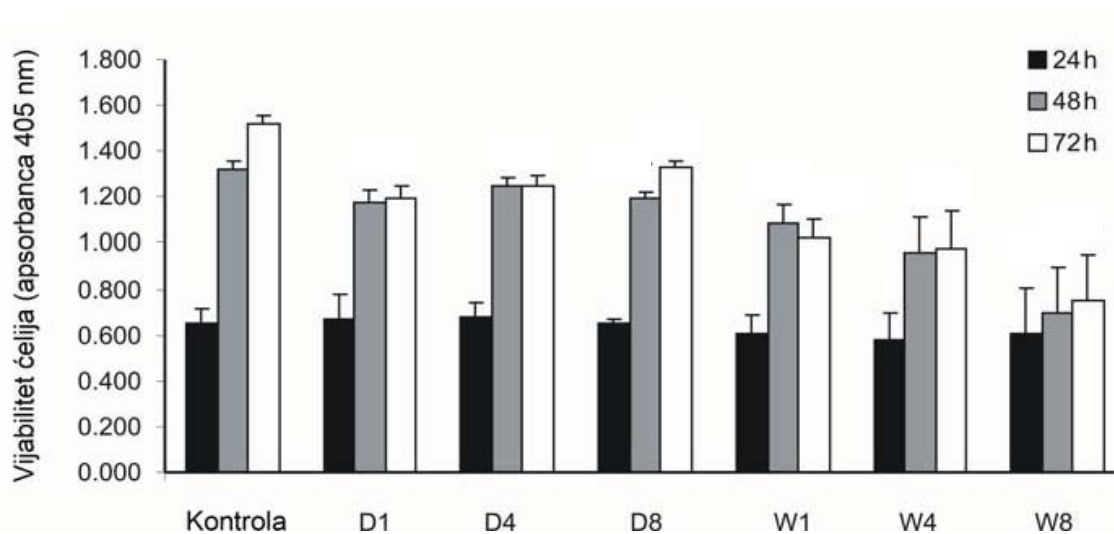
Tabela 19. Rezultati testiranja razlika prosečnih vrednosti vijabiliteta L929 ćelija u kontroli i u kulturi u prisustvu uzoraka dentalnih legura Dentalit C i Wiron 99, topljenim i livenim jedan, četiri i osam puta, u različitim inkubacionim periodima, na osnovu rezultata MTT testa

Ispitivani uzorci	Friedman-ova ANOVA		Wilcoxon-ov test ekvivalentnih parova					
	$\chi^2$	p	24h/48h		24h/72h		48h/72h	
			Z	P	Z	P	Z	P
K	10,000	<b>0,007**</b>	2,023	<b>0,043*</b>	2,023	<b>0,043*</b>	2,023	<b>0,043<sup>†</sup></b>
D1	10,000	<b>0,007**</b>	2,023	<b>0,043*</b>	2,023	<b>0,043*</b>	2,023	<b>0,043<sup>†</sup></b>
D4	8,400	<b>0,015*</b>	2,023	<b>0,043*</b>	2,023	<b>0,043*</b>	0,674	0,500
D8	10,000	<b>0,007**</b>	2,023	<b>0,043*</b>	2,023	<b>0,043*</b>	2,023	<b>0,043<sup>†</sup></b>
W1	8,400	<b>0,015*</b>	0,674	<b>0,043*</b>	0,674	<b>0,043*</b>	1,753	0,080
W4	7,600	<b>0,022*</b>	1,214	0,225	2,023	<b>0,043*</b>	2,023	<b>0,043<sup>†</sup></b>
W8	7,684	<b>0,021*</b>	1,826	0,068	2,023	<b>0,043*</b>	0,944	0,345

p>0,05 razlika nije značajna, 0,01<p<0,05 razlika je značajna (\*), p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

### 5.5.1.2. Rezultati ispitivanja vijabiliteta L929 ćelija testom kisele fosfataze

Kako bi izbegli mogućnost pogrešne interpretacije rezultata dobijenih MTT testom, uticaj dentalnih legura na vijabilnost ćelija u kulturi određivali smo i alternativnim testom zasnovanim na merenju aktivnosti kisele fosfataze u vitalnim ćelijama. Rezultati testa, prikazani na slici 27, jasno pokazuju da nakon 24h kultivacije broj vijabilnih ćelija nije bio značajno promenjen prisustvom ni jednog od testiranih uzoraka dentalnih legura, u poređenju sa kontrolom. U narednih 48h, i pored proliferacije ćelija u svim testiranim uzorcima, prisustvo dentalnih materijala se odrazilo negativno na vijabilnost L929 ćelija. Toksičan efekat Ni-Cr uzoraka bio je snažniji u poređenju sa Co-Cr i dobijao je na intenzitetu ponovljenim topljenjem i livenjem. Ovakva korelacija je u potpunosti izostala kod uzoraka D (slika 27).



Slika 27. Efekat uzoraka ispitivanih dentalnih legura D1, D4, D8, W1, W4 i W8 na L929 ćelije detektovan testom kisele fosfataze

#### Statistička obrada rezultata dobijenih testom kisele fosfataze

Na osnovu dobijenih rezultata, statistička obrada podataka je dala osnovne statističke parametre za različite periode inkubacije u tabeli 20.

Tabela 20. Osnovni statistički pokazatelji vijabilnosti L929 ćelija, određenog testom kisele fosfataze, za različito vreme inkubacije

Vreme inkubacije	Ispitivani Uzorci	Br. ponav. (n)	Aritmetička sredina	Stand. devijacija	Koeficijent varijacije (c <sub>v</sub> u %)	Stand. greška
24h	K	5	0,933	0,077	8,246	0,034
	D1	5	0,956	0,024	2,508	0,011
	D4	5	0,965	0,042	4,360	0,019
	D8	5	0,931	0,027	2,904	0,012
	W1	5	0,888	0,022	2,505	0,010
	W4	5	0,862	0,036	4,143	0,016
	W8	5	0,885	0,090	10,120	0,040
48h	K	5	1,569	0,062	3,935	0,028
	D1	5	1,419	0,101	7,148	0,045
	D4	5	1,490	0,055	3,717	0,025
	D8	5	1,436	0,021	1,486	0,010
	W1	5	1,330	0,082	6,189	0,037
	W4	5	1,200	0,117	9,725	0,052
	W8	5	0,936	0,200	21,343	0,089
72h	K	5	1,767	0,033	1,848	0,015
	D1	5	1,442	0,056	3,909	0,025
	D4	5	1,498	0,043	2,889	0,019
	D8	5	1,576	0,031	1,978	0,014
	W1	5	1,268	0,080	6,306	0,036
	W4	5	1,228	0,161	13,079	0,072
	W8	5	0,995	0,204	20,494	0,091

S obzirom na cilj istraživanja i konstatovanu homogenost podataka u ispitivanim uzorcima statistička analiza je sprovedena preko parametarskih testova za ispitivanje razlika aritmetičkih sredina.

U cilju utvrđivanja zavisnosti vijabiliteta ćelija od uticaja uzoraka dentalnih legura i trajanja inkubacije, eksperimentalni rezultati su analizirani modelom kombinovane dvofaktorske analize varijanse. Dobijeni rezultati (tabela 21) ukazuju na to da se prosečan vijabilitet ćelija između uzoraka ( $p=0,005$ ), kao i za različito vreme trajanja inkubacije ( $p<0,001$ ) vrlo značajno razlikuje. Razlike u vijabilitetu ćelija nastale pod dejstvom interakcije faktora uzorak i faktora vreme inkubacije su statistički značajne ( $p=0,011$ ). Prema vrednostima parcijalnog eta kvadrata posmatrani faktori i njihova interakcija imaju veliki uticaj (55-80%) na vijabilitet L929 ćelija određen testom kisele fosfataze.

Tabela 21. Rezultati kombinovane dvofaktorske analize varijanse za vijabilitet L929 ćelija, određen testom kisele fosfataze

Izvor varijabiliteta	Stepeni slobode	F	p	Parcijalni eta kvadrat
Uzorak	6	5,297	<b>0,005**</b>	0,694
Vreme inkubacije	2	54,258	<b>&lt;0,001**</b>	0,795
Uzorak x vreme inkubacije	12	2,851	<b>0,011*</b>	0,550

0,01< $p$ <0,05 razlika je značajna (\*),  $p$ <0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Nakon 24h kultivacije, prosečan vijabilitet L929 ćelija u testu kisele fosfataze statistički značajno se razlikovao između svih ispitivanih uzoraka posmatranih istovremeno (tabela 22,  $F=2,809$ ;  $p=0,029$ ), a kasnije vrlo značajno ( $p<0,001$ ). Razlike između prosečnog broja živih ćelija u kulturama u kojima su bili prisutni ispitivani uzorci legure Dentalit C, kao i legure Wiron 99 nisu bile značajne posle 24h kultivacije, a bile su vrlo značajne i značajne posle 72h trajanja eksperimenta (tabela 22). Pri tom, utvrđen je vrlo značajan efekat broja topljenja i livenja legure Wiron 99, već posle 48h, što nije slučaj pri korišćenju legure Dentalit C.



Tabela 22. Rezultati analize varijanse za poređenje vijabiliteta L929 ćelija u različitim grupama uzoraka za različito vreme inkubacije, na osnovu rezultata testa kisele fosfataze

Vreme inkubacije	Uzorak	F-vrednost	p (nivo značajnosti)
24h	K,D1,D4,D8,W1,W4 i W8	2,809	<b>0,029*</b>
	D1, D4 i D8	1,509	0,260
	W1, W4 i W8	0,302	0,745
48h	K,D1,D4,D8,W1,W4 i W8	20,456	<b>&lt;0,001**</b>
	D1, D4 i D8	1,464	0,270
	W1, W4 i W8	10,014	<b>0,003**</b>
72h	K,D1,D4,D8,W1,W4 i W8	27,944	<b>&lt;0,001**</b>
	D1, D4 i D8	11,323	<b>0,002**</b>
	W1, W4 i W8	4,416	<b>0,037*</b>

p>0,05 razlika nije značajna, 0,01<p<0,05 razlika je značajna (\*), p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Prosečan vijabilitet ćelija kultivisanih u prisustvu uzoraka legure Dentalit C topljenih i livenih jedan i četiri puta bio je statistički značajno, odnosno vrlo značajno veći u poređenju sa vijabilitetom ćelija inkubiranih u prisustvu svih uzoraka legure Wiron 99. Takođe, u prisustvu uzorka od legure Wiron 99 topljene i livene četiri puta posle 24h inkubacije utvrđen je statistički značajno manji vijabilitet ćelija u odnosu na kontrolni uzorak i uzorak legure Dentalit C topljen i liven osam puta (tabela 22).

U poređenju sa ostalim analiziranim uzorcima, kod uzorka izloženog dejstvu dentalne legure Wiron 99 topljene i livene osam puta ostvaren je vrlo značajno niži prosečan vijabilitet ćelija, posle 48h i 72h (tabela 23). Efekat prisustva uzorka W4 u kulturi ćelija, u toku svih merenja (24h, 48h i 72h) nije bio značajno lošiji samo u odnosu na uzorak dentalne legure Wiron 99 livene jedanput. Posle 48h kultivacije vijabilitet ćelija u kontrolnom uzorku značajno se razlikovao u poređenju sa živim ćelijama u kulturama sa dejstvom uzoraka D1 i W1. Utvrđena je i značajna razlika između uzoraka sa tretmanima D4 i W1.

U svim merenjima, vrednosti u kontroli su bile najviše, ali tek sa produžetkom vremena inkubacije na 72h razlike u odnosu na sve ostale testirane uzorke su postale značajne (tabela 23).

Vijabilitet kod uzoraka legure Dentalit C nije se značajno razlikovao u toku trajanja eksperimenta. Upotrebom legure Wiron 99 topljene i livene četiri puta nije ostvaren značajno niži vijabilitet ćelija nego upotrebom iste legure topljene i livene jedanput. Nakon 48 i

72h vijabilitet u uzorku izloženom dejstvu legure Wiron 99 topljene i livene osam puta statistički vrlo značajno je bio niži u odnosu na uzorke u kojima je korišćena ista legura livena manji broj puta.

Tabela 23. Nivoi značajnosti razlika vijabiliteta L929 ćelija utvrđenih testom kisele fosfataze, pri različitom trajanju inkubacije, u kontrolnom uzorku i u prisustvu uzoraka dentalnih legura Dentalit C i Wiron 99, topljenim i livenim jedan, četiri i osam puta, na bazi t-testa

Vreme inkubacije	Uzorak	D 1	D 4	D 8	W 1	W 4	W 8
24h	K	0,492	0,337	0,952	0,182	<b>0,040*</b>	0,157
	D1		0,781	0,455	<b>0,048*</b>	<b>0,008**</b>	<b>0,040*</b>
	D4			0,308	<b>0,026*</b>	<b>0,004**</b>	<b>0,022*</b>
	D8				0,202	<b>0,046*</b>	0,175
	W1					0,441	0,933
	W4						0,492
48h	K	<b>0,033*</b>	0,245	0,056	<b>0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
	D1		0,302	0,808	0,190	<b>0,003**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
	D4			0,427	<b>0,024*</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
	D8				0,123	<b>0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
	W1					0,061	<b>&lt;0,001**</b>
	W4						<b>&lt;0,001**</b>
72h	K	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>0,009**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
	D1		0,417	0,058	<b>0,017*</b>	<b>0,004**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
	D4			0,260	<b>0,002**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
	D8				<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
	W1					0,553	<b>&lt;0,001**</b>
	W4						<b>0,002**</b>

p>0,05 razlika nije značajna, 0,01<p<0,05 razlika je značajna (\*), p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Prosečan vijabilitet ćelija povećavao se statistički značajno sa prolongiranjem vremena inkubacije (tabele 23 i 24) kod uzoraka u kojima su bile prisutne ispitivane dentalne legure, osim kod uzorka W8. Porast od 24h do 48h i od 24h do 72h bio je značajan kod svih ispitivanih uzoraka, osim kod uzorka legure Wiron 99 livene osam puta. Produžetkom vremena inkubacije od 48h na 72h došlo je do statistički značajne promene u kontrolnom uzorku i uzorku D8. To znači da se vijabilitet ćelija značajno menja do 48h, a posle toga promena je bila slabija, što je posledica eksperimentalnih limita, tj. gustine ćelijske kulture.

Tabela 24. Rezultati testiranja razlika prosečnog vijabiliteta L929 ćelija utvrđenog testom kisele fosfataze, pri različitoj dužini inkubacije kontrolnog uzorka i uzoraka ispitivanih dentalnih legura, livenih različit broj puta

Ispitivani uzorak	ANOVA za vezana merenja		t-test za vezana merenja					
	F	p	24h/48h		24h/72h		48h/72h	
			t	p	t	p	t	p
K	434,660	<0,001**	-16,095	0,001**	-33,520	0,001**	-9,431	0,001**
D1	131,925	0,001**	-10,502	0,001**	-21,095	<0,001**	-0,723	0,510
D4	199,671	<0,001**	-19,660	<0,001**	-21,500	<0,001**	-0,208	0,845
D8	991,886	<0,001**	-29,788	<0,001**	-33,232	<0,001**	-24,672	<0,001**
W1	48,909	<0,001**	-12,014	<0,001**	-8,715	<0,001**	1,000	0,374
W4	11,295	0,005**	-5,426	0,006**	-6,043	0,004**	-0,233	0,827
W8	0,453	0,651	-0,417	0,698	-0,885	0,426	-0,597	0,583

p>0,05 razlika nije značajna, p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Sumiranjem rezultata dobijenih uporednom analizom primenjenih testova vijabiliteta može se zaključiti da je prisustvo svih dentalnih uzoraka dovelo do prvobitnog toksičnog šoka, manifestovanog sniženom respiracijom ćelija i konsekventnog pada u broju vijabilnih ćelija svih testiranih uzoraka. Za razliku od ćelija gajenih u prisustvu D uzoraka, toksični uticaj W uzoraka, manifestovan intenzivnijim smanjenjem broja živih ćelija u kulturi je bio perzistentan i intenziviran sa povećanjem broja topljenja i livenja. Toskičnost D uzoraka je inicijalno manja od W uzoraka i za razliku od njega, ponovljena topljenja i livenja ne potenciraju citotoksičnost ove legure.

