



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Ivan M. Kostić

**EFEKTI PRIMENE SREDSTAVA
ZA RETRAKCIJU GINGIVE
NA EKSPERIMENTALNIM MODELIMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor
Prof. dr Stevo Najman

Niš, 2015.



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Ivan M. Kostić

**APPLICATION EFFECTS
OF GINGIVAL RETRACTION AGENTS
ON EXPERIMENTAL MODELS**

DOCTORAL DISSERTATION

Mentor
Prof. Stevo Najman, Ph.D.

Niš, 2015

| | |
|--|---|
| I Autor | |
| Ime i prezime: | Ivan Kostić |
| Datum i mesto rođenja: | 30. 10. 1975. Niš |
| Sadašnje zaposlenje: | Rukovodilac stručnih saradnika Farmaceutске kompanije Merck Srbija |
| II Doktorska disertacija | |
| Naslov | Efekti primene sredstava za retrakciju gingive na eksperimentalnim modelima |
| Broj stranica: | 119 |
| Broj šema / slika: | 35 |
| Broj tabela: | 82 |
| Broj grafikona: | 20 |
| Broj bibliografskih podataka: | 189 |
| Ustanova i mesto gde je rad izrađen | Institut za biologiju sa humanom genetikom Medicinskog fakulteta u Nišu Institut za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu |
| Naučna oblast: | Bazična istraživanja u stomatologiji |
| Mentor: | Prof. dr Stevo Najman |
| III Ocena i odbrana | |
| Datum prijave teme: | 04.12.2013. god. |
| Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije: | 04-BS-11/08 05.02.2014.god. |
| Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata: | 1. Prof. dr Ljiljana Kesić, predsednik 2. Prof. dr Stevo Najman, član 3. Prof. dr Dragan Mihailović, član |
| Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije: | 1. Prof. dr Ljiljana Kesić, predsednik 2. Prof. dr Stevo Najman, član 3. Prof. dr Dragan Mihailović, član 4. Prof. dr Ljiljana Aleksov, član 5. Doc. dr Tatjana Puškar, član sa sa Medicinskog fakulteta u Novom Sadu |
| Datum odbrane doktorske disertacije: | |

Naučni doprinos disertacije:

Kostić I, Najman S, Kostić M, Stojanović S. Comparative review of gingival retraction agents. Acta Medica Medianae 2012; 51(1): 81-84.

Kostić I, Mihailović D, Najman S, Stojanović S, Kostić M. The rabbit gingival tissue response to retraction liquids and tetrahydrozoline. Vojnosanit Pregl 2014; 71(1): 46–51

Ova disertacija je jedan od rezultata projekta III41017, kojeg finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, na čemu im se zahvaljujem.



- ☞ *Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Stevi Najmanu na iskustvima koja je nesebično podelio sa mnom, neprocenjivim savetima, na razumevanju, svim kritikama, sugestijama i pohvalama, na podršci i strpljenju tokom niza godina zajedničkog rada u toku izrade ove disertacije.*
- ☞ *Veliko hvala prof. dr Ljiljani Kesić na učešću u svakom segmenutu ove disertacije. Njena bezrezervna stručna i lična podrška bile su osnov ovog rada.*
- ☞ *Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Draganu Mihailoviću na velikoj pomoći prilikom patohistološke analize dobijenih uzoraka.*
- ☞ *Članovima Komisije, prof. dr Ljiljani Aleksov i doc. dr Tatjani Puškar hvala na uloženom trudu i razumevanju.*
- ☞ *Dragoj kolegici Sanji Stojanović i osoblju Instituta za biologiju sa humanom genetikom hvala za uspešnu saradnju i izuzetnu pomoć u delu koji se odnosi na ispitivanje citotoksičnosti sredstava za retrakciju gingive.*
- ☞ *Zaposlenima na Institutu za biomedicinska istraživanja hvala na lepoj saradnji i još lepšem druženju tokom eksperimentalnog istraživanja na životinjama.*
- ☞ *Milu Ž. Randeloviću, diplomiranom inženjeru elektronike, zahvaljujem na dragocenoj pomoći u tehničkoj obradi ove disertacije.*



- ☞ *Hvala mojim roditeljima što su me bezrezervno i sa toliko ljubavi podržavali u svemu što radim i zbog kojih sam to što jesam.*
- ☞ *Hvala Mileni što je uvek tu, na savetima, na deljenju najtežih i najlepših trenutaka u mom životu.*
- ☞ *Hvala Stefanu i Mariji na divnom ometanju, hvala im što postoje.*

∞ *Ljubavi mog života*

EFEKTI PRIMENE SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE NA EKSPERIMENTALNIM MODELIMA

Kratak sadržaj

Prilikom izrade fiksnih protetičkih radova neophodno je poštovati integritet struktura parodonta i osigurati maksimalno moguću preciznost na prelazu veštačke krune u biološko tkivo. Da bi područje granice preparacije, u slučaju kad da je ona smeštena u nivou ili ispod ruba gingive, bilo dostupno otisnom materijalu potrebno je reverzibilnim privremenim pomeranjem marginalne gingive u apikalnom smeru prikazati demarkacionu liniju i učiniti je dostupnom. Najčešće korišćena sredstva za retrakciju gingive su adstrigensi (soli metala) i vazokonstriktori (adrenalin). Ona se aplikuju u gingivalni sulkus brušenog zuba, dilatiraju ga i isušuju stvarajući optimalne uslove za uzimanje otiska za indirektnu stomatološku restauraciju. Obzirom da su sredstva za retrakciju u neposrednom kontaktu sa gingivalnim tkivom njihova biokompatibilnost je od primarnog značaja.