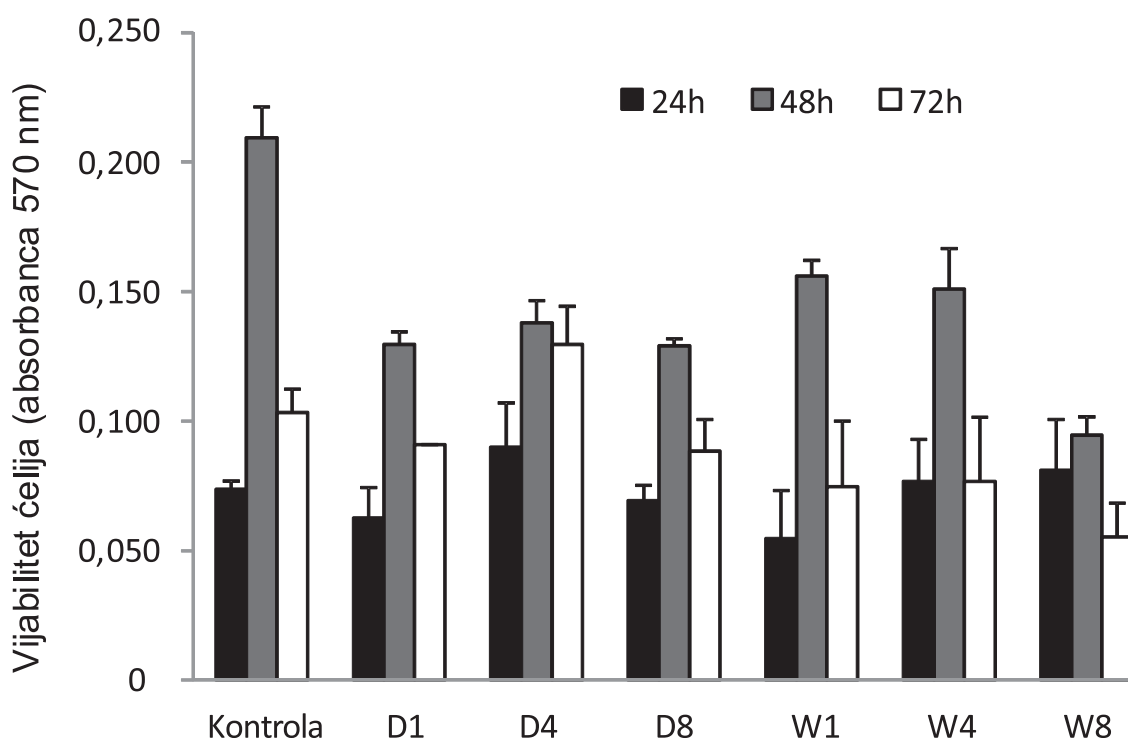
### 5.5.2. Rezultati testova za ispitivanje vijabiliteta na MRC-5 ćelijama

Imajući u vidu da su gore navedeni rezultati dobijeni na maligno transformisanoj liniji mišjeg porekla, te i činjenicu da osetljivost ovih ćelija može biti različita od odgovarajućih primarnih ćelija, bilo je potrebno ispitati njihov uticaj na primarnu kulturu fibroblasta humanog porekla, kako bi što bolje simulirali realno okruženje u koje bi materijal bio aplikovan.

Za potrebe ovog testa MRC-5 ćelije su kultivisane u trajanju od 24, 48 i 72h, a vijabilitet je izmeren MTT testom i testom kisele fosfataze.

### 5.5.2.1. Rezultati ispitivanja vijabiliteta pomoću MRC-5 ćelija MTT testom

Inkubacija MRC-5 ćelija u trajanju od 24h nije u značajnoj meri promenila ukupnu respiraciju po kulturi što je ukazalo na činjenicu da je vijabilnost ćelija bila postojana u svim ispitivanim uzorcima te i da prisustvo dentalnih materijala nije detektabilno uticalo na broj živih ćelija u kulturama izloženim uticaju legura (slika 28). U sledećih 24h respiracija izmerena u kulturama izloženim dentalnim legurama je neselektivno bila snižena u poređenju sa kontrolnim uzorkom ukazujući na to da je proliferativni potencijal ćelija značajno kompromitovan prisustvom D i W uzoraka legura. Potom, inhibitorski efekat bio je najizraženiji kod ćelija izloženih uzorku W8. I konačno, analiza rezultata dobijenih nakon 72h kultivacije podržava prethodno zaključeno, uz jedno zapažanje: proliferativni potencijal same kontrole nakon trodnevne kultivacije, značajno je opao u poređenju sa onim koji je izmeren nakon 48h, što je najverovatnije uzrokovano gustinom kulture ćelija i svojstvom kontaktne inhibicije (slika 28).



Slika 28. Efekat uzoraka ispitivanih dentalnih legura D1, D4, D8, W1, W4 i W8 na MRC-5 ćelije detektovan MTT testom

*Statistička obrada podataka dobijenih MTT testom*

Statistička obrada podataka prikazana je u tabeli 25. Ovim testom su dobijeni homogeniji podaci za sve kolonije ćelija primarnih humanih fibroblasta u odnosu na rezultate za L929 ćelije. I u ovom slučaju, podaci za vijabilitet ćelija su bili najhomogeniji u kontrolnom uzorku. Posle 24h inkubacije najheterogeniji su bili rezultati za uzorak u kojem je korišćena legura Wiron 99 jedanput livena ( $c_v=33,99\%$ ), a posle 48h za uzorak sa prisustvom testiranog uzorka legure D4 ( $c_v=37,45\%$ ).

Tabela 25. Osnovni statistički pokazatelji vijabiliteta ćelija primarnih humanih fibroblasta (MRC-5) na osnovu MTT testa

Vreme inkubacije	Ispitivani uzorci	Br. ponav. (n)	Aritmetička sredina	Medijana	Stand. devijacija	Koeficijent varijacije (%)	Stand. greška
24h	K	3	0,074	0,075	0,003	4,364	0,002
	D1	3	0,063	0,065	0,012	18,632	0,007
	D4	3	0,090	0,090	0,017	18,889	0,010
	D8	3	0,069	0,067	0,006	8,451	0,003
	W1	3	0,055	0,060	0,019	<b>33,994</b>	0,011
	W4	3	0,077	0,085	0,016	21,126	0,009
	W8	3	0,081	0,084	0,020	24,287	0,011
48h	K	3	0,209	0,204	0,012	5,699	0,007
	D1	3	0,144	0,133	0,025	17,609	0,015
	D4	3	0,114	0,132	0,043	<b>37,453</b>	0,025
	D8	3	0,145	0,131	0,028	19,162	0,016
	W1	3	0,156	0,159	0,006	3,899	0,004
	W4	3	0,132	0,140	0,035	26,287	0,020
	W8	3	0,095	0,094	0,007	7,419	0,004
72h	K	3	0,103	0,108	0,009	8,674	0,005
	D1	3	0,074	0,091	0,029	<b>38,835</b>	0,017
	D4	3	0,105	0,119	0,044	<b>41,633</b>	0,025
	D8	3	0,088	0,085	0,012	13,972	0,007
	W1	3	0,075	0,070	0,025	<b>33,917</b>	0,015
	W4	3	0,077	0,090	0,025	<b>32,408</b>	0,014
	W8	3	0,055	0,056	0,013	23,517	0,008

Prema rezultatima Kruskal-Wallis-ove analize varijanse (tabela 26) može se zaključiti da se u analiziranim ćelijama primarnih humanih fibroblasta (MRC-5) vijabilitet utvrđen MTT testom značajno ( $p=0,048$ ) razlikovao samo posle 48h inkubacije u kontroli i uzorcima sa prisutnim dentalnim legurama. Kao što su pokazali rezultati Mann-Whitney U-testa (tabela 26), ta razlika je nastala zbog značajne razlike između kontrolnog uzorka i svih ostalih uzoraka, kao i uzorka sa W8 u odnosu na uzorke D1, D8 i W1. Posle 24h inkubacije značajno se razlikovao broj živih ćelija u kulturi sa prisutnim uzorkom legure W1 prema vijabilitetu u kontrolnom uzorku i kod ćelija gajenih u prisustvu D4. Na kraju inkubacionog perioda od 72h vijabilitet ćelija u kontrolnoj grupi bio je značajno veći nego u uzorcima D1, W4 i W8, a značajno se razlikovao i u uzorcima sa prisutnim uzorcima legura D8 i W8.

Na učešće živih ćelija u kulturi najviše je uticao broj topljenja i livenja legure Dentalit C posle 24h ( $p=0,061$ ), a najmanje posle 48h ( $p=0,875$ ), tabela 26. Efekat broja topljenja i livenja legure Wiron 99 na vijabilitet ćelija najjače se ispoljio posle kultivacije od 48h ( $p=0,099$ ), a najslabije posle 72h ( $p=0,430$ ).

Tabela 26. Rezultati Kruskal Wallis-ove analize varijanse za poređenje vijabiliteta ćelija primarnih humanih fibroblasta (MRC-5) inkubiranih 24, 48 i 72h u prisustvu različitih uzoraka legura, na osnovu rezultata MTT testa

Vreme inkubacije	Ispitivani uzorak	H-vrednost	p (nivo značajnosti)
24h	K,D1,D4,D8,W1,W4 i W8	8,080	0,232
	D1, D4 i D8	5,600	0,061
	W1, W4 i W8	2,084	0,353
48h	K,D1,D4,D8,W1,W4 i W8	12,675	<b>0,048*</b>
	D1, D4 i D8	0,267	0,875
	W1, W4 i W8	4,622	0,099
72h	K,D1,D4,D8,W1,W4 i W8	8,823	0,184
	D1, D4 i D8	1,156	0,561
	W1, W4 i W8	1,689	0,430

$p>0,05$  razlika nije značajna,  $0,01<p<0,05$  razlika je značajna (\*)

Tabela 27. Nivoi značajnosti razlika vijabiliteta ćelija primarnih humanih fibroblasta (MRC-5), na osnovu MTT testa, nakon perioda inkubacije od 24, 48 i 72h legura Dentalit C i Wiron 99, topljenih i livenih jedan, četiri i osam puta, na bazi Mann-Whitney U-testa

Vreme inkubacije	Ispitivani uzorci	D 1	D 4	D 8	W 1	W 4	W 8
24h	K	0,1266	0,2752	0,3758	<b>0,0495*</b>	0,5127	0,5127
	D1		0,1266	0,5127	0,5127	0,2752	0,2752
	D4			0,1266	<b>0,0495*</b>	0,2752	0,5127
	D8				0,2752	0,5127	0,5127
	W1					0,2752	0,1840
	W4						0,8273
48h	K	<b>0,0495*</b>	<b>0,0495*</b>	<b>0,0495*</b>	<b>0,0495*</b>	<b>0,0495*</b>	<b>0,0495*</b>
	D1		0,5127	0,8273	0,5127	0,8273	<b>0,0495*</b>
	D4			0,8273	0,0495	0,5127	0,5127
	D8				0,5127	0,8273	<b>0,0495*</b>
	W1					0,5127	<b>0,0495*</b>
	W4						0,1266
72h	K	<b>0,0495*</b>	0,5127	0,1266	0,1266	<b>0,0495*</b>	<b>0,0495*</b>
	D1		0,2752	0,8273	0,8273	0,8273	0,5127
	D4			0,5127	0,2752	0,2752	0,1266
	D8				0,3758	0,8273	<b>0,0495*</b>
	W1					0,8273	0,2752
	W4						0,2752

$p>0,05$  razlika nije značajna,  $0,01<p<0,05$  razlika je značajna (\*)

Na osnovu rezultata Friedman-ove analize varijanse (tabela 28) utvrđen je statistički značajan ( $p=0.049$ ) uticaj dužine inkubacije na vijabilitet ćelija u kontrolnom uzorku i uzorku D8. Rezultati pojedinačnog Wilcoxon-ovog testa ekvivalentnih parova ne ukazuju na značajnu promenu učešća živih ćelija između dva perioda inkubacije.

Zaključci na bazi rezultata ova dva testa nisu saglasni. To se može objasniti činjenicama da su nivoi značajnosti Friedman-ove analize varijanse vrlo blizu graničnog, da su uzorci mali i da su podaci u njima homogeni ( $c_v < 30\%$ ). S obzirom na homogenost podataka samo u ova dva uzorka za njihovu analizu je bolje koristiti parametarsko testiranje.

Prema parametarskom modelu analize varijanse za ponovljena merenja razlike u vijabilitetu utvrđenom prilikom tri merenja su još značajnije ( $p \leq 0,009$ ).

Rezultati za t-test za zavisne uzorke govore da se vijabilitet ćelija u kontrolnom uzorku posle 48h inkubacije vrlo značajno razlikovao u odnosu na vrednosti posle 24h ( $p=0,002$ ) i 72h ( $p=0,004$ ), dok je razlika vijabiliteta ćelija posle 24h i posle 72h statistički značajna ( $p=0,044$ ). U prisustvu uzoraka legure Dentalit C postignut je statistički značajno različit ( $p=0,028$ ) vijabilitet ćelija u toku kultivacije od 48h i 72h.

Tabela 28. Rezultati testiranja razlika, na osnovu MTT testa utvrđenog vijabiliteta ćelija primarnih humanih fibroblasta (MRC-5) u kontroli i u kulturi i u prisustvu uzoraka dentalnih legura Dentalit C i Wiron 99, topljenim i livenim jedan, četiri i osam puta, u različitim inkubacionim periodima

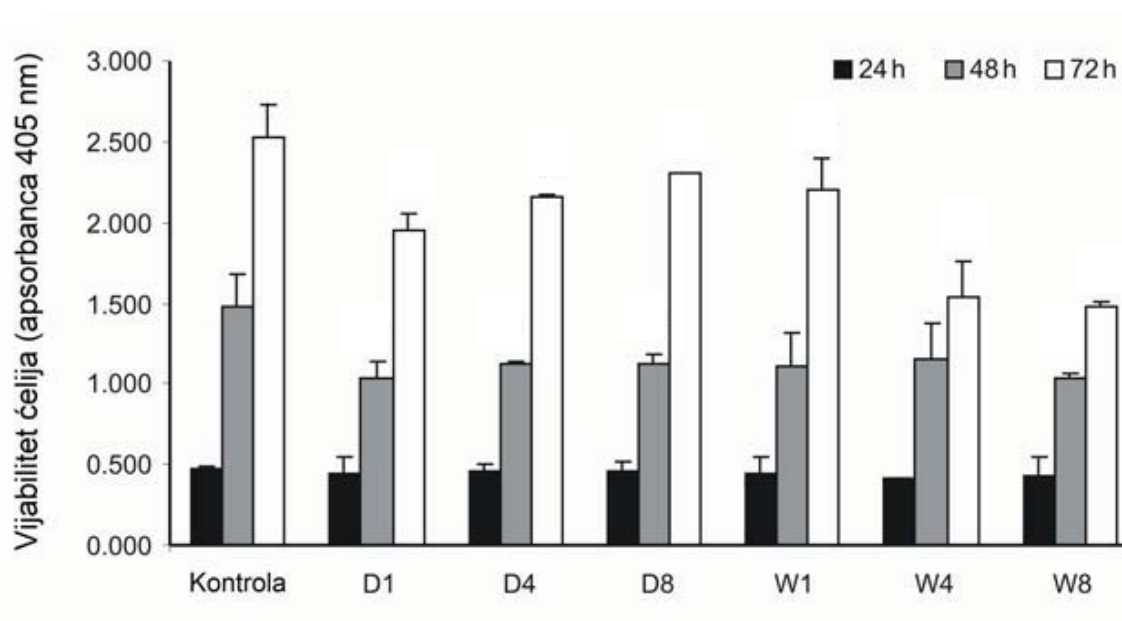
Ispitivani uzorak	Friedman-ova ANOVA		Wilcoxon-ov test ekvivalentnih parova					
			24h/48h		24h/72h		48h/72h	
	$\chi^2$	P	Z	p	Z	P	Z	P
K	6,000	<b>0,049*</b>	1,604	0,109	1,604	0,109	1,604	0,109
D1	4,667	0,097	1,604	0,109	0,535	0,593	1,604	0,109
D4	0,666	0,717	1,069	0,285	1,069	0,285	0,535	0,593
D8	6,000	<b>0,049*</b>	1,604	0,109	1,604	0,109	1,604	0,109
W1	4,667	0,097	1,604	0,109	1,069	0,285	1,604	0,109
W4	4,667	0,097	1,604	0,109	0,000	1,000	1,604	0,109
W8	2,667	0,264	0,535	0,593	1,604	0,109	1,604	0,109

$p > 0,05$  razlika nije značajna,  $0,01 < p < 0,05$  razlika je značajna (\*)

### 5.5.2.2. Rezultati ispitivanja vijabiliteta pomoću MRC-5 ćelija testom kisele fosfataze

Obzirom na ograničenu pouzdanost MTT testa, MRC-5 ćelije su kultivisane u trajanju od 24, 48 i 72h, a vijabilitet je evaluiran alternativnim testom za detekciju vijabiliteta - testom kisele fosfataze

Uopšteno, za razliku od L929 ćelija, u kulturama MRC-5 ćelija kultivisanih 24h u prisustvu uzoraka ispitivanih dentalnih legura, nije postojala razlika u odnosu na vijabilnost relevantne kontrole. U narednih 24h kultivacije primećuje se statistički značajno smanjenje u broju vijabilnih MRC-5 ćelija izloženih uzorcima Ni-Cr legure (Wiron 99), kao i Co-Cr legure (Dentalit C), slika 29. Po isteku 72h, međutim, primetan je kontinuitet u padu broja vijabilnih primarnih fibroblasta u prisustvu uzoraka Ni-Cr legure (Wiron 99), a efekat je intenziviran sa povećanjem broja topljenja i livenja (slika 29). Nasuprot tome, nakon ne velikog, ali statistički značajnog pada vijabiliteta u kulturama izloženim delovanju uzoraka Co-Cr (Dentalit C) nakon 48h, preživele ćelije nastavljaju neometano da se dele, te je i evidentno da je njihov proliferativni potencijal u poslednjih 24h kultivacije potpuno uporediv sa onim koji se uočava u kontrolama. Proliferacioni kapacitet ćelija kultivisanih na uzorcima Ni-Cr (Wiron 99) legure znatno je niži u poređenju sa kontrolnim uzorkom, što može biti uzrokovano gubitkom deobnog kapaciteta ovih ćelija, ali i manjim brojem ćelija koje proliferišu.



Slika 29. Efekat uzoraka ispitivanih dentalnih legura D1, D4, D8, W1, W4 i W8 na MRC-5 ćelije testom kisele fosfataze



*Statistička obrada podataka dobijenih testom kisele fosfataze*

Sa produžetkom vremena kultivacije povećavao se vijabilitet ćelija u svim uzorcima. Posle kontrole najveći porast je bio u prisustvu uzorka D8, a najmanji u prisustvu uzorka W8 (tabela 29). Podaci za sve uzorke su bili homogeni ( $c_v < 30\%$ ), pa su analizirani na bazi parametarskih testova.

Tabela 29. Osnovni statistički pokazatelji vijabiliteta ćelija primarnih humanih fibroblasta (MRC-5) određeni testom kisele fosfataze, za različite periode inkubacije

Vreme inkubacije	Ispitivani uzorak	Br. ponav. (n)	Aritmetička sredina	Stand. Devijacija	Koeficijent varijacije ( $c_v$ u %)	Stand. Greška
24h	K	3	0,732	0,008	1,105	0,005
	D1	3	0,698	0,017	2,415	0,010
	D4	3	0,713	0,026	3,578	0,015
	D8	3	0,707	0,004	0,589	0,002
	W1	3	0,693	0,006	0,916	0,004
	W4	3	0,666	0,054	8,149	0,031
	W8	3	0,685	0,032	4,643	0,018
48h	K	3	1,730	0,014	0,818	0,008
	D1	3	1,230	0,140	11,399	0,081
	D4	3	1,384	0,039	2,837	0,023
	D8	3	1,385	0,059	4,274	0,034
	W1	3	1,373	0,101	7,338	0,058
	W4	3	1,294	0,191	14,773	0,110
	W8	3	1,288	0,114	8,822	0,066
72h	K	3	2,605	0,063	2,429	0,037
	D1	3	2,187	0,096	4,368	0,055
	D4	3	2,104	0,014	0,649	0,008
	D8	3	2,363	0,279	11,795	0,161
	W1	3	2,283	0,239	10,480	0,138
	W4	3	1,972	0,275	13,928	0,159
	W8	3	1,402	0,038	2,710	0,022

U cilju utvrđivanja zavisnosti vijabiliteta ćelija od uticaja uzoraka dentalnih legura i perioda inkubacije eksperimentalni rezultati su analizirani modelom kombinovane dvofaktorske analize varijanse. Dobijeni rezultati (tabela 30) ukazuju da se prosečan vijabilitet ćelija između sedam ispitivanih uzoraka, kao i za različito vreme trajanja inkubacije vrlo značajno razlikuje ( $p < 0,001$ ). Takođe, razlike u broju živih ćelija nastale pod dejstvom interakcije faktora uzorak i faktora vreme inkubacije su statistički vrlo značajne ( $p < 0,001$ ). Na osnovu vrednosti parcijalnog eta kvadrata može se zaključiti da posmatrani faktori i njihova interakcija imaju jak uticaj (82-99%) na vijabilitet ćelija primarnih humanih fibroblasta (MRC-5) određen testom kisele fosfataze.

Tabela 30. Rezultati kombinovane dvofaktorske analize varijanse vijabiliteta ćelija primarnih humanih fibroblasta (MRC-5) određenog testom kisele fosfataze

Izvor varijabiliteta	Stepeni slobode	F	P	Parcijalni eta kvadrat
Uzorak	6	10,602	< <b>0,001</b> **	0,820
Vreme inkubacije	2	1086,599	< <b>0,001</b> **	0,987
Uzorak x vreme inkubacije	12	12,438	< <b>0,001</b> **	0,842

p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Tek posle 48h od početka eksperimenta, prosečan vijabilitet ćelija primarnih humanih fibroblasta (MRC-5) određen testom kisele fosfataze, statistički vrlo značajno se razlikovao između svih ispitivanih uzoraka posmatranih istovremeno (tabela 31, p=0,002), kao i kasnije (p<0,001). Razlike između prosečnog broja živih ćelija u kulturama u kojima su bili prisutni ispitivani uzorci legure Dentalit C nisu bile značajne do kraja eksperimenta. Uzorci u kojima je korišćena legura Wiron 99 nisu se značajno razlikovali po broju živih ćelija u prva dva dana. Međutim, na kraju trećeg dana, razlike su bile vrlo značajne (tabela 31). Pri tom, utvrđen je vrlo značajan efekat ponavljanja livenja legure Wiron 99, već posle 48 časova, što nije slučaj sa legurom Dentalit C.

Tabela 31. Rezultati analize varijanse vijabiliteta ćelija primarnih humanih fibroblasta (MRC-5) određene testom kisele fosfataze za različite grupe ispitivanih uzoraka, pri različitoj dužinu izloženosti uzoraka dejstvu ispitivanih dentalnih legura i kontrole

Vreme inkubacije	Ispitivani uzorak	F-vrednost	p (nivo značajnosti)	Parcijalni eta kvadrat
24 časa	K,D1,D4,D8,W1,W4 i W8	1,873	0,156	0,445
	D1, D4 i D8	0,517	0,621	0,147
	W1, W4 i W8	0,451	0,657	0,131
48 časova	K,D1,D4,D8,W1,W4 i W8	6,680	<b>0,002</b> **	0,741
	D1, D4 i D8	2,887	0,132	0,490
	W1, W4 i W8	0,340	0,725	0,102
72 časa	K,D1,D4,D8,W1,W4 i W8	13,400	< <b>0,001</b> **	0,852
	D1, D4 i D8	1,811	0,242	0,376
	W1, W4 i W8	13,388	<b>0,006</b> **	0,817

p>0,05 razlika nije značajna, p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Posle 24h inkubacije prosečan broj živih ćelija gajenih u prisustvu dentalne legure W4 bio je značajno (p=0,048) niži od vijabiliteta u kulturi sa prisutnom legurom D4 i vrlo značajno (p=0,009) niži u odnosu na kontrolu (tabela 32). Na kraju drugog dana kultivacije vijabilitet ćelija u kontrolnom uzorku bio je vrlo značajno veći nego u uzorcima sa prisutnim ispitivanim dentalnim legurama. Posle 72h prosečan vijabilitet ćelija kultivisanih u kontrolnoj

grupi nije se statistički značajno razlikovao od vijabiliteta u uzorku u kojem je korišćen uzorak D8. Suprotno kontrolnom uzorku, broj živih ćelija kultivisanih u prisustvu legure W8 bio je vrlo značajno manji u odnosu na ostale uzorke. Na kraju trećeg dana utvrđena je i statistički značajna razlika u broju živih MRC-5 ćelija između uzoraka D8 i W4.

Tabela 32. Nivoi značajnosti razlika vijabiliteta ćelija primarnih humanih fibroblasta (MRC-5) utvrđenim testom kisele fosfataze pri različitim trajanju inkubacije u kontrolnom uzorku i uzorcima legura Dentalit C i Wiron 99, topljenih i livenih jedan, četiri i osam puta, na bazi t-testa

Vreme inkubacije	Ispitivani uzorci	D 1	D 4	D 8	W 1	W 4	W 8
24h	K	0,149	0,407	0,284	0,101	<b>0,009**</b>	0,049
	D1		0,513	0,687	<b>0,822</b>	0,157	0,542
	D4			0,799	0,383	<b>0,048**</b>	0,216
	D8				0,532	0,077	<b>0,317</b>
	W1					0,226	0,698
	W4						0,399
48h	K	<b>&lt;0,001**</b>	<b>0,002**</b>	<b>0,002**</b>	<b>0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
	D1		0,109	0,107	0,134	0,489	0,531
	D4			0,991	0,904	<b>0,333</b>	0,303
	D8				0,895	0,328	<b>0,298</b>
	W1					0,393	0,359
	W4						0,948
72h	K	<b>0,013*</b>	<b>0,004**</b>	0,122	<b>0,045*</b>	<b>0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>
	D1		0,583	0,248	<b>0,523</b>	0,165	<b>&lt;0,001**</b>
	D4			0,099	0,243	<b>0,381</b>	<b>&lt;0,001**</b>
	D8				0,590	<b>0,018*</b>	<b>&lt;0,001**</b>
	W1					0,052	<b>&lt;0,001**</b>
	W4						<b>0,002**</b>

p>0,05 razlika nije značajna, 0,01<p<0,05 razlika je značajna (\*), p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Na osnovu rezultata analize varijanse za vezana merenja (tabela 33), broj živih ćelija u svim uzorcima vrlo značajno se razlikovao između 24, 48 i 72h kultivacije. U kontrolnom uzorku, kao i u svim uzorcima u kojima su korišćene dentalne legure, posle 48h kultivacije vijabilitet ćelija je bio značajno ili vrlo značajno veći u odnosu na vijabilitet ćelija nakon 24h, a nakon 72h sve razlike u vijabilnosti ćelija bile su statistički vrlo značajne. Između 48h i 72h kultivacije značajno ili vrlo značajno je promenjen vijabilitet ćelija u svim uzorcima, osim kod uzorka W8.

Tabela 33. Rezultati testiranja razlika prosečnih vrednosti ispitivanja vijabiliteta ćelija testom kisele fosfataze na primarnim humanim fibroblastima (MRC-5), pri različitoj dužini inkubacije uzoraka ispitivanih dentalnih legura, različit broj puta topljenih i livenih i kontrole

Ispitivan uzorak	ANOVA za vezana merenja		t-test za vezana merenja					
	F	p	24h/48h		24h/72h		48h/72h	
			t	p	t	p	t	P
K	1675,710	<0,001**	-77,799	<0,001**	-57,903	<0,001**	-19,883	0,003
D1	265,226	<0,001**	-6,609	0,022*	-31,630	0,001**	-14,793	0,005
D4	1247,12	<0,001**	-18,619	0,003**	-78,713	<0,001**	-26,868	0,001
D8	97,717	<0,001**	-21,166	0,002**	-10,416	0,009**	-7,675	0,017
W1	98,845	<0,001**	-11,508	0,007**	-11,219	0,008**	-7,418	0,018
W4	79,579	0,001	-7,668	0,017*	-10,164	0,010*	-7,169	0,019
W8	126,450	<0,001**	-9,604	0,011*	-23,496	0,002**	-2,452	0,13

zoraka ispitivanih dentalnih legura, različit broj puta pretopljenih i kontrole  
 $p > 0,05$  razlika nije značajna,  $0,01 < p < 0,05$  razlika je značajna (\*),  $p < 0,01$  razlika je vrlo značajna (\*\*)

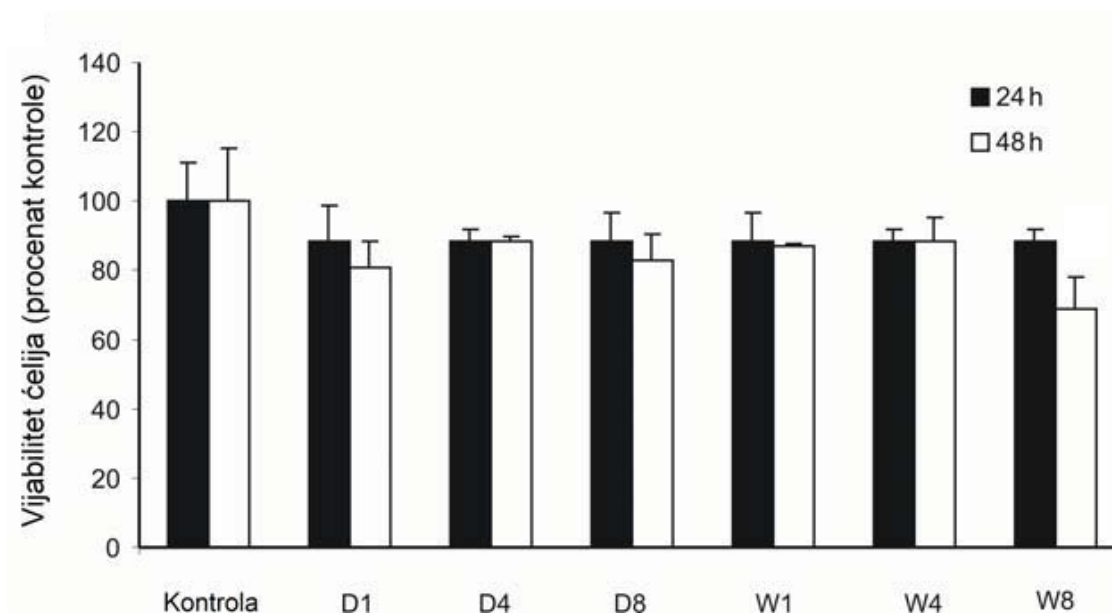
### 5.5.3. Rezultati testova za ispitivanje vijabiliteta na PBMC

Kako se može očekivati da u odgovoru na dentalni materijal uzmu učešće i ćelije imunskog sistema, te i da iste u određenom trenutku mogu doći u kontakt sa njim, analiziran je uticaj ovih materijala na vijabilnost mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravog donora.

#### 5.5.3.1. Rezultati testova za ispitivanje vijabiliteta na PBMC testom kisele fosfataze

Nakon što su izolovane iz krvi zdravog donora, ove ćelije su izložene uticaju dentalnih materijala u trajanju od 24 i 48h, a njihov vijabilitet je određivan testom kisele fosfataze. Ove ćelije su niskoproliferativne u odsustvu spoljašnjeg stimulusa često ulaze u spontanu apoptozu pri prolongiranoj inkubaciji, tako da je njihova vijabilnost merena u manjem vremenskom opsegu u odnosu na pređašnje tipove ćelija. Obzirom da je uticaj materijala na proliferativni potencijal ćelija pod ovakvim okolnostima nemerljiv, rezultati su predstavljeni kao procenat kontrole. Kako se jasno vidi na slici 30, nije postojala značajna razlika u vijabilnosti ćelija tokom prvih 24h kultivacije u prisustvu svih ispitivanih uzoraka dentalnih legura (slika 30) u poređenju sa kontrolom. Nakon 48h, statistički značajan pad u broju živih ćelija u kulturi uočen je samo u prisustvu uzorka W8 (slika 30).

Slika 30. Efekat uzoraka ispitivanih dentalnih legura D1, D4, D8, W1, W4 i W8 na PBMC ćelije detektovan testom kisele fosfataze



*Statistička obrada podataka dobijenih testom kisele fosfataze*

Broj živih mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) utvrđenim testom kisele fosfataze smanjen je u svim ispitivanim uzorcima sa produžetkom vremena inkubacije od 24h na 48h (tabela 34). Podaci dobijeni za pojedinačne uzorke su bili homogeni ( $c_v < 30\%$ ), pa su analizirani parametarskim statističkim testovima.

Tabela 34. Osnovni statistički pokazatelji vijabiliteta mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) utvrđenim testom kisele fosfataze, izloženih dejstvu dentalnih legura Dentalit C i Wiron 99 u trajanju od 24 i 48h

Vreme inkubacije	Ispitivani uzorak	Br. ponav. (n)	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije (%)	Standardna greška
24h	K	3	2,682	0,258	9,619	0,149
	D1	3	2,630	0,249	9,457	0,144
	D4	3	2,862	0,070	2,442	0,040
	D8	3	2,913	0,197	6,773	0,114
	W1	3	2,631	0,188	7,146	0,109
	W4	3	2,726	0,069	2,518	0,040
	W8	3	2,440	0,076	3,127	0,044
48h	K	3	2,258	0,308	13,645	0,178
	D1	3	1,872	0,150	8,011	0,087
	D4	3	2,023	0,031	1,554	0,018
	D8	3	1,915	0,155	8,116	0,090
	W1	3	1,998	0,009	0,450	0,005
	W4	3	2,026	0,102	5,024	0,059
	W8	3	1,627	0,125	7,707	0,072

Uticaj korišćenih uzoraka legura i dužine njihovog dejstva analiziran je modelom kombinovane analize varijanse. Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 35) može se zaključiti da se broj vijabilnih mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) utvrđeno testom kisele fosfataze vrlo značajno ( $p=0,002$ ) razlikovao između uzoraka, kao i za različito vreme inkubacije ( $p<0,001$ ). Uticaj interakcije posmatranih faktora nije prouzrokovao statistički značajne razlike ( $p=0,266$ ) vijabiliteta između uzoraka. U skladu sa navedenim, parcijalni eta kvadrat ukazuje na vrlo visok stepen zavisnosti vijabiliteta mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) od faktora uzorak legure (73%) i faktora vreme inkubacije (92%).

Tabela 35. Rezultati kombinovane dvofaktorske analize varijanse vijabiliteta PBMC određene testom kisele fosfataze

Izvor varijacija	Stepeni slobode	F	p	Parcijalni eta kvadrat
Uzorak legure	6	6,303	<b>0,002**</b>	0,730
Vreme inkubacije	1	169,569	<b>&lt;0,001**</b>	0,924
Uzorak x vreme inkubacije	6	1,444	0,266	0,382

$p>0,05$  razlika nije značajna,  $p<0,01$  razlika je vrlo značajna (\*\*)

Dalje je izvršena analiza razlike vijabiliteta između svih kolonija i uzoraka sa prisustvom iste dentalne legure metodom jednofaktorske analize varijanse (tabela 36). Dobijeni rezultati ukazuju da se prosečan vijabilitet mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) statistički značajno ne razlikuje kod ispitivanih uzoraka i kontrole posle 24h inkubacije ( $p=0,083$ ), a da se vrlo značajno razlikuje posle 48h inkubacije ( $p=0,009$ ). Takođe, vijabilitet PBMC u prisustvu uzoraka legure Dentalit C različit broj puta livene ne menja se statistički značajno ( $p=0,225$ ) posle 24h inkubacije, kao ni posle 48h ( $p=0,380$ ). Prosečne vrednosti vijabiliteta ćelija posle 24h inkubacije u prisustvu uzoraka legure Wiron 99 topljene i livene različit broj puta ne razlikuju se statistički značajno ( $p=0,073$ ). Međutim, prolongiranjem inkubacije do 48h dolazi do statistički vrlo značajnih razlika u prosečnim vrednostima vijabiliteta ćelija, zavisno od broja topljenja i livenja prisutne legure Wiron 99 ( $p=0,003$ ). Prema vrednostima eta kvadrata na broj živih ćelija slabiji uticaj je ispoljilo prisustvo uzoraka legure Dentalit C (39% i 28%), nego legure Wiron 99 (58% i 85%). Takođe, sa produžetkom vremena inkubacije uticaj legure Dentalit C slabi, a legure Wiron 99 jača (tabela 36).