Biokompatibilnost stomatoloških materijala definiše se kao njihov kvalitet da nakon primene u usnoj duplji obavljaju određenu funkciju i pri tome ne uzrokuju neželjene efekte. Međutim, dokazano je da sredstva za retrakciju mogu imati jatrogeno dejstvo na tkiva gingive, posebno ukoliko je pacijent već oboleo od parodontalnog oboljenja ili ima sklonost ka njihovoj pojavi. Upotreba adrenalina može uzrokovati sistemske reakcije organizma.

U istraživanju se pošlo od pretpostavke da komercijalno dostupna sredstva za retrakciju gingive ispoljavaju izvestan toksični efekat na tkiva sa kojima dolaze u kontakt, a stepen oštećenja je različit i zavisi od vrste, koncentracije i dužine njihovog delovanja. Biološki prihvatljivija sredstva za retrakciju gingive od preparata na bazi aluminijum hlorida i adrenalin a treba tražiti među simpatomimetskim vazokonstriktorima (tetrahidrozolin).

Cilj istraživanja bio je uporedna analiza potencijalno toksičnog efekta sredstava za retrakciju gingive i tetrahidrozolina u uslovima *in vitro* i *in vivo*.

Ispitivani materijal je obuhvatio tri sredstva koji u stomatološkoj praksi koriste za retrakciju gingive: dva materijala na bazi aluminijum hlorida (10% i 25% rastvor), 8% adrenalin i 0,05% rastvor tetrahidrozolina.

Biokompatibilnost sredstava za retrakciju gingive ispitivana je u uslovima *in vitro* na *MDCK* (Madin-Darby canine kidney) kontinuiranoj ćelijskoj liniji i u *in vivo* uslovima na eksperimentalnim životinjama. *MDCK* ćelije se mogu smatrati analogima epitelnih ćelija gingive, dok je struktura gingivalnog tkiva i dubina gingivalnog sulkusa kunića gotovo identična humanoj.

Efekat retrakcionih sredstava i tetrahidrozolina na vijabilnost i oporavak *MDCK* ćelijske linije pratičen je *vitalnim bojenjem tripan plavim* i nestandardnim *MTT testom*. Korišćeni su rastvori ispitivanih retrakcionih materijala dobijeni njihovim razblaženjem u Ringerovom rastvoru u sledećim koncentracijama: 5%, 10%, 25% i 50%. Merenja intenziteta redukcije MTT-a vršena su neposredno nakon dejstava materijala u trajanju od tri, šest i deset minuta kako bi odredila vijabilnost, odnosno nakon perioda jednodnevnog oporavka ćelija u hranjivom medijumu u cilju određivanja stepena oporavka ćelija. Vrednosti dobijene u *in vitro* uslovima bile su osnov za statističku analizu i obrađeni su programom SPSS 15.0. Korišćena je analiza varijanse (ANOVA) sa sledećom Post-Hoc analizom, a za statistički značajne smatrani su nivoi od $p < 0,05$. Kvantitativne promene u vijabilnosti ćelija predstavljene su i opisno.

In vivo istraživanje je obuhvatilo dejstvo retrakcionih sredstava i tetrahidrozolina na gingivano tkivo eksperimentalnih kunića. Postupak i vreme aplikacije od sedam minuta odgovarali su kliničkim uslovima. Predviđene su negativna kontrola (odsustvo intervencije) i lažni tretman (aplikacija retrakcionog konca bez ispitivanog sredstva). Biopsija tretiranog gingivalnog tkiva i kontrole sprovedena je nakon opservacionih perioda od jednog sata, jednog, sedam i trideset dana. Preparati su bojeni klasičnom metodom – *Hematoksilin & Eozin* i analizirani su patohistološki. Zastupljenost kolagenih vlakana analizirana je pod polarizacionim svetlom. Ocena rezultata izvršena je semikvantitativno, na osnovu prisustva inflamatorne reakcije i fibroze tkiva, kao i eventualnih destruktivno-nekrotičnih promena

U *in vitro* istraživanju je potvrđena pretpostavka da vijabilnost i oporavak ćelijske kulture zavise od koncentracije ispitivanih rastvora, dužine njihovog dejstva, kao i od tipa primenjenog materijala. Sa porastom koncentracije i dužine dejstva ispitivanih rastvora sredstava za retrakciju gingive vijabilnost ćelija statistički je značajno opadala, što govori u prilog potencijalne toksičnosti ispitivanih materijala. Rastvori komercijalno dostupnih retrakcionih sredstava pokazali su se ne do blago citotoksičnim pri najmanjim koncentracijama (5% i 10%) i nakon opservacionih perioda od tri i šest minuta. Sa druge strane, ozbiljan citotoksični efeket primećen je nakon desetominutnog dejstva viših koncentracija (25% i 50%) rastvora materijala na bazi aluminijum hlorida. Rezultati studije dokazali su najmanji citotoksični efeket alternativnog sredstva za retrakciju gingive na bazi tetrahidrozolina. I kod ove vrste materijala uočen je pad vijabilnosti ćelija sa porastom dužine dejstva i koncentracije rastvora.