Tabela 36. Rezultati analize varijanse za poređenje različitih grupa uzoraka mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC), pri različitom periodu inkubacije i prisustvu uzoraka dentalnih legura i kontrole

Vreme inkubacije	Ispitivani uzorak	F-vrednost	P (nivo značajnosti)	Parcijalni eta kvadrat
24h	K,D1,D4,D8,W1,W4 i W8	2,405	0,083	0,508
	D1, D4 i D8	1,936	0,225	0,392
	W1, W4 i W8	4,164	0,073	0,581
48h	K,D1,D4,D8,W1,W4 i W8	4,551	<b>0,009**</b>	0,661
	D1, D4 i D8	1,142	0,380	0,276
	W1, W4 i W8	17,078	<b>0,003**</b>	0,851

p>0,05 razlika nije značajna, 0,01<p<0,05 razlika je značajna (\*), p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Nakon 24h dejstva ispitivanih uzoraka legura, statistički vrlo značajno (p=0,005) se razlikovao vijabilitet mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) samo u uzorcima u kojima su korišćene legure topljene i livene osam puta (tabela 37). Isti uticaj (p=0,995) imale su legure livene jedanput. Povećavanjem broja livenja legura povećavala se razlika između uticaja legura Dentalit C i Wiron 99 na vijabilitet ćelija.

Značajnost uticaja ispitivanih uzoraka posle 48h rezultat je razlike vijabiliteta ćelija u kontroli i uzoraka legura D1, D8 i W8, kao i razlike u uticaju uzorka W8 u odnosu na sve ostale ispitivane uzorke dentalnih legura, osim na uzorak D1 (tabela 37).

Posle 48h kultivacije u prisustvu uzorka legure W8 vijabilitet ćelija je značajno niži u poređenju sa vijabilitetom ćelija izloženih uticaju W1 (p=0,011) i W4 (p=0,007).

Tabela 37. Nivoi značajnosti razlika vijabiliteta mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) utvrđenim testom kisele fosfataze pri različitom trajanju inkubacije u kontrolnom uzorku i uzorcima legura Dentalit C i Wiron 99, livenih jedan, četiri i osam puta, na bazi t-testa

Vreme inkubacije	Ispitivani uzorci	D 1	D 4	D 8	W 1	W 4	W 8
24h	K	0,722	0,234	0,132	0,727	0,768	0,114
	D1		0,130	0,070	<b>0,995</b>	0,518	0,208
	D4			0,727	0,132	<b>0,361</b>	<b>0,011*</b>
	D8				0,071	0,215	<b>0,005**</b>
	W1					0,522	0,206
	W4						0,067
48h	K	<b>0,009**</b>	0,085	<b>0,017*</b>	0,059	0,089	<b>&lt;0,001**</b>
	D1		0,253	0,738	<b>0,337</b>	0,244	0,074
	D4			0,410	0,847	<b>0,979</b>	<b>0,007**</b>
	D8				0,525	0,396	<b>0,039*</b>
	W1					0,826	<b>0,011*</b>
	W4						<b>0,007**</b>

p>0,05 razlika nije značajna, 0,01<p<0,05 razlika je značajna (\*), p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

Prema rezultatima t-testa za vezane uzorke (tabela 38) u odnosu na vrednosti nakon 24h inkubacije, posle 48h inkubacije značajno je opao (smanjen) vijabilitet ćelija u prisustvu svih uzoraka legura, a u kontroli nije.

Tabela 38. Rezultati testiranja uticaja dužine inkubacije u prisustvu uzoraka ispitivanih dentalnih legura na vijabilitet ćelija određen testom kisele fosfataze za mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC), pomoću t-testa za vezane uzorke

Ispitivani uzorak	t-vrednost	p (nivo značajnosti)
K	1,412	0,293
D1	9,945	<b>0,010*</b>
D4	35,607	<b>0,001**</b>
D8	5,274	<b>0,034*</b>
W1	5,602	<b>0,030*</b>
W4	8,033	<b>0,015*</b>
W8	12,052	<b>0,007**</b>

p>0,05 razlika nije značajna  
 0,01<p<0,05 razlika je značajna (\*)  
 p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

U celini, navedeni rezultati jasno ukazuju na to da su Ni-Cr legure (Wiron 99) ispoljili jaču toksičnost na primarnim ćelijama, te i da je ovaj efekat bio proporcionalan broju topljenja i livenja. Dalje, osetljivost mononuklearnih ćelija periferne krvi manja je u poređenju sa primarnim humanim fibroblastima.

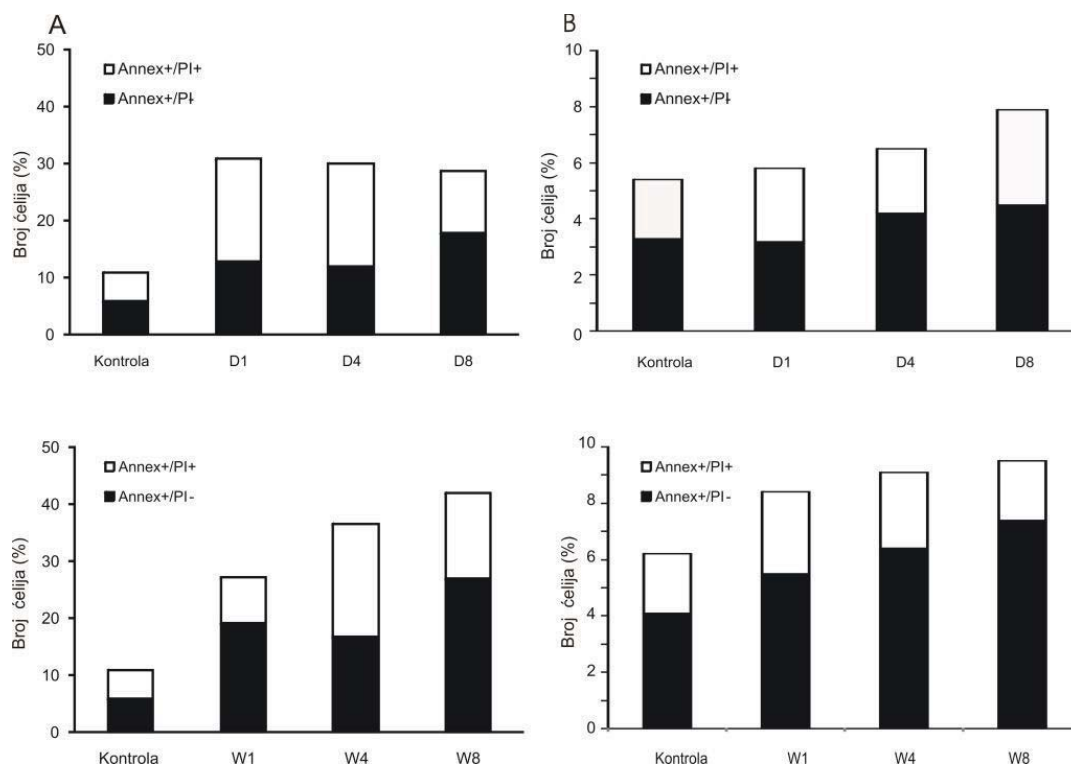
#### 5.5.4. Rezultati određivanja prisustva ćelijske smrti dvostrukim aneksin-propidijum jodid bojenjem

S obzirom na črnjenicu da se kultivacija MRC-5 i PBMC ćelija u prisustvu uzoraka dentalnih legura odrazila na vijabilnost ćelija, bilo je od interesa precizirati koji uzroci su doveli do citotoksične manifestacije. U tu svrhu, navedeni tipovi ćelija su inkubirani sa uzorcima dentalnih legura 48h, a zatim je analizirano prisustvo rano apoptotičnih ćelija označenih kao Ann+PI- i nekrotičnih ćelija označenih kao Ann+PI+, pomoću protočne citofluorimetrije. Povećan broj rano apoptotičnih i nekrotičnih ćelija u kulturama MRC-5 i u PBMC ćelija (slika 31A i 31B) koje su bile izložene uticaju D1, D4, D8 i W1, W4, W8 uočen je nakon 48h kultivacije. U skladu sa pređašnjim rezultatima, prisustvo umirućih ćelija bilo je izraženije kod Ni-Cr uzoraka (W1, W4, W8) u poređenju sa D uzorcima. Paralelno, zastupljenost ćelija označenih kao apoptotične i nekrotične pozitivno je korelirala sa brojem topljenja i livenja kod W uzoraka (slika 31A i 31B).



Dobijeni rezultati su ukazali da je indukcija apoptoze u osnovi pada vijabiliteta primarnih ćelija uzrokovanim dentalnim materijalima. Nekroza je u ovom slučaju najverovatnije sekundarni proces u kome su membrane apoptotičnih ćelija u kulturi izgubile svojstvo permeabilnosti. Akumulacija umirućih ćelija je značajno izraženija kod W uzoraka i pozitivno korelira sa povećanjem broja topljenja i livenja.

Slika 31. Efekat uzoraka ispitivanih dentalnih legura D1, D4, D8, W1, W4 i W8 na pojavu ćelijske smrti apoptozom (A) MRC-5, (B) PBMC



### Statistička obrada dobijenih rezultata

Statistička analiza rezultata prikazana je u tabeli 40. Rezultati  $\chi^2$ -testa ( $\chi^2=4122,32$ ;  $p<0,001$ ) ukazuju da tri subpopulacije ćelija (žive, apoptotične i nekrotične) nisu bile isto zastupljene u kontroli i kulturama MRC-5 ćelija, koje su bile izložene uticaju različitih dentalnih legura (tabela 39).

Odnos živih, rano apoptotičnih i nekrotičnih ćelija razlikovao se vrlo značajno ( $p<0,001$ ) u kulturama u kojima je korišćena legura Dentalit C livena različit broj puta. Daljom analizom odnosa po dva rasporeda ćelija (tabela 39) utvrđeno je da se samo u prisustvu legure Dentalit C livene jedan i četiri puta odnos živih, apoptotičnih i nekrotičnih ćelija nije razlikovao statistički značajno ( $p=0,267$ ).

Učešće živih, apoptotičnih i nekrotičnih ćelije vrlo značajno se razlikovalo ( $p < 0,001$ ) u kulturama MRC-5 ćelija koje su bile izložene uticaju legure Wiron 99 topljene i livene različit broj puta (tabele 39 i 40).

Tabela 39. Rezultati testiranja razlika u zastupljenosti živih, apoptotičnih i nekrotičnih ćelija kod primarnih humanih fibroblasta (MRC-5) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) u različitim grupama uzoraka legura

Uzorci	MRC-5		PBMC	
	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
K, D1, D4, D8, W1, W4 i W8	4122,32	<0,001**	190,825	<0,001**
D1, D4 i D8	406,728	<0,001**	624,110	<0,001**
W1, W4 i W8	858,850	<0,001**	582,249	<0,001**

$p < 0,01$  razlika je vrlo značajna (\*\*)

Tabela 40. Rezultati analize zastupljenosti različitih subpopulacija ćelija primarnih humanih fibroblasta (MRC-5) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC), odnosa živih, apoptotičnih i nekrotičnih

Uzorak		MRC-5		PBMC	
		$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
K	D1	1623,446	<0,001**	123,249	<0,001**
	D4	1564,314	<0,001**	43,825	<0,001**
	D8	1111,284	<0,001**	5,936	0,051
	W1	1011,469	<0,001**	0,581	0,748
	W4	2086,692	<0,001**	33,387	<0,001**
	W8	2662,666	<0,001**	29,291	<0,001**
D1	D4	2,642	0,267	23,882	<0,001**
	D8	305,224	<0,001**	89,860	<0,001**
	W1	584,265	<0,001**	107,032	<0,001**
	W4	64,464	<0,001**	28,574	<0,001**
	W8	481,016	<0,001**	32,779	<0,001**
D4	D8	332,780	<0,001**	31,617	<0,001**
	W1	619,373	<0,001**	34,498	<0,001**
	W4	91,532	<0,001**	2,387	0,304
	W8	548,218	<0,001**	2,483	0,289
D8	W1	50,718	<0,001**	3,913	0,141
	W4	309,053	<0,001**	19,010	<0,001**
	W8	383,017	<0,001**	16,957	<0,001**
W1	W4	568,583	<0,001**	25,177	<0,001**
	W8	516,267	<0,001**	21,633	<0,001**
W4	W8	218,768	<0,001**	0,187	0,911

$p > 0,05$  razlika nije značajna;  $p < 0,01$  razlika je vrlo značajna (\*\*)

Takođe, raspodela subpopulacija PBMC ćelija u svim kulturama posmatranim istovremeno se razlikovala statistički vrlo značajno ( $\chi^2=190,82$ ;  $p < 0,001$ , tabela 40), a vrlo značajno se razlikovalo i učešće ove tri subpopulacije PBMC ćelija u kulturama u kojima je korišćena legura Dentalit C livena različit broj puta. Broj topljenja i livenja legure Wiron 99 odrazio se vrlo značajno na odnos živih, apoptotičnih i nekrotičnih ćelija (tabela 40).

Ako se rano apoptotične i nekrotične ćelije posmatraju zajedno, onda se odnos broja živih prema ukupnom broju apoptotičnih MRC-5 ćelija, kao i PBMC ćelija, vrlo značajno razlikuje se u prisutvu uzoraka D1, D4 i D8, u prisustvu uzoraka W1, W4 i W8 i svim posmatranim ćelijama (K, D1, D4, D8, W1, W4 i W8), tabela 41.

Tabela 41. Rezultati testiranja razlika u zastupljenosti živih i umirućih ćelija kod primarnih humanih fibroblasta (MRC-5) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) u različitim grupama uzoraka

Uzorci	MRC-5		PBMC	
	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
K, D1, D4, D8, W1, W4 i W8	3019,637	<0,001**	119,636	<0,001**
D1, D4 i D8	70,004	<0,001**	51,030	<0,001**
W1, W4 i W8	517,013	<0,001**	22,404	<0,001**

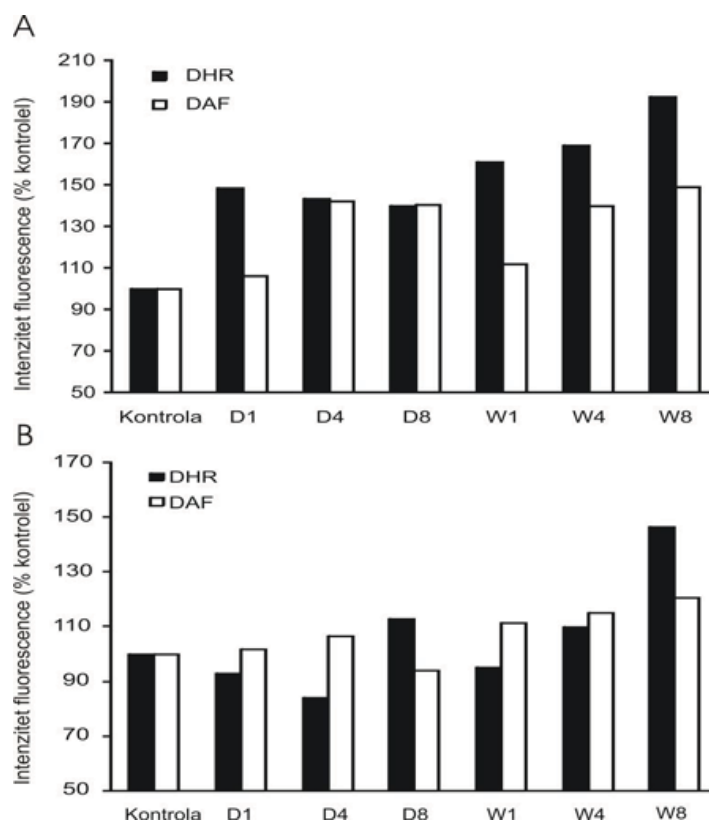
p<0,01 razlika je vrlo značajna (\*\*)

U skladu sa dobijenim rezultatima, prisustvo umirućih ćelija bilo je izraženije kod Ni-Cr legura (W1, W4, W8) u poređenju sa D uzorcima. Paralelno, zastupljenost ćelija označenih kao apoptotične i nekrotične pozitivno je korelirala sa brojem topljenja i livenja kod W uzoraka. Dobijeni rezultati su ukazali da je indukcija apoptoze u osnovi pada vijabiliteta primarnih ćelija uzrokovanim dentalnim materijalima. Citocidni efekat je značajno izraženiji kod W uzoraka i pozitivno korelira sa brojem topljenja i livenja.

### 5.5.5. Rezultati merenja intracelularnog azotmonoksida (NO) i reaktivnih kiseoničnih (ROS) i azotnih (RNS) jedinjenja

Jedna od najbržih reakcija ćelije na toksični stimulus jeste produkcija reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta. Hiperprodukcija ovih jedinjenja uzrokuje ozbiljna unutarćelijska oštećenja i u krajnjoj instanci dovodi do ćelijske smrti. Kako bi se utvrdilo da li su ROS i RNS bar delom odgovorni za citocidni efekat dentalnih legura, određivana je njihova produkcija na unutarćelijskom nivou i to u prvih 24h izlaganja ispitivanim uzorcima. Produkcija visokoreaktivnih kiseoničkih (ROS) i azotnih (RNS) jedinjenja kao i količina endogenog NO, određivana fluorescentnim indikatorima DHR (ROS/RNS) i DAF-FM u citoplazmi MRC-5 i PBMC bila je značajno potencirana prisustvom uzoraka ispitivanih dentalnih legura. Rezultati su prikazani na slici 32 i jasno ukazuju na to da je nivo produkovanog ROS i RNS bio primetno veći u kulturi ćelija izloženih uticaju Ni-Cr uzoraka (W1, W4, W8), slika 32A i 32B. Uopšte uzevši, ranijim rezultatima pokazana toksičnost W uzoraka, kao

i korelacija ovog fenomena sa brojenja topljenja i livenja, u potpunosti je sinhronizovana sa produkcijom reaktivnih jedinjenja u kvantitativnom smislu, čime upućuje na zaključak da je u osnovi niske biološke kompatibilnosti ovog materijala, a posebno svojstava koje stiče topljenjem i livenjem, oksidativni stres.