Komparativna analiza pokazala je statističko značajno više vrednosti intenziteta redukcije MTT-a neposredno nakon dejstava retrakcionih sredstava u odnosu na rezultate

dobijene nakon oporavka ćelija. Uzevši u obzir nizak citotoksični efekat tetrahidrozolina, rezultati oporavka ćelija u kulturi bili su očekivano pozitivni. Nasuprot tome, signifikantno više vrednosti ćelijske vijabilnosti neposredno posle dejstava komercijalnih sredstava u odnosu na vrednosti nakon dodatne inkubacije ćelija govore o prolongiranom štetnom uticaju preparata aluminijum hlorida i o mogućnosti pokretanja sekundarnog inflamatornog odgovora.

Rezultati *in vivo* istraživanja ukazali su na reverzibilno oštećenje gingivalnog tkiva posle lokalne aplikacije materijala na bazi aluminijum hlorida i adrenalina. Značajnijih promena u strukturi tkiva jedan sat nakon uklanjanja nije bilo. Međutim, njihova upotreba dovela je do akutnog inflamatornog odgovora nakon opservacionog perioda od jednog i sedam dana. Posle trideset dana uočena je reparacija oštećenog tkiva. Inflamatorne promene nastale aplikacijom tetrahidrozolina bile su značajno slabijeg intenziteta u odnosu na aluminijum hlorid i adrenalin i rezultovale su uznapređovalim ozdravljenjem nakon sedmodnevnog i potpunom reparacijom tkiva nakon tridesetodnevnog opservacionog perioda. Tetrahidrozolin se pokazao biološki prihvatljivijim u odnosu na ispitivana retrakciona sredstva.

Preparat na bazi tetrahidrozolina pokazao je veći stepen biokompatibilnosti u uslovima *in vitro* i *in vivo*, što ga preporučuje za upotrebu u svakodnevnoj stomatološkoj praksi. U cilju prevencije oštećenja gingivalnog tkiva neophodno je smanjenje koncentracije upotrebljenog sredstva za retrakciju gingive ispiranjem gingivalnog sulkusa fiziološkim rastvorom ili vodenim sprejom, smanjenje trajanja retrakcione procedure na tri do šest minuta, kao i kontrolisano brušenje zuba sa što manjim oštećenjem tkiva.

Ključne reči: gingiva, retrakciona procedura, aluminijum hlorid, adrenalin, tetrahidrozolin

Naučna oblast: Stomatologija

Uža naučna oblast: Bazična stomatologija

UDK: 616.311.2

APPLICATION EFFECTS OF GINGIVAL RETRACTION AGENTS ON EXPERIMENTAL MODELS

Summary

When creating fixed prosthetic devices it is necessary to respect the integrity of the periodontal structures and ensure maximum possible accuracy at the junction site of artificial crown and biological tissue. When the preparation border area is situated at the level or below the gingival margin, demarcation line should be made by reversible temporary shift in apical direction to enable access of impression material. The most commonly used gingival retraction agents are astringents (metal salts) and vasoconstrictors (adrenalin). They are applied in the gingival sulcus of prepared tooth, thus dilating and drying it out and creating optimal conditions for impression taking in indirect dental restoration. Given that the retraction agents are in direct contact with the gingival tissue their biocompatibility is of primary importance.

Biocompatibility of dental materials implies the capability of performing a specific function in the oral cavity without causing side effects. However, it was established that the retraction agents might have iatrogenic effect on gingival tissue, especially if the patient had already had periodontal disease or was prone to such problems. The use of adrenalin may cause systemic reactions of the organism.

The study was based on the assumption that commercially available gingival retraction agents exhibit some toxic effect on the surrounding tissues, and the degree of damage varies depending on the type, concentration and the effect duration. Biologically acceptable gingival retraction agents based on aluminum chloride and adrenalin should be sought among sympathomimetic vasoconstrictors (tetrahydrozoline).

The aim of the study was comparison analysis of potentially toxic effects of gingival retraction agents and tetrahydrozoline *in vitro* and *in vivo* conditions.

The tested material included three agents used for gingival retraction in dental practice: two materials based on aluminum chloride (10% and 25% solution), 8% adrenalin and 0.05% tetrahydrozoline solution.

Biocompatibility of gingival retraction agents was examined under *in vitro* conditions on *MDCK* (Madin-Darby canine kidney) continuous cell line and under *in vivo* conditions on experimental animals. *MDCK* cells may be considered analogous to gingival epithelial cells, and the structure of gingival tissue and the depth of gingival sulcus of the rabbit is almost identical to that in humans.

The effect of retraction agents and tetrahydrozoline on the viability and recovery of *MDCK* cell line was observed using *vital staining with trypan blue* and non-standard *MTT assay*. The solutions of the examined retraction materials obtained by dilution in Ringer solution in 5%, 10%, 25% and 50% concentrations were used. Measurements of the intensity of MTT reduction were performed immediately after a three, six and ten minute effect period of materials to determine the viability, or after a period of one day of cell recovery in a nutritious medium to determine the degree of recovery of cells. The values obtained in *in vitro* conditions represented the basis for the statistical analysis and were analyzed by SPSS 15.0. The analysis of variance (ANOVA) was used followed by Post-Hoc analysis, and the levels of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Quantitative changes in cell viability were presented descriptively as well.