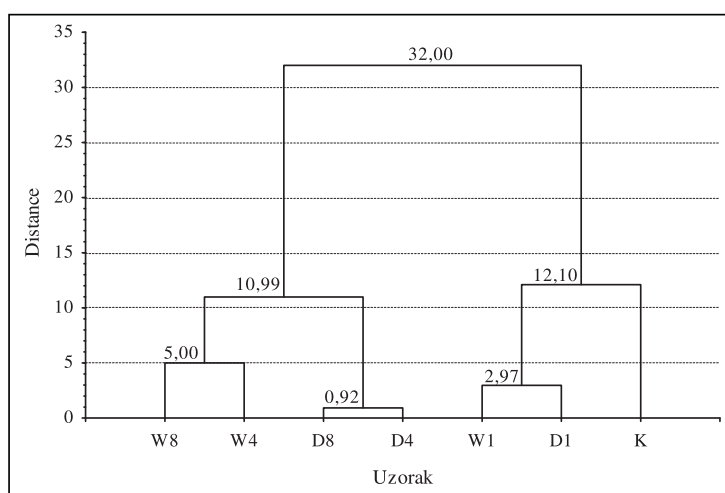
Slika 32. Efekat uzoraka ispitivanih dentalnih legura D1, D4, D8, W1, W4 i W8 na produkciju NO, ROS i RNS, (A) MRC-5, (B) PBMC

Ranijim rezultatima pokazana toksičnost W1, W4 i W8 uzoraka, kao i korelacija ovog fenomena sa brojem topljenja i livenja, sinhronizovana je sa produkcijom reaktivnih jedinjenja, što upućuje na zaključak da je to u osnovi rezultat niske biološke kompatibilnosti ovog materijala, a posebno svojstava koje legura stiče topljenjem i livenjem usled oksidativnog stresa.

#### *Statistička obrada dobijenih rezultata*

Grupisanje MRC-5 i PBMC ćelija na osnovu bliskosti prema produkciji visokoreaktivnih kiseoničnih (ROS) i azotnih (RNS) jedinjenja kao i količini endogenog NO u citoplazmi izvršeno je klaster analizom zasnovanom na Euclid-skim odstojanjima i Ward-ovom metodu povezivanja (slika 33).

Na dendrogramu koji prikazuje sličnost ćelija, izdvajaju se dva klastera prema intenzitetu fluorescence detektovane indikatorima DHR i DAF, u prisustvu različitih uzoraka ispitivanih dentalnih legura (slika 33). Prvi čine ćelije u kojima su bili prisutni uzorci dentalnih legura topljeni i liveni četiri i osam puta, a drugi kontrola i ćelije izložene dejstvu legura livenih jedanput. To ukazuje na sličniju reakciju ćelija sa legurama koje nisu topljene i livene sa kontrolom i da se sa povećavanjem broja livenja legura povećava njihova razlika u odnosu na kontrolu prema produkciji visokoreaktivnih kiseoničnih i azotnih jedinjenja i količini endogenog NO.



Slika 33. Sličnost uzoraka legura Wiron 99 i Dentalit C prema fluorescentnim indikatorima DHR i DAF u citoplazmi MRC-5

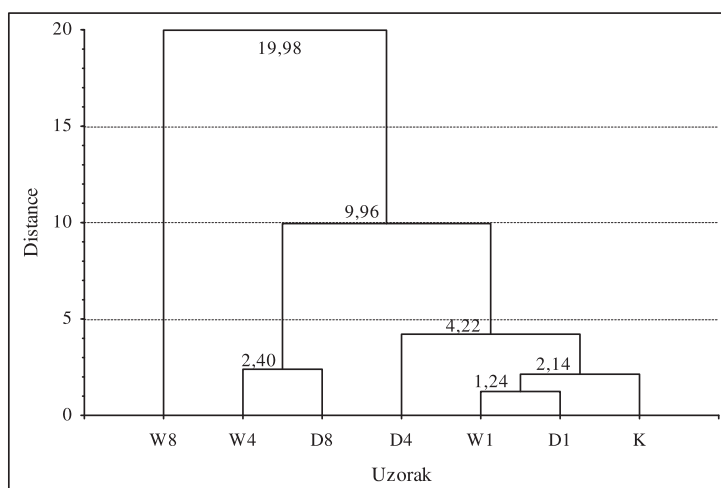
Prema vrednostima Euclid-skih distanci (tabela 42 i slika 32) najbliži intenzitet fluorescence indikatora DHR i DAF imaju kulture izložene uticaju legure Dentalit C livene četiri i osam puta ( $d=0,92$ ), zatim kulture izložene uticaju legura Dentalit C i Wiron 99 livene jedanput ( $d=2,97$ ), pa kulture izložene uticaju legure Wiron 99 livene četiri i osam puta ( $d=5,00$ ). Po sličnosti dalje se grupišu kulture sa prisutnim legurama Dentalit C i Wiron 99 livenem četiri i osam puta (slika 32;  $d=10,99$ ). Kontrola se pridružuje ćelijama sa D1 i W1 na nivou 12,10. Sve ćelije se udružuju na distanci od 32 jedinice.

Tabela 42. Euclid-ske distance između ćelija primarnih humanih fibroblasta (MRC-5) na osnovu intenziteta fluorescence indikatora DHR i DAF

Ispitivani uzorak	D1	D4	D8	W1	W4	W8
K	8,49	15,97	15,08	11,15	17,87	22,79
D1		12,24	11,62	2,97	11,97	16,30
D4			0,92	10,59	4,54	8,75
D8				10,13	5,08	9,53
W1					9,47	13,51
W4						5,00

Prema intenzitetu fluorescentnih indikatora DHR i DAF u citoplazmi PBMC grupisanje (slika 34) nije isto kao kod MRC-5. U ovom slučaju najbližnje su ćelije sa prisutnim jedanput livenim uzorcima dentalnih legura ( $d=1,24$ ), zatim im se pridružuje kontrola na distanci od 2,14 jedinica i kultura izložena dejstvu legure Dentalit C livene četiri puta. Ova grupa ćelija čini jedan klaster (slika 34). U drugom klasteru su ćelije u kojima su bili prisutni uzorci legura D8 i W4. Kultura u kojoj je korišćena legura Wiron 99 topljena i livena osam puta ima toliko različite vrednosti indikatora DHR i DAF da čini zaseban klaster sve do distance od 20 jedinica kada se udružuje sa ostalim.

Sve kulture ćelija primarnih humanih fibroblasta spajaju se u jednu grupu na distanci od 32 jedinice, a sve kulture mononuklearnih ćelija periferne krvi udružuju se u jedan klaster na distanci od 19,98 jedinica, pa se može zaključiti da je efekat legura i broja njihovog topljenja i livenja na produkciju visokoreaktivnih kiseoničnih i azotnih jedinjenja i količinu endogenog NO slabiji kod mononuklearnih ćelija periferne krvi.



Slika 34. Sličnost uzoraka legura Wiron 99 i Dentalit C prema fluorescentnim indikatorima DHR i DAF u citoplazmi PBMC

Od kontrolne kulture najviše odstupa kultura sa prisutnim uzorkom legure W8 (tabela 43). Maksimalno odstojanje između dve kulture mononuklearnih ćelija periferne krvi je između kultura sa prisutnim uzorcima legura D4 i W8.

Tabela 43. Euclid-ske distance između kolonija mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) na osnovu intenziteta fluorescencije indikatora DHR i DAF

Ispitivani uzorak	D1	D 4	D 8	W 1	W 4	W 8
K	2,01	4,49	3,66	1,83	3,18	13,12
D1		2,49	5,66	1,24	4,96	15,07
D4			8,15	3,14	7,25	17,44
D8				5,29	2,40	9,76
W1					4,12	14,31
W4						10,20

## 6. DISKUSIJA

Predmet istraživanja za ovu disertaciju proistekao je iz rezultata magistarskog rada. Rezultati dobijeni ispitivanjem biokompatibilnosti nakon višestrukog topljenja i livenja četiri komercijalne dentalne legure, različitog sastava i namene, otvorili su brojna nova pitanja. U ovoj doktorskoj disertaciji odabrane su dve dentalne legure: Co-Cr (Dentalit C) i Ni-Cr (Wiron 99), koje imaju istu namenu i koriste se za izradu metalokeramičkih krunica i mostova, a u praksi su u upotrebi svakodnevno.

Na kvalitet metalokeramičkih fiksnih nadoknada bitno utiče kvalitet spoja između legure metala i keramike. Dve dentalne legure koje su testirane u ovom radu koriste se za izradu ovakvih nadoknada i iz literature je poznato da višestruko topljenje i livenje Co-Cr i Ni-Cr dentalnih legura značajno utiče na kvalitet metalokeramičkog spoja. Sa povećanjem broja topljenja i livenja debljina metalokeramičkog spoja se smanjuje. Iz tog razloga trajnost metalokeramičke nadoknade može biti kompromitovana, te se višestruko topljenje i livenje dentalnih legura ne preporučuje, Mirković N., M. Draginjac (92).

Trajnost fiksnih nadoknada je zahtev koji ovakve nadoknade moraju da ispune. Na fizičko-mehanički kvalitet protetskih radova, a to je ono što garantuje trajnost, utiču mnogi faktori, među kojima su: način izrade, temperatura zagrevanja i livenja, brzina hlađenja i dr., Bezzon O. L. (16). Ovi faktori utiču na tvrdoću, koja raste sa povećanjem broja topljenja i livenja, na modul elastičnosti, koji opada sa povećanjem broja topljenja i livenja. Sa metalografskog aspekta, može se tumačiti uticaj topljenja i livenja na homogenost i dendritnu strukturu, kao i na veličinu zrna (126). Strogo kontrolisani uslovi livenja, tj., ispravnost postupka topljenja i livenja treba da obezbedi homogenost izlivenih objekata i spreči pojavu mikroporoznosti. Naknadnom termičkom obradom se postiže homogenizacija (127). Strogo kontrolisani uslovi i ispravnost postupka rada sa dentalnim legurama doprinosi kvalitetu izrađenih nadoknada, kako fizičko-mehaničkom, tako i biološkom, Faria A. C. L. (52). Rezultati navedenih radova su u saglasnosti sa rezultatima ove disertacije.

Pri radu sa dentalnim legurama, stomatološki tehničari su skloni da pri izboru dentalne legure daju prednost onoj koja se lakše lije. Neki elementi, kao što je Be, dodaju se dentalnim legurama kako bi im se poboljšala livnost, zanemarujući štetnost Be, Palascar J. (106). Stomatolog ima profesionalnu odgovornost pri izboru dentalnih legura, jer to direktno determiniše koji metali i u kojoj količini, pod određenim uslovima, mogu biti otpušteni u usnu duplju i time izazvati eventualni sistemski efekat. Problem toksičnosti dentalnih legura nije vezan samo za osnovne konstituente, već i za one elemente koji su u dentalnim legurama zastupljeni u manjoj količini ili u tragovima.



U prilog tome govore i radovi koji opisuju da i redovno održavanje higijene zuba pranjem četkicom može dovesti do otpuštanja jona u usnu duplju, Molina C. et al. (93), Nogues L. et al. (100). Wataha J. C. et al. (150) proučavali ovu pojavu na nekoliko dentalnih legura različitog sastava: Au-Pt legura, Au-Pd legura, Pd-Cu-Ga legura i Ni-Cr legura. Uzorci ovih legura potopljani su u biološki medijum 7 dana, kako bi se dovelo u ekvilibrijum otpuštanje elemenata, a zatim su uzorci četkani mekom četkicom za zube brzinom od 90 poteza u minuti i silom od 200gr. Četkanje se odvijalo u neutralnoj i blago kiseloj sredini (pH 4), sa i bez paste za zube. Zatim su uzorci ponovo potopljeni u biološki medijum još 7 dana. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da kiselina i upotreba paste za zube povećava oslobađanje elemenata iz dentalnih legura, a najviše Ni iz Ni-Cr legure čak i do 30 puta. Pri drugom potapanju uzoraka u biološki medijum u trajanju od 7 dana, otpuštanje elemenata bilo je povećano nakon četkanja samo kod Ni-Cr legure, dok je u kiseloj sredini otpuštanje elemenata bilo povećano kod svih testiranih uzoraka dentalnih legura osim Au-Pd legure. Isti autor (146) opisuje efekat pranja zuba na citotoksičnost dentalnih legura *in vitro*. Zaključak ovog rada je da pranje zuba četkicom povećava citotoksičnost dentalnih legura, ali da na to veoma mnogo utiče sastav dentalne legure i uslovi pranja zuba četkicom.

Na trajnost stomatoloških radova utiče i otpornost legure na koroziju. Poznata je koroziona rezistentnost plemenitih metala. Posljednjih godina razvijaju se novi proizvodi na dentalnom tržištu koji imaju za cilj da baznim legurama povećaju otpornost na koroziju dodavanjem plemenitih metala Au, Pt i Ru, (110). Međutim, rezultati nisu bili zadovoljavajući, jer je ovakvim postupkom dobijena heterogena struktura legure, što nije rezultiralo povećanjem, već smanjenjem otpornosti na koroziju.

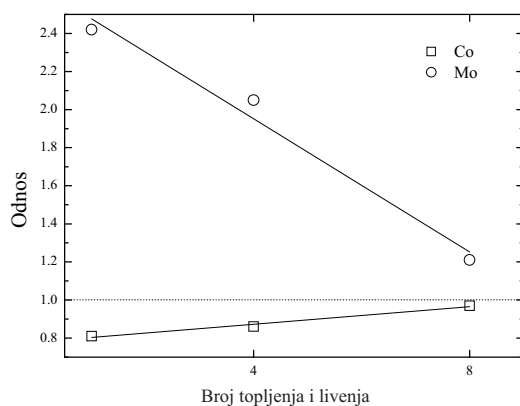
## 6.1. Diskusija rezultata istraživanja

U mnogim državama nižeg ekonomskog standarda, ostaci od livenja pri izlivanju stomatoloških radova se ne bacaju, već se ponovo tope i liju uz dodatak do 50% nove količine legure, (122). Tako dobijeni odlivci imaju nepoznat hemijski sastav i strukturu. Na ovaj način u svakom novom odlivku mogu se naći ostaci od prethodnih izlivanja koji su se nebrojeno puta ponovo reciklirali. U ovom radu imali smo za cilj da detektujemo koje su to promene u sastavu i strukturi više puta topljenih i livenih uzoraka dentalnih legura, šta se dešava sa povećanjem broja topljenje i livenja i da uporedimo dve legure, od kojih je jedna na bazi Ni, a druga ne sadrži Ni. Obe ispitivane legure (Wiron 99 i Dentalit C) imaju veoma široku primenu u stomatološkoj praksi.

Obe legure u sva tri stanja, odnosno nakon određenog broja topljenja i livenja (prvo, četvrto i osmo) pokazuju tipičnu dendritnu strukturu koja je karakteristična za komercijalne livene legure. Čak i pri malim povećanjima se uočava da se dendritna struktura menja u zavisnosti od broja ponovljenog topljenja i livenja. Kod Ni-Cr legure (Wiron 99) intermetalne faze se uočavaju po granicama zrna i u međudendritnom prostoru, a sa povećanjem broja topljenja i livenja uočeno je i prisustvo oksidnih uključaka tipa  $\text{SiO}_2$  što je posledica topljenja u vazduhu. EDX analiza dendrita i međudendritnog prostora nije ukazala na bitne razlike u hemijskom sastavu između ove dve zone, tako da je samo na osnovu površinske EDX analize u centru ispitivanih uzoraka uočeno da se smanjuje sadržaj osnovnog elementa, odnosno nikla. Na malu razliku u koncentraciji elemenata između dendritnog i međudendritnog prostora ukazuje i mala razlika u nivou mikrotvrdoće između ove dve zone koja opada u nizu 66→22→15 MPa.

Kada je u pitanju legura na bazi Co-Cr (Dentalit C), bilo je moguće praćenje razlike u hemijskom sastavu između dve zone dendrit-međudendritni prostor. Sa povećanjem broja ponovljenog topljenja i livenja uočeno je da dolazi do homogenizacije strukture, odnosno do smanjenja razlike u hemijskom sastavu i da je to najuočljivije za elemente Co i Mo (tabela 2, hemijski sastav pojedinih zona), dok ostali praćeni elemente Cr, Fe i Si imaju ranomernu (homegnu) raspodelu u analiziranim zonama.

Ova pojava se zbirno može prikazati pomoću odnosa koncentracije elemenata Co i Mo u međudendritnom prostoru i osnovi uzoraka u zavisnosti od broja pretapanja (slika 35). Ovakav trend ponašanja elemenata Co i Mo navodi na sumnju da bi se nakon devetog, odnosno desetog topljenja i livenja eliminisala razlika u hemijskom sastavu, odnosno ovaj odnos teži vrednosti 1. Takođe se smanjuje razlika u vrednosti mikrotvrdoće između dendrita i međudendritnog prostora u nizu 150→140→110 MPa (slika 35).



Slika 35. Odnos koncentracije Co i Mo u međudendritnom prostoru i osnovi uzoraka u funkciji broja ponavljenih topljenja i livenja.

Svako novo topljenje i livenje povlači za sobom i očvršćavanje, odnosno formiranje novih zrna. Kada je temperatura topljenja i livenja ista kao što je ovde bio slučaj, veličina novoformiranih zrna zavisi od koncentracije novoformiranih nukleusa (8). Generalno, nečistoće mogu da olakšaju nukleaciju zrna i smanje veličinu zrna, odnosno ponavljano topljenje i livenje uslovljava povećanje makrotvrdoće, ali u ovom slučaju makrotvrdoća se neznatno smanjuje sa povećanjem broja topljenja i livenja. Može se zaključiti da osobine mnogo više zavise od tipa i strukture formiranih faza nego od hemijskog sastava i veličine zrna (42).

Redgenostrukturalna analiza je omogućila praćenje promena u leguri na nano nivou. Svako topljenje i livenje legure uslovljava promenu u čvrstom rastvoru Ni (kada je u pitanju legura Wiron 99) i čvrstom rastvoru Co sa dve alotropske modifikacije (Dentalit C). Dostupnom tehnikom je uočeno u strukturi samo prisustvo čvrstih rastvora, dok je sadržaj ostalih formiranih faza bio na nivou ispod granice detekcije.

Sa povećanjem broja topljenja i livenja kod legure Wiron 99 dolazi do povećanja veličine kristalita čime se može i objasniti pojava smanjenja vrednosti makrotvrdoće kod ove legure.

Kada je u pitanju legura na bazi Co-Cr sistema Dentalit C ponovno topljenje i livenje menja odnos u sadržaju dva čvrsta rastvora na bazi Co sa dve različite alotropske modifikacije.

Biokompatibilnost, kao najvažniji element koji određuje aplikativnost i klinički potencijal dentalnih legura, utvrđuje se korišćenjem standardizovanih testova. Značaj *in vitro* testova ogleda se u tome što omogućavaju neposredan kontakt ispitivanih uzoraka sa ćelijama, a njihov uticaj na vijabilitet se može kvantitativno izraziti. Da bi se odredila potencijalna toksičnost legura u zavisnosti od broja topljenja i livenja, preliminarna studija je urađena na ćelijama mišjeg fibrosarkoma L929. Test ispitivanja vijabiliteta ćelija je rađen prema standardu ISO (1997.) za evaluaciju biokompatibilnosti dentalnih materijala (13). MTT testom je merena mitohondrijalna respiracija zasejanih ćelija koje su bile na površini uzoraka ispitivanih dentalnih legura. Pomenuti test se zasniva na činjenici da samo žive ćelije respiriraju te i da je stoga, intenzitet ćelijske respiracije proporcionalan broju vijabilnih ćelija u kulturi. Ono što, međutim, jeste manjkavost ovog eseja je činjenica da ćelije mogu sniziti ili povećati respiraciju u odgovoru na neki stimulus pa se u tom slučaju detektovana promena u ukupnoj respiraciji kulture ne može dovesti u korelaciju sa brojem živih ćelija (44). Iz tih razloga se vijabilitet određuje još jednim testom. Aktivnost

enzima kisele fosfataze je postojana, manje varira u prisustvu toksičnih stimulusa u poređenju sa ćelijskom respiracijom te je i njen intenzitet, vizuelizovan kolorimetrijskim testom, u ćelijskoj kulturi proporcionalan broju živih ćelija. Ovo svojstvo je čini pouzdanim parametrom za evaluaciju vijabiliteta (155).

Rezultati dobijeni na L929 ćelijama po izlaganju dentalnim legurama Ni-Cr (W1-8) i Co-Cr (D1-8) u trajanju od 24, 48 i 72h jasno su ukazali na neusklađenost podataka dobijenih MTT i testom kisele fosfataze, proistekle iz činjenice da smanjenje mitohondrijalog disanja nije u korelaciji sa odgovarajućim brojem živih ćelija u kulturi i prikazuje drastičniji pad vijabilnosti u poređenju sa drugim primenjenim testom. Očigledno je da su L929 ćelije smanjile intenzitet respiracije u odgovoru na toksični stimulus, što je u konkretnom slučaju prisustvo uzoraka dentalnih legura u kulturi. Ovi eksperimenti su jasno pokazali da mitohondrijalno disanje nije pouzdan parametar za određivanje vijabilnosti ćelija u prisustvu dentalnih materijala. Analizom rezultata testa kisele fosfataze dobijenim na maligno transformisanim fibroblastima, pokazalo se da se nakon 48h kultivacije preživele ćelije u značajnoj meri adaptiraju na prisustvo Co-Cr legure (Dentalit C) i nastavljaju da se umnožavaju te i da nije uočena povećana toksičnost ovog materijala u zavisnosti od broja topljenja i livenja. Međutim, inhibitorni potencijal uzoraka Ni-Cr legure (Wiron 99) izmeren posle 48h, postao je još uočljiviji po isteku 72h kultivacije. Ovaj efekat je manifestovan značajnim smanjenjem broja živih ćelija u kulturi srazmerno broju ponovljenih topljenja i livenja.

Dobijeni rezultati su, dalje, usmerili studiju ka ispitivanju uticaja uzoraka dentalnih legura na kulturu primarnih fibroblasta (MRC-5) kao i mononuklearnih ćelija periferne krvi humanog porekla, kao najvažnijih ćelija koje su prisutne u oralnom tkivu.

Slično ćelijama fibrosarkoma, umereno smanjenje vijabilnosti MRC-5 ćelija izloženih uticaju Co-Cr (Dentalit C) i Ni-Cr (Wiron 99) legura detektovano je nakon 48h. U istom terminu, uočeno je prisustvo ćelija Ann+/PI- ćelija (rana apoptoza) i Ann+/PI+ (nekroza), upućujući na zaključak da je u osnovi smanjene vijabilnosti indukcija ćelijske smrti. Apoptoza je genetski programirana ćelijska smrt definisana sledom događaja na unutarćelijskom nivou i jasnom morfološkom transformacijom koja kulminira raspadanjem nukleusa i formiranjem apoptotskih tela, ali ne i gubitkom permeabilnosti membrane. Jedan od najranijih događaja u apoptozi jeste izvrtnje membranskih fosfatidil-serina, tako da oni menjaju svoju orijentaciju sa unutrašnje ka spoljašnjoj strani (47). Biološki smisao ovog fenomena je u tome da se olakša eliminacija umirućih ćelija iz tkiva fagocitozom, zahvaljujući prepoznavanju upravo ovih molekula od strane ćelija-fagocita (51). Međutim, u ćelijskoj kulturi ova faza ne postoji, te apoptotične ćelije na kraju gube svojstvo permeabilnosti

ćelijske membrane i nekrotizuju. U tom kontekstu akumulacija dvostruko pozitivnih ćelija pre ukazuje na sekundarnu, nego na primarnu nekrozu. Prisustvo umirućih ćelija bilo je detektabilno u svim kulturama gajenim u prisustvu dentalnih materijala, ali je vidno dominiralo u ćelijama izloženim uzorcima Ni-Cr legure (Wiron 99), proporcionalno broju topljenja i livenja. Ovaj rezultat je u skladu sa objavljenim studijama koje pokazuju visoku citotoksičnost Ni-Cr legura u poređenju sa Co-Cr dentalnim legurama (67). Za razliku od Ni-Cr (W1-8) legura, ćelije koje su preživele kontakt sa uzorcima Co-Cr legure (Dentalit C), u poslednjih 24h kultivacije, pokazuju značajnu adaptaciju na prisustvo ovog materijala, obnavljajući svoj proliferativni kapacitet, koji je u potpunosti uporediv sa deobnim kapacitetom ćelija gajenih u idealnim uslovima na plastici.

I konačno, mononuklearne ćelije periferne krvi, koje predstavljaju vodeće ćelije u nespecifičnom imunološkom odgovoru na infekciju ili destrukciju tkiva, ali i pokretače specifične imunosti, pokazale su manju osetljivost na prisustvo uzoraka dentalnih legura u poređenju sa drugim testiranim ćelijama. Ipak, trend potencirane toksičnosti uzoraka Ni-Cr legure (Wiron 99) materijala, u skladu sa brojem topljenja i livenja, bio je evidentan i kod njih, što je eksperimentalno potvrđeno povećanjem procentualne zastupljenosti ćelija u apoptozi nakon 48h dugog izlaganja ovom materijalu. Međutim, potrebno je imati u vidu činjenicu da su ove ćelije izolovane iz krvi zdravog donora i da je njihov proliferativni potencijal, bez adekvatne stimulacije, u *in vitro* uslovima, bio ograničen. Ovo dalje ne isključuje mogućnost da bi u uslovima indukovane proliferacije, ove ćelije pokazale osetljivost u rangu one koja je detektovana u linijama primarnih ili maligno transformisanih fibroblasta.

Analiza prisustva reaktivnih jedinjenja azota i kiseonika pomoću unutarćelijskih indikatora DHR i DAF, ukazala je na značaj oksidativnog stresa u citotoksičnosti dentalnih legura opisanih u ovoj studiji i potvrdila pozitivnu vezu između njihove produkcije, ćelijske smrti i smanjene vijabilnosti u primarnim ćelijama humanog porekla. Ovi eksperimenti su još jednom ukazali na toksičnost Ni-Cr uzoraka, potenciranu ponavljanjem topljenja i livenjem. Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima u literaturi koji su ustanovili nedvosmislenu vezu između stvaranja reaktivnih kiseoničnih jedinjenja (ROS) od strane jona Ni i indukcije oksidativnog stresa, što se dovodi u vezu sa brzim gubitkom vijabilnosti ćelija i slabljenjem potencijalnog imunskog odgovora (88, 117).

Kada se sve sagleda, očigledno je da su rezultati ovog rada pokazali da je ponavljano topljenje i livenje legure koja sadrži Ni (Wiron 99) bilo ključni faktor koji je prouzrokovao toksičnost, a na to je ukazao i Vlahopoulos S. (137).

Nikl je, takođe, poznat po svom alergogenom potencijalu, a materijali koji u sebi sadrže Ni pokazuju da je rizik od senzibilizacije na ovaj metal u zavisnosti od otpuštanja jona metala tokom vremena. Sa druge strane, neke studije ističu veću citotoksičnost naširoko dostupnih Co-Cr legura kada se uporede sa drugim komercijalnim Ni-Cr legurama tokom ponavljano topljenja i livenja. Pojedini autori su u svojim istraživanjima dokazali da je kobalt više toksičan od nikla, Ayad M. F. (11). U svim slučajevima, oslobađanje jona i naknadne interakcije sa okruženjem tkiva predstavljaju složen fenomen koji ne zavisi samo od sastava legure, već u velikoj meri zavisi od procesa proizvodnje, tehnike topljenja, površinskog sastava / morfologije, višefaznog sastava, kao i uslova lokalne sredine, kao što je pH i koncentracija proteina i aminokiselina, Setcos J. C. (118). Razlike u odgovorima nas upućuju na to da su svojstva Ni razlog veće relativne citotoksičnosti Ni-Cr legure u odnosu na Co-Cr leguru, koja ne sadrži Ni. Osim toga, treba imati u vidu i elemente u tragovima, kao i primese, koje mogu uticati na smanjenu biokompatibilnost dentalnih legura. Bezzon, O. L. et al. (17) je u svom eksperimentu koristio tri kompozicije Ni-Cr legure sa različitim sadržajem Be. Legura bez Be je korišćena kao kontrola. U rezultatima autori navode da livnost, kao i jačina veze metala i keramike zavise od količine Be u leguri i ova svojstva su bila bolja kod legura sa Be, nego kod kontrolnih uzoraka bez Be. Međutim, poznat je toksičan efekat Be, te se on, bez obzira na bolju livnost i bolju vezu metala i keramike koju obezbeđuje, smatra nepoželjnim u sastavu dentalnih legura. Od velike važnosti je i činjenica da tehničari dolaze u neposredan kontakt sa česticama berilijuma tokom obrade odlivaka i poliranja, kao i sa isparenjima prilikom topljenja i livenja. Zbog kumulativnog toksičnog dejstva, opasno je izlaganje ovom metalu čak i u minimalnim koncentracijama. Zbog svih ovih štetnih uticaja, ne preporučuje se korišćenje dentalnih legura koje sadrže Be ni u najmanjim količinama.

Iz navedenih razloga, od velikog su značaja, kako za nauku, tako i za praksu, detaljni eksperimenti koji bi se bavili ispitivanjem citotoksičnosti komercijalnih dentalnih legura, kako bi se bolje razumele promene na nivou ćelija i tkiva u kontaktu sa legurama, tj. na nivou dodirne površine ćelije i legure, Mc Ginley E.L. (89).

Dalje studije biokompatibilnosti trebalo bi da pokažu koliki je potencijal komercijalnih dentalnih legura da izazovu sistemsku toksičnost, na šta je već ukazao Wataha J. C. (143).

Ni je toksičan metal i WHO (**World Health Organisation**) i EPA (**Environmental Protection Agency**) su definisale maksimalne dozvoljene doze koje se odnose na industrijsku (povećanu) ekspoziciju, RfD, MCL, NOAEL (**R**eference **D**ose, **M**aximum **C**ontaminant **L**evels, **N**o **O**bserved **A**dverse **E**ffect **L**evel). Nivoi ekspozicije u svakodnevnom životu su daleko manji i tolerantni nivoi (ukupni dnevni unos, duži vremenski period koji neće izazvati bolest) za Ni još nisu definisani od strane WHO, ali ne EPA-e. Specifična toksičnost Ni

(ono to ga čini posebnm u odnosu na druge metale) jeste njegov alergogeni potencijal (najčešći kontaktni alergen). Alergijska reakcija je posledica direktne kutane izloženosti metalnim predmetima koji u sebi sadrže Ni (50). Međutim, novija istraživanja su usmerena na druge aspekte ispoljavanja toksičnosti Ni, kao što je oksidativni stres, koji izaziva i neurotoksični efekat. Oksidativni stres i mitohondrijalna disfunkcija igraju značajnu ulogu u ispoljavanju neurotoksičnosti Ni. Povećana ekspozicija Ni može dovesti do stvaranja slobodnih radikala u različitim tkivima, što može izazvati modifikacije u strukturi DNK baza, povećanu lipidnu peroksidaciju, kao i poremećaje u homeostazi Ca i sulhidrilnih grupa proteina (119).

Rezultati ovih istraživanja su važni ne samo za budućnost primene i proizvodnje dentalnih legura boljih karakteristika, već i za proizvodnju žica sa memorisanim oblikom, koje sadrže visok nivo nikla u sebi i sve se frekventnije koriste u stomatologiji, Setcos J. C. (117).

Iako će se obe legure, na bazi kobalta i na bazi nikla, najverovatnije koristiti u svakodnevnoj stomatološkoj praksi u godinama koje dolaze, rezultati ovog istraživanja pokazuju očiglednu korelaciju između ponavljalog topljenja i livenja i potencijalne toksičnosti, a to su eksperimentalne činjenice koje ne treba zanemarivati u budućoj praksi.

## 7. ZAKLJUČAK

Dobijeni rezultati potvrđuju radnu hipotezu da više puta topljena i livena dentalna legura ima promenjenu mikrostrukturu, koja uzrokuje promenu njenih fizičko-mehaničkih svojstava i biološkog kvaliteta, tj. biokompatibilnosti legure.

Najvažniji zaključci na postavljene ciljeve su sledeći:

1. Mikrostruktura jednom topljenih i izlivenih uzoraka ispitivanih dentalnih legura je tipična dendritna i pokazuje razlike u hemijskom sastavu. Dendritske grane sadrže manje legirajućih i pratećih elemenata u poređenju sa međudendritnim prostorom. Za Ni-Cr leguru karakteristične su i različite faze nepravilnog oblika u međudendritnom prostoru.  
Vijabilitet ispitivanih ćelija u prisustvu jednom topljenih i izlivenih uzoraka Ni-Cr i Co-Cr dentalne legure poslužio je kao referentna vrednost za ispitivanje vijabiliteta ćelija u prisustvu uzoraka ispitivanih legura.
2. Prisutne su promene u dendritnoj mikrostrukturi obe ispitivane dentalne legure kao posledica više ponavljanih topljenja i livenja. Detektovane su promene u čvrstom rastvoru bogatom Ni kod Ni-Cr legure, kao i promene u čvrstom rastvoru Co-Cr legure.
3. Na osnovu rendgenostrukturne analize (XRD analiza) utvrđena je promena hemijskog sastava (promenjeni relativni intenzitet difrakcionih maksimuma sa ravni 111fcc, 200fcc i 220fcc i promenjena preferentna orijentacija kristalita) više puta topljene i livena dentalne legure u odnosu na početni hemijski sastav.
4. Makrotvrdoća ispitivanih dentalnih legura značajno zavisi od vrste legure i broja livenja. Veće vrednosti tvrdoće pokazala je Co-Cr legura u odnosu na Ni-Cr leguru. Sa povećanjem broja livenja značajno opada makrotvrdoća kako Ni-Cr tako i Co-Cr legure.  
Sa povećanjem broja livenja značajnije su i promene u mikrotvrdoći u međudendritnom prostoru, nego u dendritu. Promene mikrotvrdoće u dendritnoj zoni kod ispitivanih dentalnih legura kreću se u suprotnom smeru, odnosno, kod Co-Cr legure mikrotvrdoća opada, a kod Ni-Cr legure blago raste. Pri tom, intenzivnije su promene u dendritnoj zoni i međudendritnom prostoru kod Co-Cr legure.