In vivo research included the effect of retraction agents and tetrahydrozoline on gingival tissue of experimental rabbits. The procedure and the seven minute application period were identical to clinical setting. The negative control (absence of intervention) and a false treatment (application of retraction floss without test agent) were predicted. The biopsy of gingival tissues and control was carried out after the observational period of one hour, one, seven and thirty days. The preparations were stained by means of traditional method – *Hematoxylin & Eosin* and analyzed histologically. The distribution of collagen fibers was determined under polarizing light. Evaluation of the results was performed semiquantitatively, based on the presence of inflammatory reaction and fibrosis tissue, as well as destructive-necrotic changes

In an *in vitro* study the hypothesis was proved that the viability and recovery of the cell culture depended on the concentrations of the examined solution, the effect duration, as well as the type of the applied material. As the concentration and duration of action of the tested solutions of gingival retraction agents increased the cell viability statistically significantly decreased, indicating the potential toxicity of tested materials. Solutions of commercially available retraction agents proved to have no cytotoxic or slightly cytotoxic effect at the lowest concentrations (5% and 10%) and upon the observational period of three and six minutes. On the other hand, serious cytotoxic effect was observed after a ten-minute period at higher solution concentrations (25% and 50%) based on aluminum chloride. The results of the study proved the lowest cytotoxic effect of alternative gingival retraction agents based on tetrahydrozoline. In this type of material, decline of cell viability with an increase of effect duration and solution concentration was noticed as well.

Comparison analysis showed statistically significant higher values of intensity reduction of MTT immediately after effects of retraction agents compared to the results obtained after the cell recovery. Taking into account the fact that cytotoxic effect of tetrahydrozoline was low, the results of cell recovery in culture were expectedly positive. In contrast, significantly higher values of cell viability immediately after the effects of commercial agents in relation to the values after further incubation of cells indicated the prolonged harmful effects of aluminum chloride and the possibility of initiating a secondary inflammatory response.

The results of *in vivo* research pointed to the reversible damage of gingival tissue after local application of materials based on aluminum chloride and adrenalin. An hour after the removal no significant changes in the tissue structure were found. However, their use resulted in an acute inflammatory response after the observation period of one and seven days. After thirty days reparation of the damaged tissue was observed. Inflammatory changes due to tetrahydrozoline application were of significantly lower intensity compared to aluminum chloride and adrenalin and resulted in advanced healing after seven day observation period and full tissue reparation tissue after thirty day observation period. Tetrahydrozoline proved to be biologically more acceptable in relation to the retraction agents tested.

The preparation based on tetrahydrozoline showed a higher degree of biocompatibility *in vitro* and *in vivo* conditions, and is therefore recommended for everyday use in dental practice. In order to prevent damage to the gingival tissue it is necessary to decrease the concentration of the agent used for gingival retraction by rinsing gingival sulcus with saline or water spray, reduce the duration of the retraction procedure to three to six minutes, as well as controlled teeth preparing with minimal tissue damage.

Key words: gingiva, retraction procedure, aluminijum chloride, adrenalin, tetrahydrozolin

The scientific field: Dentistry

Special topics: Basic Dentistry

UDC: 616.311.2

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVODNE NAPOMENE | 1 |
| 2. PREGLED LITERATURE | 2 |
| 2.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE GINGIVALNOG TKIVA | 2 |
| 2.1.1. Anatomija i histologija gingive | 2 |
| 2.1.2. Oštećenja tkiva parodonta | 4 |
| 2.2. UZIMANJE OTISKA GRANICE PREPARACIJE ZUBA | 5 |
| 2.3. SREDSTVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE | 8 |
| 2.3.1. Uloga sredstava za retrakciju gingive | 8 |
| 2.3.2. Adstrigensna retrakciona sredstva | 9 |
| 2.3.3. Vazokonstriktorna retrakciona sredstva | 9 |
| 2.3.4. Alternativna retrakciona sredstva | 11 |
| 2.4. BIOKOMPATIBILNOST SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE | 12 |
| 2.4.1. Savremeni koncept ispitivanja biokompatibilnosti stomatoloških materijala | 12 |
| 2.4.2. <i>In vitro</i> ispitivanje biokompatibilnosti materijala u stomatologiji | 14 |
| 2.4.3. <i>In vivo</i> ispitivanje biokompatibilnosti materijala u stomatologiji | 21 |
| 2.4.4. Interakcije tkiva sa ispitivanim materijalom | 22 |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 23 |
| 4. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA | 24 |
| 5. MATERIJAL I METODE | 25 |
| 5.1. ISPITIVANJE DEJSTVA SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE NA <i>IN VITRO</i> EKSPERIMENTALNIM MODELIMA | 25 |
| 5.1.1. Ispitivani materijal | 25 |
| 5.1.1.1. Ispitivana sredstva za retrakciju gingive | 25 |
| 5.1.1.2. Čelijska kultura | 25 |
| 5.1.2. Metode ispitivanja | 27 |
| 5.1.3. Eksperimentalni dizajn | 28 |
| 5.1.3.1. Ispitivanje citotoksičnog efekta sredstava za retrakciju gingive | 28 |
| 5.1.3.2. Ispitivanje sposobnosti ćelija da se oporave od delovanja sredstava za retrakciju gingive | 28 |
| 5.1.4. Tumačenje dobijenih rezultata | 29 |
| 5.2. ISPITIVANJE DEJSTVA SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE NA <i>IN VIVO</i> EKSPERIMENTALNIM MODELIMA | 30 |
| 5.2.1. Ispitivani materijal | 30 |
| 5.2.1.1. Ispitivana sredstva za retrakciju gingive | 30 |
| 5.2.1.2. Eksperimentalne životinje | 30 |
| 5.2.2. Metode ispitivanja | 31 |
| 5.2.3. Eksperimentalni dizajn | 31 |
| 5.2.3.1. Aplikacija ispitivanog materijala | 31 |
| 5.2.3.2. Biopsija treriranog tkiva | 33 |
| 5.2.4. Tumačenje dobijenih rezultata | 34 |