5. Citotoksičnost ispitivanih lentalnih legura posle više ponavljanih topljenja i livenja dovodi do toksičnog šoka, koji se manifestuje ćelijskom precipitacijom i konsekventnim padom broja vijabilnih ćelija.
- Prisustvo ćelija u apoptozi bilo je izraženije kod uzoraka Ni-Cr legure u poređenju sa uzorcima Co-Cr legure. Zastupljenost ćelija označenih kao apoptotične i nekrotične pozitivno je korelirala sa brojem topljenja i livenja.
- Dobijeni rezultati ukazuju na to da je indukcija apoptoze u osnovi pada vijabiliteta ćelija uzrokovanim prisustvom ispitivanih više puta topljenih i livenih dentalnih legura. Citocidni efekat je značajno izraženiji kod uzoraka Ni-Cr legure i pozitivno korelira sa brojem topljenja i livenja.
6. Utvrđena je pozitivna korelacija između promena u mikrostrukturi i citotoksičnosti više puta topljenih i livenih dentalnih legura. Promena mikrostrukture ispitivanih dentalnih legura uslovljava promenu njihovih bioloških vrednosti (biokompatibilnosti). U složenim sistemima kao što su Ni-Cr i Co-Cr legure razlozi promene citotoksičnosti su brojni. Promena odnosa hemijskih elemenata kako osnovnih, tako i primesa, menja odnos udela gasne poroznosti i poroznosti uslovljene skupljanjem, kao i odnos faza koji se pojavljuju u strukturi. Takođe se kao razlog promene citotoksičnosti može tražiti i u pojavi oksidnih uključaka čije je prisustvo uočeno u uzorcima legura koji su višestruko pretapani.



U skladu sa dobijenim zaključcima:

- NE PREPORUČUJE SE PRIMENA Ni-Cr DENTALNE LEGURE ZA IZRADU FIKSNIH ZUBNIH NADOKNADA I
  
- NE PREPORUČUJE SE VIŠE PUTA PRETAPANJA Co-Cr LEGURA ZA IZRADU FIKSNIH ZUBNIH NADOKNADA.

## 8. LITERATURA

1. Al-Hiyasat, A. S., O. M. Bashabsheh, et al. *Elements Released from Dental Casting Alloys and Their Cytotoxic Effects*. International Journal of Prosthodontics 2002; 15(5): 473-478.
2. Al-Hiyasat, A. S., O. M. Bashabsheh, et al. *An investigation of the cytotoxic effects of dental casting alloys*. International Journal of Prosthodontics 2003; 16(1): 8-12.
3. Al-Hiyasat, A. S. and H. Darmani. *The effects of recasting on the cytotoxicity of base metal alloys*. Journal of Prosthetic Dentistry 2005; 93(2): 158-163.
4. Al-Hiyasat, A. S., H. Darmani, et al. *Cytotoxicity of dental casting alloys after conditioning in distilled water*. International Journal of Prosthodontics 2003; 16(6): 597-601.
5. Ameer, M. A., E. Khamis, et al. *Electrochemical behaviour of recasting Ni-Cr and Co-Cr non-precious dental alloys*. Corrosion Science 2004; 46(11): 2825-2836.
6. Amin, F. H., G. I. Shehab, et al. *The effect of fluoride ion concentration and pH on the corrosion and cytotoxic behaviour of Ni-Cr alloy*. Corrosion Prevention & Control 2002; 49(3): 105-116.
7. Angelini, E. and F. Zucchi. *In vitro corrosion of some Co-Cr and Ni-Cr alloys used for removable partial dentures: influence of heat treatments*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 1991; 2(1): 27-35.
8. Anusavice K. *Philips' science of dental materials*, 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W. B. Saunder; 1996; 324.
9. ASM International. *ASM handbook. Volume 9, Metallography and microstructures*. Materials Park, OH: ASM International, 2004.
10. ASM International. *ASM handbook. Volume 3, Alloys phase diagrams*. Materials Park, OH: ASM International, 1991.

11. Ayad, M.F. *Compositional stability and marginal accuracy of complete cast crowns made with as-received and recast type III gold alloy*. Journal of Prosthetic Dentistry, 2002; 87(2): 162-166.
12. Ayad, M. F., S. G. Vermilyea, et al. *Corrosion behavior of as-received and previously cast high noble alloy*. Journal of Prosthetic Dentistry 2008; 100(1): 34-40.
13. Bagchi, D., S. J. Stohs, et al. *Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium*. Toxicology 2002; 180(1): 5-22.
14. Baran G. R. *The metallurgy of Ni-Cr alloys for fixed prosthodontics*, Journal of Prosthetic Dentistry 1982; 50(3): 639-650.
15. Bezzon, O. L., C. De Barros, et al. *Pilot study of the relationship between the hardness and abrasion resistance of two base metal alloys used for metal-ceramic restorations*. Journal of Prosthetic Dentistry 2001; 85(2): 190-194.
16. Bezzon, O. L., C. De Barros, et al. *Effect of casting temperature and atmosphere on castability of Ni-Cr alloys: a comparative study with direct flame casting method*. Materials Research 2006; 9(2): 9-19.
17. Bezzon, O. L., M. G. de Mattos, et al. *Effect of beryllium on the castability and resistance of ceramometal bonds in nickel-chromium alloys*. The Journal of Prosthetic Dentistry 1998; 80(5): 570-574.
18. Bilhan, H., T. Bilgin, et al. *The effect of mucine, IgA, urea, and lysozyme on the corrosion behavior of various non-precious dental alloys and pure titanium in artificial saliva*. Journal of Biomaterials Applications 2007; 22(3): 197-221.
19. Braude, I. S., N. N. Gal'tsov, et al. *Phase composition of cast dental Ni-Cr-Mo and Co-Cr-Mo alloys*. Physics of Metals and Metallography 2005; 100(2): 165-171.
20. Bumgardner, J. D. and L. C. Lucas *Cellular response to metallic ions released from nickel-chromium dental alloys*. Journal of Dental Research 1995; 74(8): 1521-1527.
21. Bumgardner, J. D., M. Roach, et al. *Corrosion and XPS surface evaluation of nickel-chromium based dental casting alloys*. Biomedical Engineering Conference, 1998. Proceedings of the 17<sup>th</sup> Southern, pp.45

22. Callity B. D., *Elements of X-ray diffractions*. Addison-Wesley, New York, 1978.
23. Can, G., G. Akpınar, et al. *Effects of base-metal casting alloys on cytoskeletal filaments in cultured human fibroblasts*. International Journal of Prosthodontics 2004; 17(1): 45-51.
24. Cerruti M. G. *Characterization of bioactive glasses. Effect of the immersion in solutions the simulate body fluids*. Doktorska disertacija, 2004.
25. Čairović A. *Uticaoj ponavljanog livenja na biološka svojstva dentalnih legura*. Magistarska teza, 2008.
26. Čairović A., I. Đorđević, M. Bulatović, M. Mojić et al., *In vitro assessment of Ni-Cr and Co-Cr dental alloys upon recasting: cellular compatibility*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2013; 8(2): 1003-1012.
27. Čolić M.: *Testovi za ispitivanje biokompatibilnosti stomatoloških materijala*, u Stamenković D. (ur), *Gradivni stomatološki materijali-dostignuća i perspektive*, Stomatološki fakultet, 2007. Beograd, 37-62.
28. Čolić, M., D. Stamenković et al. *The influence of the microstructure of high noble gold-platinum dental alloys on their corrosion and biocompatibility in vitro*. Gold Bulletin, 2009; 42(1): 34-47.
29. Chandra T.S., N.S. Kumar, B.K. Kumari , *Evaluating cytotoxicity of recycled Ni-Cr dental casting alloys - an in vitro study*, Trends in Biomaterials and Artificial Organs. 2011; 25(2): 51-59.
30. Chang, J. C., Y. Oshida, et al. *Electrochemical study on microbiology-related corrosion of metallic dental materials*. Bio-Medical Materials and Engineering 2003; 13(3): 281-295.
31. Chen, C. C., R. G. S. Chen, et al. *Effect of chemical composition on the corrosion behavior of Ni-Cr-Mo dental casting alloys*. Journal of Biomedical Materials Research 2002; 60(3): 458-465.
32. Cheng, H., Y. H. Wang, et al. *Effect of recasting on bonding strength of porcelain fused to a nickel-chromium ceramic alloy*. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research 2009; 13(29): 5699-5702.

33. Cheng, T. P., W. T. Tsai, et al. *The effect of beryllium on the corrosion resistance of nickel-chromium dental alloys*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 1990; 1(4): 211-218.
34. Cortizo, M. C., M. F. L. de Mele, et al. *In vitro evaluation of biocompatibility of dental metal materials on osteoblast cells in culture*. 7<sup>th</sup> International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine, St Petersburg, Russia 2002.
35. Craig, R. G. and C. T. Hanks. *Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests*. Journal of dental research 1990; 69(8): 1539-1542.
36. D'Anto, V., A. Eckhardt, et al. *The influence of Ni(II) on surface antigen expression in murine macrophages*. Biomaterials 2009; 30(8): 1492-1501.
37. De March, P., P. Berthod, et al. *Corrosion of some selected ceramic alloys used in fixed partial dentures and their postsolder joints in a synthetic neutral saliva*. European Journal of Oral Sciences 2009; 117(1): 76-85.
38. De Oliveira Bauer, J. R., A. D. Loguercio, et al. *Microhardness of Ni-Cr alloys under different casting conditions*. Brazilian Oral Research 2006; 20(1): 40-46.
39. Denizoğlu, S., Z. Yeşil Duymuş, et al. *Evaluation of ion release from two base-metal alloys at various pH levels*. Journal of International Medical Research 2004; 32(1): 33-38.
40. Dhruv J. P., V. Nadgir, I. Shah *Effect of recasting of Ni-Cr alloy on its castability*, J. Indian Prosthodont. Soc. 2010; 10(3): 160-164.
41. Dobies, K., G. Gehre, et al. *Experimental studies of casting contraction of crowns and bridges made of various alloys based on nickel (Ni-Cr)*. Badania eksperymentalne skurczu odlewniczego koron i mostów wykonanych z różnych stopów na osnowie niklu (Ni-Cr) 1990; 40(5): 228-237.
42. Dobrzański L. A., Ł. Reimann, *Influence of Cr and Co on hardness and corrosion resistance CoCrMo alloys used on dentures*, Journal of Achievement in Materials and Manufacturing Engineering, 2011; 49(2), 193-199.
43. Dong, H., Y. Nagamatsu, et al. *Corrosion behavior of dental alloys in various types of electrolyzed water*. Dental Materials Journal 2003; 22(4): 482-493.

44. Donia M., S. Mijatović, D. Maksimović-Ivanić, Đ. Miljković et al. *The novel no-donating compound git-27NO inhibits in vivo growth of human prostate cancer cells and prevents murine immunoinflammatory hepatitis*. European Journal of Pharmacology. 2009; 615: 228-233
45. Duncan D. J., *The casting accuracy of Ni-Cr alloys for fixed prostheses*. Journal of Prosthetic Dentistry. 1982; 47(1): 63-68
46. Eftekhari, A. *Fractal study of Ni-Cr-Mo alloy for dental applications: effect of beryllium*. Applied Surface Science 2003; 220(1-4): 343-348
47. Elmore S. *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol. 2007; 35(4): 495-516
48. Elshahawy, W., I. Watanabe, et al. *Elemental ion release from four different fixed prosthodontic materials*. Dental Materials 2009; 25(8): 976-981
49. Elshahawy, W. M., I. Watanabe, et al. *In vitro cytotoxicity evaluation of elemental ions released from different prosthodontic materials*. Dental Materials 2009; 25: 1551-1555
50. Environmental health criteria 234, *Elemental speciation in human health risk assessment* World Health Organization 2006
51. Fadok V. A., D. L. Bratton, S. C. Frasch, M. L. Warner et al. *The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes*. Cell Death and Differentiation, 1998; 5:551-562
52. Faria A. C. L., R. C. S. Rodriguez et al. *Effect of temperature variation on the cytotoxicity of cast dental alloys and commercial pure titanium*. Journal of Applied Oral Science 2009; 17 (5): 421-6.
53. Fu, J., X. Liang, et al. *Oxidative stress as a component of chromium-induced cytotoxicity in rat calvarial osteoblasts*. Cell Biology and Toxicology 2008; 24(3): 201-212.
54. Garhammer, P., K. A. Hiller, et al. *Metal content of saliva of patients with and without metal restorations*. Clinical oral investigations 2004; 8(4): 238-242.
55. Garhammer, P., G. Schmalz, et al. *Metal content of biopsies adjacent to dental cast alloys*. Clinical Oral Investigations 2003; 7(2): 92-97.

56. Gatin, E., C. Berlic, et al. *Investigation of Ni-Cr alloys in order to assess the quality of cast dental restorations*. Journal of Optoelectronics and Advanced Materials 2009; 11(4): 484-489.
57. Giacchi J. V., C. N. Morando et al. *Microstructural characterization of as-cast biocompatible Co-Cr-Mo alloys*. Materials Characterization 2011; 62: 53-61.
58. Grill, V., M. A. Sandrucci, et al. *The influence of dental metal alloys on cell proliferation and fibronectin arrangement in human fibroblast cultures*. Archives of Oral Biology 1997; 42(9): 641-647.
59. Grill, V., M. A. Sandrucci, et al. *Cell proliferation rates and fibronectin arrangement as parameters for biocompatibility evaluation of dental metal alloys in vitro*. Journal of oral science, 2000; 42(1): 1-7.
60. Gupta K. P. *The Co-Cr-Mo System*. Journal of Phase Equilibria and Diffusion, 2005; 26(4): 87-92.
61. Hamano, H., K. Uoshima, et al. *Investigation of metal allergy to constituent elements of intraoral restoration materials*. Kōkūbyō Gakkai zasshi. The Journal of the Stomatological Society, Japan 1998; 65(1): 93-99.
62. Hanawa, T., M. Kaga, et al. *Cytotoxicities of oxides, phosphates and sulphides of metals*. Biomaterials 1992; 13(1): 20-24.
63. Hani, H. *Corrosive changes of dental alloys in oral environment-scanning electron microscopic observation and electron probe microanalysis on crown surfaces*. Kokūbyō Gakkai zasshi. The Journal of the Stomatological Society, Japan 1993; 60(3): 372-397.
64. Hornez, J. C., A. Lefèvre, et al. *Multiple parameter cytotoxicity index on dental alloys and pure metals*. Biomolecular Engineering 2002; 19(2-6): 103-117.
65. Huang, H. H. *Effect of chemical composition on the corrosion behavior of Ni-Cr-Mo dental casting alloys*. Journal of Biomedical Materials Research 2002; 60(3): 458-465.
66. Hässler, C., M. Geitzsch, et al. *Investigations of chemical corrosion of Ni/Cr-alloys*. Untersuchungen zum korrosionschemischen Verhalten von dentalen Ni/Cr-Legierungen. 1990; 40(1): 5-8.

67. Imirzalioglu P., E. Alaaddinoglu et al. *Influence of recasting different types of dental alloys on gingival fibroblast cytotoxicity*. Journal of Prosthetic Dentistry, 2012; 107(1): 24-33.
68. Issa Y., P. Brunton, C. M. Waters, D. C. Watts. *Citotoxicity of metal ions to human oligodendroglial cells and human gingival fibroblasts assessed by mitochondrial dehydrogenase activity*. Dental Materials, 2008; 24(2): 281-287.
69. Jerolimov V. i sar. *Osnove stomatoloških materijala*, Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet, 2005.
70. Jiao, S., X. Miao, et al. *Study on cytotoxic effect of composite of dental metal materials*. Chinese Journal of Biomedical Engineering 1997; 16(2): 154-159.
71. Karanović, Lj. *Primenjena kristalografija*, Univerzitet u Beogradu, 1996.
72. Khamis, E. and M. Seddik. *Corrosion evaluation of recasting non-precious dental alloys*. International Dental Journal 1995; 45(3): 209-217.
73. Klötzer, W. T. *Metals and alloys-corrosion, toxicology, sensitivity reactions 1*. Metalle und Legierungen - Korrosion, Toxikologie, sensibilisierende Wirkung (Teil I). 1991; 100(5): 300-304, 307.
74. Kojima H., N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara et al. *Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins*. Analytical Chemistry 1998; 70(13): 2446-53.
75. Kojima H., K. Sakurai, K. Kikuchi, S. Kawahara et al. *Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore*. Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo). 1998; 46(2): 373-5.
76. Kojima H., Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi et al. *Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production*. Angewandte Chemie International Edition Engl. 1999; 38(21): 3209-3212.
77. Koren, V. N., N. S. Radyshich, et al. *The results of toxicological research on dental alloys containing Ni, Cr and Co using the implantation method*. Rezul'taty toksikologicheskogo issledovaniia stomatologicheskikh splavov, soderzhashchikh Ni, Cr, Co, metodom implantatsii. 1991; (2); 17-21.



78. Kulak Y., A. Arikian. *Effect of dental base metal alloys on IgE levels and some blood parameters*. Journal of Oral Rehabilitation 1997; 24(10): 749-754.
79. Kulmburg, A., G. Kvas, et al. *The microstructure of Co-Cr-Mo-(Nb) dental alloys*. Praktische Metallographie-Practical Metallography 2001; 38(9): 514-531.
80. Laurent, F., B. Grosgeat, et al. *Comparison of corrosion behaviour in presence of oral bacteria*. Biomaterials 2001; 22(16): 2273-2282.
81. Lin, H. Y. et al. *Metallurgical, surface and corrosion analysis of Ni-Cr dental casting before and after porcelain firing*. Dental Materials, 2008; 378-385.
82. Liu, J. S., Q. Wang, et al. *Elemental Release From Ni-Cr Dental Alloy in Artificial Saliva and Saline Solution*. International Materials Research Conference, Chongqing, Peoples Republic China, 2008.
83. Liu, Y. and H. Fujii *Metal elements from intraoral metal restorations*. Shanghai kou qiang yi xue. Shanghai journal of stomatology 2004; 13(3): 189-192.
84. Lu, Y., W. Chen, et al. *Nickel-based (Ni-Cr and Ni-Cr-Be) alloys used in dental restorations may be a potential cause for immune-mediated hypersensitivity*. Medical Hypotheses. 2009; 73(5): 716-7.
85. Madani, A. S., S. R. Rokni, A. Mohammadi, M. Bahrami. *The effect of recasting on bond strenght between porcelain and base-metal aloys*. Journal of Prosthodontics, 2011; 20(3):190-194.
86. Manaranche, C. and H. Hornberger *A proposal for the classification of dental alloys according to their resistance to corrosion*. Dental Materials 2007; 23(11): 1428-1437.
87. Mareci, D., G. Nemtoi, et al. *The electrochemical behaviour of various non-precious Ni and Co based alloys in artificial saliva*. European Cells and Materials 2005; 10: 1-7.
88. McGinley E. L., G. P. Morgan *Base-metal dental casting alloy biocompatibility assessment using a human-derived three-dimensional oral mucosal model*. Acta Biomaterialia, 2012; 8(1): 432-438.

89. McGinley E. L., D. C. Coleman, G. P. Moran, G. J. P. Fleming, *Effects of surface finishing conditions on the biocompatibility of a nickel-chromium dental casting alloy*. Dental Materials, 2011; 27(7): 637-650.
90. Merk, H. F., H. Schwickerath, et al. *Epicutaneous tests of dental casting alloys*. Zeitschrift für Hautkrankheiten 1993; 68(10), 646-649.
91. Messer, R. L. W., S. Bishop, et al. *Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology*. Biomaterials 1999; 20(18): 1647-1657.
92. Mirković N., M. Draginjac et al. *Uticaj višestrukog livenja na debljinu metal-keramičkog međuspoja niki-hrom i kobalt-hrom legura*. Vojnosanitetski pregled, 2008; 65(5): 365-369.
93. Molina C., L. Nogués, et al. *Dental casting alloys behaviour during power toothbrushing with toothpastes of various abrasivities. Part II: Corrosion and ion release*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2008; 19(9): 3015-3019.
94. Mutlu-Sagesen L., G. Ergun, E. Karabulut. *Ion release from metal-ceramic alloys in three different media*. Dental Materials Journal 2011; 30(5): 596-610.
95. Nascimento, M. L., W. D. Mueller, et al. *Electrochemical characterization of cobalt-based alloys using the mini-cell system*. Dental Materials 2007; 23(3): 369-373.
96. Nelson S. K., J. C. Wataha, et al. *Accelerated toxicity testing of casting alloys and reduction of intraoral release of elements*. The Journal of prosthetic dentistry 1999; 81(6): 715-720.
97. Nelson S. K., J. C. Wataha, et al. *Cytotoxicity of dental casting alloys pretreated with biologic solutions*. The Journal of prosthetic dentistry 1999; 81(5): 591-596.
98. Nejatidanesh F., O. Savabi, A. Yazdenparast *An investigation on metallic ion release from four dental casting alloys*. Journal of Dentistry, 2005; 2(4): 168-173.
99. Noda M., J. C. Wataha, et al. *Sublethal, 2-week exposures of dental material components alter TNF-alpha secretion of THP-1 monocytes*. Dental Materials 2003; 19(2): 101-105.

100. Nogués, L., J. Martinez-Gomis, et al. *Dental casting alloys behaviour during power toothbrushing with toothpastes with various abrasivities. Part I: Wear behavior*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2008; 19(9): 3041-3048.
101. Olivieri K. A. N., M. P. Neisser et al. *Mechanical properties and microstructural analysis of a Ni-Cr alloy cast under different temperatures*, Brazilian Journal of Oral Sciences 2004; 3(8): 414-419.
102. Oshida, Y., I. W. Koh, et al. *Effects of bacteria-induced corrosion on galvanic couples of Cp titanium with other dental alloys*. Medical Device Materials, Proceeding of the Materials and Proceeding of Medical device conference, 2003; 423-428.
103. Ozdemir, S., A. Arikan *Effects of recasting on the amount of corrosion products released from two Ni-Cr base metal alloys*. The European Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry 1998; 6(4): 149-153.
104. Ozen, J., A. Atay, et al. *In vitro IL-1 beta release from gingival fibroblasts in response to pure metals, dental alloys and ceramic*. Journal of Oral Rehabilitation 2005; 32(7): 511-517.
105. Ozyegin, L. S., R. Tuncer, et al. *Hardness, behavior and metal surface evaluation of recasting non-precious dental alloys*. 19<sup>th</sup> International Symposium on Ceramics in Medicine, Chengdu, Peoples Republic China, 2006.
106. Palaskar J., D. V. Nadgir, J. Shah *Effect of recasting of nickel chromium dental alloy on its castability*. Journal of Indian Prosthodontic Society 2010; 10(3): 160-164.
107. Peraire, M., J. Martinez-Gomis, et al. *Effects of recasting on the chemical composition, microstructure, microhardness, and ion release of 3 dental casting alloys and titanium*. International Journal of Prosthodontics 2007; 20(3): 286-288.
108. Petzow, G. Metallographic Etching: *Techniques for Metallography, Ceramography, Plastography*, ASM International, 1999., 2<sup>nd</sup> edition.
109. Qiu, J. et al. *Corosion behaviour and surface analysis of a Co-Cr and two Ni-Cr dental alloys before and after simulated porcelain firing*. European Journal of Oral Sciences 2011; 119: 93 -101.

110. Reclaru, L., H. Lüthy, et al. *Corrosion behaviour of cobalt-chromium dental alloys doped with precious metals*. *Biomaterials* 2005; 26(21): 4358-436.
111. Ristić, L., Z. Miljković, et al. *Discoloration of gingiva in the presence of fixed dental restorations*. *Vojnosanitetski pregljed. Military-medical and pharmaceutical review* 2005; 62(5): 371-376.
112. Roach, M., D. Parsell, et al. *Correlation of corrosion and surface analyses for Ni-Cr alloys*. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* 1998; 26(5): 391-392.
113. Saji, V. S. and H. C. Choe *Electrochemical behavior of Co-Cr and Ni-Cr dental cast alloys*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 2009; 19(4): 785-790.
114. Saji, V. S. and H. C. Choe *Preferential dissolution behavior in Ni-Cr dental cast alloys*. *Bulletin of Materials Sciences* 2010; 33(4): 463-468.
115. Schmalz, G., U. Schuster, et al. *Influence of metals on IL-6 release in vitro*. *Biomaterials* 1998; 19(18): 1689-1694.
116. Schmalz, G., H. Schweikl, et al. *Release of prostaglandin E-2, IL-6 and IL-8 from human oral epithelial culture models after exposure to compounds of dental materials*. *European Journal of Oral Sciences* 2000; 108(5): 442-448.
117. Schmalz, G., P. Garhammer. *Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues*. *Dental Materials*, 2002; 18: 396-406.
118. Setcos, J.C., A. Babaei-Mahani et al. *The safety of nickel containing dental alloys*. *Dental Materials*, 2006; 22(12): 1163-1168.
119. Shang-Cheng X., H. Min-Di, L. Yong-Hui, L. Li et al. *Nickel exposure induces oxidative damage to mitochondrial DNA in neuro 2A cells: The neuroprospective roles of melatonin*. *Journal of Pineal Research* 2011; 51(4):426-433
120. Sharma, M., A. V. R. Kumar et al. *Electrochemica corrosion behavior of dental/implant alloys in artificial saliva*, *Journal of Materials Engineering and Performance*, 2008; 17(5): 695-701.

121. Silva, J. W. D., S. C. Baldissera, et al. *Effect of Recasting Procedure Upon Corrosion Behavior and Metallic Ion Release of Co-Cr-Mo Dental Alloy in Physiological Serum*. *Praktische Metallographie-Practical Metallography* 2009; 46(7): 321-336.
122. Slokar Lj., P. Matković, T. Matković. *Effect of alloying elements addition on the as-cast Co-Cr biomedical alloys*. 2<sup>nd</sup> Croatian Congress of Microscopy with International participation. 2006: 274-275.
123. Stamenković D. (ur.) i sar. *Gradivni stomatološki materijali – dostignuća i perspektive*, Stomatološki fakultet, Beograd, 2007.
124. Stamenković D. (ur.) i sar. *Stomatološki materijali, knjiga 1*, Stomatološki fakultet, Beograd, 2009.
125. Stamenković D. (ur.) i sar. *Stomatološki materijali, knjiga 2*, Stomatološki fakultet, Beograd, 2012.
126. Stamenković D., B. Babić, D. Stanković, N. Backović. *Ispitivanje Co-Cr-Mo legura sa različitim polaznim stanjem*, Stomatološka protetika, 1981: 35-43.
127. Stamenković D. *Uticaj različitih uslova livenja na mehaničke osobine Co-Cr-Mo legure*. *Stomatološki glasnik Srbije*, 1984: 13-23.
128. Starcukova, J. Z. Starcuk Jr, H. Hubalkova, I. Linetskiy, *Magnetic susceptibility and electrical conductivity of metallic dental materials and their impact on MR imaging artifacts*, *Dental Materials* 2008; 24(6): 715-723.
129. Suzuki, N. *Studies on metal allergy in the field of dentistry-treatment with application of X-ray fluorescence spectroscopy analysis in detection of allergen metals*. *Kokubyo Gakkai zasshi. The Journal of the Stomatological Society, Japan* 1994; 61(1): 144-158.
130. Taira, M., M. Sasaki, et al. *Dose-dependent effects of Ni(II) ions on production of three inflammatory cytokines (TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6), superoxide dismutase (SOD) and free radical NO by murine macrophage-like RAW264 cells with or without LPS-stimulation*. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2008; 19(5): 2173-2178.
131. Takeda, S., M. Akiyama, et al. *Effects of Metal Combinations on Cytotoxicity Evaluation Using a Dynamic Extraction Method*. *Dental Materials Journal* 2000; 19(4): 373-380.

132. Taylor A., *X-ray Metallography*. John Wiley & Sons, INC. 1961.
133. Tripuraneni, S. C., S. K. Namburi. *Evaluation of genotoxicity of recycled Ni-Cr dental casting alloys: an in vitro study*. Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics 2008; 6(1): 47-54.
134. Trombetta, D., M. R. Mondello, et al. *Toxic effect of nickel in an in vitro model of human oral epithelium*. Toxicology Letters 2005; 159(3): 219-225.
135. Venclíková, Z., O. Benada, et al. *Metallic pigmentation of human teeth and gingiva: Morphological and immunological aspects*. Dental Materials Journal 2007; 26(1): 96-104.
136. Venugopalan, R. and R. L. W. Messer *The effect of a microcarrier suspension cell culture system on polarization measurements from Ni-Cr dental casting alloys*. Dental Materials 2005; 21(11): 993-998.
137. Vlahopoulos, S., I. Boldogh, A. Casola, A. R. Brasier, A.R. *Nuclear factor- $\kappa$ B-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor  $\alpha$ : Evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation*, Blood, 1999; 94(6): 1878-1889.
138. Wataha, J. C., R. G. Craig, et al. *The release of elements of dental casting alloys into cell-culture medium*. Journal of Dental Research, 1991; 70(6): 1014-1018.
139. Wataha, J. C., R. G. Craig, et al. *The effects of cleaning on the kinetics of in vitro metal release from dental casting alloys*. Journal of Dental Research 1992; 71(7): 1417-1422.
140. Wataha, J. C., C. T. Hanks, et al. *Uptake of metal cations by fibroblasts in vitro*. Journal of Biomedical Materials Research 1992; 27(2): 227-232.
141. Wataha, J.C., R. L. Messer, *Casting alloys*, Dental Clinics of North America, 2004; 48(2): 499-512.
142. Wataha, J. C., C. T. Hanks, et al. *In vitro effects of metal ions on cellular metabolism and the correlation between these effects and the uptake of the ions*. Journal of Biomedical Materials Research 1994; 28(4): 427-433.

143. Wataha, J. C., J. B. Lewis, et al. *Effect of dental metal ions on glutathione levels in THP-1 human monocytes*. Journal of Oral Rehabilitation 2000; 27(6): 508-516.
144. Wataha, J. C. and P. E. Lockwood *Release of elements from dental casting alloys into cell-culture medium over 10 months*. Dental Materials 1998; 14(2): 158-163.
145. Wataha, J. C., P. E. Lockwood, et al. *Ability of Ni-containing biomedical alloys to activate monocytes and endothelial cells in vitro* Journal of Biomedical Materials Research 1999; 45(3): 251-257.
146. Wataha, J. C., P. E. Lockwood, et al. *Effect of toothbrushing on the toxicity of casting alloys*. Journal of Prosthetic Dentistry 2002; 87(1): 94-98.
147. Wataha, J. C., N. L. O'Dell, et al. *Relating nickel-induced tissue inflammation to nickel release in vivo*. Journal of Biomedical Materials Research 2001; 58(5): 537-544.
148. Wataha, J. C., S. Ratanasathien, et al. *In vitro IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  release from THP-1 monocytes in response to metal ions*. Dental Materials 1996; 12(5-6): 322-327.
149. Wataha, J. C., *Biocompatibility of dental casting alloys: a review*, Journal of Prosthetic Dentistry. 2002; 83(2): 223-34.
150. Wataha, J. C., P. E. Lockwood, et al. *Effect of toothbrushing on elemental release from dental casting alloys*. Journal of Prosthodontics, 2002; 8(4): 245-251.
151. Wataha J. C. *Predicting clinical biological responses to dental materials*. Dental Materials, 2012; 28(1): 23-40.
152. Wessell R. W., A. W. G. Wals, J. G. Steele *Crowns and extra-coronal restorations: materials selection*. British Dental Journal, 2002; 192: 199-211.
153. Wylie C. M., R. M. Shelton *Corrosion of nickel-based dental casting alloys*. Dental Materials, 2007; 23: 714-723.
154. Yang, H. C., L. A. Pon *Toxicity of metal ions used in dental alloys: A study in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Drug and Chemical Toxicology 2003; 26(2): 75-85.
155. Yang, T. T., P. Sinai, S. R. Kain. *An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells*. Analytical Biochemistry 1996; 241(1): 103-108.

156. Yfantis, C. D. *An investigation of the corrosion characteristics of base ceramo-metal dental casting alloys*. 1st WSEAS International Conference on Materials Science, Bucharest, Romania, 2008.
157. Özdemir, S., A. Arıkan *Effects of recasting on the amount of corrosion products released from two Ni-Cr base metal alloys*. European Transactions on Electrical Power 1996; 6(4): 149-153.
158. Özen, J., A. U. Ural, et al. *Influence of dental alloys and an all-ceramic material on cell viability and interleukin-1beta release in a three-dimensional cell culture model*. Turkish Journal of Medical Sciences 2005; 35(4): 203-208.



## BIOGRAFIJA AUTORA

Mr sc. dr Aleksandra Čairović (rođena Gavrilović) rođena je 19.11.1967. godine u Beogradu. Prva dva razreda osnovne škole završila je u Nemačkoj, zatim ostalih šest razreda u Beogradu. Prvu beogradsku gimnaziju pohađala je od 1982-1986. godine.

Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 1987. i diplomirala 1993. godine, sa ocenom 10 na diplomskom ispitu i prosečnom ocenom 8,57.

Obavezni lekarski staž obavila je na klinikama Stomatološkog fakulteta u Beogradu, nakon čega je položila Državni ispit. Specijalizaciju iz stomatološke protetike na Klinici za Stomatološku protetiku Univerziteta u Beogradu je upisala 1994. godine. U svojstvu mladog talenta na Kliniku za stomatološku protetiku, Stomatološkog fakulteta u Beogradu, primljena je 1995. godine.

Magistarske studije upisala je školske 1996-97. godine, na Klinici za protetiku, Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Položila je specijalistički ispit sa odličnom ocenom 1998. godine. Radni odnos u svojstvu Asistenta pripravnika na Klinici za stomatološku protetiku, Stomatološkog fakulteta u Beogradu počinje od 01.03.1998. godine.

Magistarsku tezu pod naslovom: Uticaj ponavljanoog livenja na biološka svojstva dentalnih legura, odbranila je 2008. godine. Aktivno je uključena u razne oblike obrazovne, zdravstvene i naučne delatnosti. Bila je mentor za studentski rad pod naslovom: „Biokompatibilnost Ag-Pd legura – *in vivo* studija”. Od 2008. godine radi u svojstvu asistenta za naučne oblasti Kliničke stomatološke nauke nastavni predmeti: Mobilna stomatološka protetika, Fiksna stomatološka protetika i Stomatološka protetika pretkinika.

Učesnik je u projektu 45012, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u programu sufinansiranja integralnih i interdisciplinarnih istraživanja u oblasti novi materijali i nanonauke, pod naslovom: „Sinteza, procesiranje i karakterizacija nanostrukturnih materijala za primenu u oblasti energije, mehaničkog inženjeringa, zaštite životne sredine i biomedicine”. Autor je i koautor u 36 objavljenih radova, bila je predavač po pozivu na 3 domaća i jednom inostranom skupu. Član je BaSS-a i SLD-a.

Govori, čita i piše engleski i nemački jezik. Majka je dvoje dece.

**Прилог 1.**

## **Изјава о ауторству**

Потписани-а Александра Чаировић

Број индекса: 168/10

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

### **Утицај термичке обраде на биолошка и микроструктурна својства денталних легура**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Прилог 2.**

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора: Александра Чаировић

Број индекса: 168/10

Студијски програм:

Наслов рада: **Утицај термичке обраде на биолошка и микроструктурна својства денталних легура**

Ментор: Проф. др Драгослав Стаменковић

Потписани/а Александра Чаировић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

### Утицај термичке обраде на биолошка и микроструктурна својства денталних легура

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_