| | |
|--|----|
| 6. REZULTATI..... | 35 |
| 6.1. REZULTATI ISPITIVANJA CITOTOKSIČNOG DEJSTVA SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE NA <i>IN VITRO</i> EKSPERIMENTALNIM MODELIMA ... | 35 |
| 6.1.1. Rezultati ispitivanja intenziteta redukcije MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora sredstava za retrakciju gingive | 35 |
| 6.1.1.1. Redukcija MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora RS za period inkubacije od tri minuta..... | 35 |
| 6.1.1.2. Redukcija MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora RS za period inkubacije od šest minuta..... | 37 |
| 6.1.1.3. Redukcija MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora RS za period dejstva od deset minuta | 39 |
| 6.1.2. Rezultati ispitivanja uticaja dužine dejstva rastvora za retrakciju gingive na intenzitet redukcije MTT-a | 41 |
| 6.1.2.1. Redukcija MTT-a u zavisnosti od dužine dejstva različitih koncentracija rastvora <i>Visine</i> | 41 |
| 6.1.2.2. Redukcija MTT-a u zavisnosti od dužine dejstva različitih koncentracija rastvora <i>Retrargin</i> | 43 |
| 6.1.2.3. Redukcija MTT-a u zavisnosti od dužine dejstva različitih koncentracija rastvora <i>Gingival Liquid</i> | 45 |
| 6.1.3. Rezultati ispitivanja uticaja vrste rastvora za retrakciju gingive na intenzitet redukcije MTT-a | 47 |
| 6.1.3.1. Redukcija MTT-a u prisustvu 5% rastvora različitih RS..... | 47 |
| 6.1.3.2. Redukcija MTT-a u prisustvu 10% rastvora različitih RS..... | 48 |
| 6.1.3.3. Redukcija MTT-a u prisustvu 25% rastvora različitih RS..... | 50 |
| 6.1.3.4. Redukcija MTT-a u prisustvu 50% rastvora različitih RS..... | 52 |
| 6.2. OPORAVAK ĆELIJA PRAĆEN 24 ČASA NAKON DELOVANJA SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE | 54 |
| 6.2.1. Rezultati ispitivanja sposobnosti ćelija da se oporave nakon delovanja sredstava za retrakciju gingive | 54 |
| 6.2.1.1. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od koncentracije rastvora RS nakon 24 h oporavka od trominutnog dejstva RS..... | 54 |
| 6.2.1.2. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od koncentracije rastvora RS nakon 24 h oporavka od šestominutnog dejstva RS | 56 |
| 6.2.1.3. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od koncentracije rastvora RS nakon 24 h oporavka od desetominutnog dejstva RS | 57 |
| 6.2.2. Rezultati ispitivanja sposobnosti ćelija da se oporave nakon različite dužine delovanja sredstava za retrakciju gingive | 59 |
| 6.2.2.1. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od dužine dejstva rastvora <i>Visine</i> nakon 24 h oporavka..... | 59 |
| 6.2.2.2. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od dužine dejstva rastvora <i>Retrargin</i> nakon 24 h oporavka..... | 61 |
| 6.2.2.3. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od dužine dejstva rastvora <i>Gingival</i> <i>Liquid</i> nakon 24 h oporavka | 63 |
| 6.2.3. Rezultati ispitivanja sposobnosti ćelija da se oporave nakon delovanja različitih vrsta sredstava za retrakciju gingive..... | 65 |
| 6.2.3.1. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od dužine dejstva 5% rastvora različitih RS nakon 24 h oporavka..... | 65 |

| | |
|--|-----|
| 6.2.3.2. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od dužine dejstva 10% rastvora različitih RS nakon 24 h oporavka..... | 67 |
| 6.2.3.3. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od dužine dejstva 25% rastvora različitih RS nakon 24 h oporavka..... | 69 |
| 6.2.3.4. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od dužine dejstva 50% rastvora različitih RS nakon 24 h oporavka..... | 70 |
| 6.3. POREĐENJE REZULTATA ISPITIVANJA CITOTOKSIČNOSTI SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE NA <i>IN VITRO</i> EKSPERIMENTALNIM MODELIMA | 72 |
| 6.3.1. Rezultati ispitivanja redukcije MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora sredstva za retrakciju gingive | 72 |
| 6.3.1.1. Zavisnost redukcije MTT-a od koncentracije rastvora RS nakon trominutnog dejstva na ćelije bez i nakon njihove naknadne inkubacije..... | 72 |
| 6.3.1.2. Zavisnost redukcije MTT-a od koncentracije rastvora RS nakon šestominutnog dejstva na ćelije bez i nakon njihove naknadne inkubacije..... | 74 |
| 6.3.1.3. Zavisnost redukcije MTT-a od koncentracije rastvora RS nakon desetominutnog dejstva na ćelije bez i nakon njihove naknadne inkubacije | 75 |
| 6.4 REZULTATI ISPITIVANJA DEJSTVA SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE NA <i>IN VIVO</i> EKSPERIMENTALNIM MODELIMA | 77 |
| 6.4.1. Patohistološki nalaz gingivalnog tkiva nakon opservacionog perioda od jednog časa | 78 |
| 6.4.2. Patohistološki nalaz gingivalnog tkiva nakon opservacionog perioda od jednog dana | 80 |
| 6.4.3. Patohistološki nalaz gingivalnog tkiva nakon opservacionog perioda od sedam dana | 83 |
| 6.4.4. Patohistološki nalaz gingivalnog tkiva nakon opservacionog perioda od trideset dana..... | 83 |
| 7. DISKUSIJA | 87 |
| 7.1. BIOKOMPATIBILNOST SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE..... | 87 |
| 7.2. DEJSTVA SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE NA <i>IN VITRO</i> EKSPERIMENTALNIM MODELIMA | 88 |
| 7.3. DEJSTVA SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE NA <i>IN VIVO</i> EKSPERIMENTALNIM MODELIMA | 96 |
| 8. ZAKLJUČCI..... | 104 |
| 9. LITERATURA | 105 |

1. UVODNE NAPOMENE

Parodont čini nekoliko različitih tkiva koja okružuju zub i pružaju mu potporu, čime omogućuju njegovu funkciju. Sastavljen je od gingive, periodoncijuma, cementa i alveolarne kosti (Zelić 2006, Chandra 2007). Njegove fiziološke uloge su: potporna (preko njega se ostvaruje biološka i mehanička veza sa alveolom), formativna (koju obavljaju ćelije osteoblasti, fibroblasti i cementoblasti omogućavajući visok reparatorni potencijal potpornih struktura), nutritivna (arterijskim krvnim sudovima), neurosenzorna i zaštitna uloga (prihvata i amortizuje različite sile koje deluju na zub) (Đajić 1990). Oboljenja ovih tkiva su parodontalna oboljenja (Kaufman 2001, Weinmann 2011). U njihovoj etiopatogenezi najčešće se pominje infekcija, ali se, svakako, ne mogu zanemariti i drugi mogući uzročnici poput traume, hemijskih ili termičkih oštećenja (Ranney 1993, Armitage 1999, Lamster 2001, Kavar 2011). S obzirom da je dejstvu nepoželjnih faktora zbog svoje pozicije prvenstveno izložena gingiva, sva parodontalna oboljenja inicijalno nastaju kao upala desni ili gingivitis. Ukoliko se na vreme ne sanira gingivitis konsekutivno vodi u parodontopatiju (Kaufman 2001, Immamura 2003, Weinmann 2011).

Da bi se sprečila dublja oštećenja parodonta zuba posebnu pažnju treba usmeriti ka očuvanju zdravlja gingive u toku stomatoloških intervencija. Istraživanja brojnih autora ukazuju da retrakciona procedura koja je uobičajena kod uzimanja otiska za indirektnu protetičke restauracije (veštačke krunice i mostove) može da dovede do oštećenja tkiva gingive (Azzi 1983, Nemetz 1984, Weir 1984, Benson 1986, de Gennaro 1987, Kopač 2002, Akca 2006, Kumbuloglu 2007, Al Hamad 2008). U savremenoj stomatološkoj praksi kao sredstva za retrakciju gingive koriste se adstrigensi (soli aluminijuma) i epinefrin (de Gennaro 1982, Woody 1993, Nowakowska 2007). Svrha ovog istraživanja bila je uporedna analiza njihovog potencijalno toksičnog dejstva na *in vitro* i *in vivo* eksperimentalnim modelima, kao i komparacija njihovog dejstva sa alternativnim sredstvom za retrakciju gingive, tetrahidrozolinom. Rezultati istraživanja doprinose u odabiru optimalnog sredstva za retrakciju gingive koje će uz maksimalan klinički efekat pokazati minimalna neželjena dejstva.

2. PREGLED LITERATURE

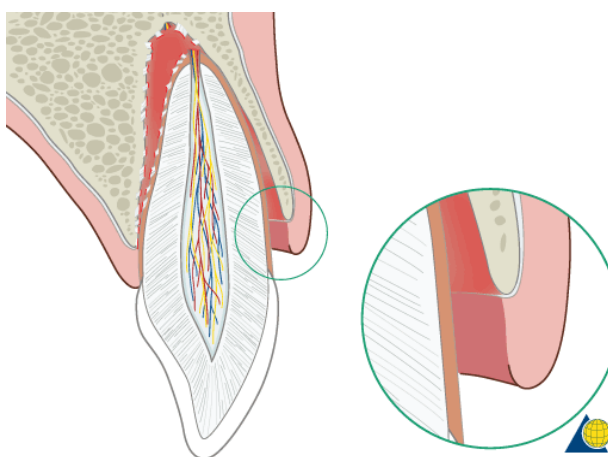
2.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE GINGIVALNOG TKIVA

2.1.1. Anatomija i histologija gingive

Gingiva ili desni je deo mastikatorne sluzokože koja prekriva alveolarne nastavke gornje i donje vilice i cement korena zuba (Obradović 2005). Deli se na slobodnu (marginalnu), interdentalnu i pripojnu gingivu (slika 1) (Zelić 2006, Orlov 2007).

Slobodna gingiva nije pripojena za podlogu i ona poput kragne obavija vrat zuba. Svetloružičaste je boje, talasasta i visoka oko 0,5-2 mm (Obradović 2005). Sa vestibularne i oralne strane zuba u koronarnom smeru završava se ivicom desni, dok se apikalno pruža do nivoa dna gingivalnog sulkusa, gde se nastavlja pripojnom gingivom. Na aproksimalnim površinama slobodna gingiva prelazi u interdentalnu papilu. Površina slobodne gingive okrenuta prema usnoj duplji (oralna površina) prekrivena je oralnim epitelom dok je površina okrenuta prema zubu unutrašnja i pokrivena je sulkusnim epitelom (Shoeder 1997, Dale 2002).

Prostor između unutrašnje površine gingive i zuba otvoren prema usnoj duplji naziva se gingivalni sulkus (slika 2). Njegova dubina odgovara širini slobodne gingive (do 2 mm). To je plitak kapilarni prostor čiji spoljašnji zid gradi slobodna gingiva, a unutrašnji zid čini gleđ zuba. Gingivalni sulkus počinje od ivice slobodne gingive i ide u apikalnom smeru do koronarnog kraja pripojnog epitela (Prassana 2013).



Slika 2. Gingivalni sulkus

Iz tkiva slobodne gingive u gingivalni sulkus luči se tečnost nazvana gingivalni fluid, čija je uloga, pre svega, odbrambena (Uitto 2003). Naime, gingivalni fluid mehanički ispira

gingivalni sulkus, odstranjuje mikroorganizme i strana tela (Wostmann 2008). Kako sadrži antitela, neke aminokiseline i proteine, to mu se pripisuje i humoralna odbrambena funkcija. Gingivalni fluid, zahvaljujući tome što sadrži neke lepljive proteine, može u izvesnoj meri da pomogne adheziju sulkusnog epitela za površinu zuba, sprečavajući infekciju i traumatska oštećenja mekih tkiva (Sanders 2009).

Sa druge strane, prisustvo gingivalnog fluida može imati i neka neželjena dejstva kao što su stvaranje uslova za razvoj mikroorganizama u sulkusu. Kalcijumove soli gingivalnog sulkusa dovode do kalcifikacije dentalnog plaka i stvaranja zubnog kamenca i konkremenata (Zelić 2006, Prassana 2013).

Deo slobodne gingive koji popunjava trouglaste prostore između dva susedna zuba naziva se interdentalna ili gingivalna papila (Đajić 1990).

Pripojna (fiksirana) gingiva čvrsto je pripojena za podlogu (cement zuba i alveolarnu kost), tako da je potpuno nepokretna. Granicu između pripojne i slobodne gingive čini zamišljena ravan koja prolazi kroz dno gingivalnog sulkusa. Spolja pripojna gingiva prelazi u sluzokožu usana i obraza, a njena unutrašnja strana se nastavlja na sluzokožu nepca i podjezičnu regiju (Đajić 1990, Zelić 2006).

Gingiva se histološki sastoji iz epitela i krzna (Kuburović 2003, Lačković 2012).

Epitel gingive je pločastoslojevit. U zavisnosti od funkcija pojedinih delova gingive razlikuju se tri vrste epitela (Đajić 1990):

1. oralni epitel gingive koji prekriva pripojnu gingivu do slobodne ivice gingive
2. sulkusni epitel na spoljašnjem zidu gingivalnog sulkusa
3. pripojni epitel koji se u vidu prstena pruža čvrsto pripojen oko celog vrata zuba u visini od 0,25 do 1,35 mm. Vezu pripojnog epitela i zuba čini specijalizovana membrana i hemodezmomi (Hormia 2001, Chandra 2006).

S obzirom da je u toku žvakanja izložen pritisku i trenju hrane oralni epitel gingive orožava, a papile krzna su izraženije te je prelaz epitela u vezivno tkivo (bazalna membrana) talasast. Sulkusni i pripojni epitel ne pokazuju znake keratinizacije.

Krznno gingive je vezivno tkivo između epitela i periosta alveolarne kosti podeljeno u dva sloja papilarni i retikularni. Papilarni sloj smešten je neposredno ispod bazalne membrane i u vidu ispupčenja prodire u epitelni omotač. Retikularni sloj krzna kompaktniji je i bogatiji vlaknima grupisanim u snopove koji se pružaju u svim pravcima i različitim ćelijskim elementima. Osnovu krzna gingive čine kolagena vlakna (do 60%), dok su retikulinska, elastična i oksitalanska manje zastupljena (Zappa 1995). Retikulinska vlakna smeštena su ispod bazalne

membrane i predstavljaju mlada kolagena vlakna. Elastična vlakna se nalaze uz krvne sudove, mnogobrojna su i ne obrazuju snopove. Oksitalanska vlakna pružaju potporu krvnim sudovima gingive.

Fibroblasti su zvezdaste ćelije raspoređene uz snopove kolagenih vlakana i čine 65% ćelijske populacije krzna gingive (Zappa 1995). Ukoliko je gingiva klinički zdrava u tkivu se nalazi malo inflamatornog infiltrata (neutrofilnih leukocita i mastocita) prevashodno smeštenog u zoni pripojnog epitela u vidu prve linije odbrane (Schoeder 1997, Oksonen 2001). U gingivalnom tkivu se mogu naći i mali limfociti, prvenstveno T tipa (Zappa 1995).

Gingiva je bogato vaskularizovana i inervisana (Dannen 2003).

2.1.2. Oštećenja tkiva parodonta

Oštećenja desni dovode do zapaljenskih promena koje se označavaju kao gingivitis (Page 1986, Hughfield 2009). Ako se na vreme ne sanira naizgled beznačajna upala desni prelazi u hroničnu inflamaciju (gingivitis chronica), koja dovodi do atrofije desni i ogoljavanja vrata zuba (Robinson 1995, Fenesy 1998). Ovo je ozbiljan estetski, ali i zdravstveni problem, s obzirom da je to pogodno mesto za razvoj karijesa. Takvi zubi izgledaju duži i gube svoju osnovnu anatomsku formu. Dalja destrukcija parodonta dovodi do formiranja parodontalnih džepova (Page 1997). Parodontalni džepovi nastaju kidanjem periodontalnih vlakana koja spajaju koren zuba i kost vilice i mesto su česte infekcije jer se u njima se zadržava hrana. Kao rezultat nelečenih oboljenja parodonta nastaju komplikacije, jako bolni parodontalni apscesi, pa je često neophodna i ekstrakcija zuba (Lamster 2001, Kavar 2011, Weinmann 2011). Oboljenja parodonta, na kraju, rezultiraju klaćenjem, migracijom i ispadanjem zuba.

Pripojni epitel predstavlja najinteresantniju strukturu gingivalnog tkiva gledano sa stanovišta razvoja parodontalnih bolesti (Bosshardt 2005). On je smešten na samoj granici mekih i mineralizovanih tkiva parodonta, što ukazuje na njegovu neospornu ulogu u tkivnoj homeostazi i odbrani od mikroorganizama i njihovih produkata (Saito 1981, Senevirante 2011). Svako njegovo oštećenje infekcijom, hemijskim, termičkim ili mehaničkim putem, predstavlja transformaciju gingivalnog sulkusa u parodontalni džep (Ranney 1993, Dale 2002, Hughfield 2009).

2.2. UZIMANJE OTISKA GRANICE PREPARACIJE ZUBA

Uzimanje kvalitetnog otiska za fiksne stomatološke radove (krunice i mostove) podrazumeva precizno otiskivanje predela demarkacione linije, čime je obezbeđeno besprekorno naleganje marginalne ivice veštačke krune na strukture zube i maksimalno smanjena mogućnost postojanja marginalne pukotine (Ackerman 1997, Donovan 2004, Beier 2009). Odsustvo diskrepance između protetičke nadoknade i brušenog zuba neophodna je sa kako sa terapijskog stanovišta fiksnim zubnim protezama, tako i u cilju prevencije eventualnih, budućih oštećenja tvrdih zubnih tkiva (Shannon 2002, Al Ani 2010). Spoj između cementirane fiksne nadoknade i zuba uvek je potencijalno mesto za razvoj sekundarnog karijesa zbog rastvaranja cementnog filma. Nadoknada neprecizno adaptirana prema strukturama zuba uzrok je nastanka parodontalnih oboljenja (Trifunovic 1998, Goldberg 2001).

Ukoliko se pravilno koriste, savremeni otisni materijali pokazuju izuzetnu preciznost čime je nastanak marginalne pukotine sveden na najmanji nivo (Bennani 2008). To se, pre svega, odnosi na grupu elastomera (polisulfidi, silikoni i polietri), ali i na nešto stariju grupu reverzibilnih hidrokoloida (Rubel 2007, Hamalian 2011). Otiskivanje površina brušenih zuba elastomernim materijalima izvodi se metodom dvostrukog otiska u standardnoj kašici ili jednofaznog otiska uz primenu individualne kašike (Hamalian 2011).

Zdravlje parodontalnih tkiva blisko je povezano sa kvalitetom marginalnog naleganja fiksne nadoknade, što sa druge strane, zavisi od tehnike uzimanja otiska (Wostmann 2008). Kvalitet otiska direktno zavisi od kliničkih parametara kao što su lokacija demarkacione linije, zdravlje potpornog aparata zuba, kao i krvavljenje iz gingivalnog sulkusa za vreme uzimanja otiska (Ackerman 1997, Radlović 1998,). Na pravilno otiskivanje područja demarkacione linije lokalizovane subgingivalno treba obratiti posebnu pažnju (Goldberg 2001, Wostmann 2008). Uzimajući u obzir sve prednosti supragingivalne preparacije demarkacione linije (lakše formiranje i uzimanje otiska, manje oštećenje okolnih mekih tkiva i bolja kontrola rubnog zatvaranja nadoknade), subgingivalna preparacija neophodna je čak u 50% slučajeva (Trifunović 1998). Razlozi koji uslovljavaju subgingivalnu lokalizaciju preparacije jesu: karijes u predelu vrata zuba, prethodne nadoknade sa subgingivalnim rubom, pobošanje retencije i rezistencije nadoknade, subgingivalna fraktura zuba, hipersenzitivnost vratnog dela zuba i bolji estetski efekat (Radlović 1998).

Za adekvatno otiskivanje predela demarkacione linije brušenog zuba, smeštene u ili ispod nivoa gingivalne ivice neophodna je dilatacija gingivalnog sulkusa i njegovo isušivanje (Igraham 1981, Wostmann 2008). Naime, da bi se obezbedila dimenzionalna stabilnost i maksi-

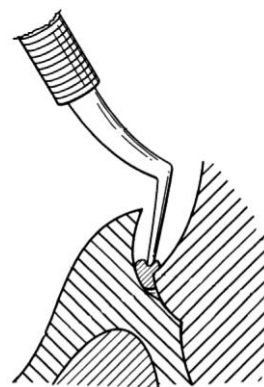
malna preciznost otiska reverzibilnim hidrokolidima i elastomernim materijalima potrebno je osloboditi predeo oko vrata zuba kako bi se otisnom materijalu dozvolio prodor u prostor između brušenog dentina, odnosno cementa zuba i zida gingivalnog sulkusa (Jokstad 1999, Shannon 2002). Otisnim materijalom tkiva se nežno i atraumatski potisnu, da bi se nakon retrakcione procedure i uzimanja otiska vratila u prvobitni položaj (Goldberg 2001).

Cilj reverzibilnog otvaranja gingivalnog sulkusa je (Laufer 1997, Bowley 1998):

1. Precizno otiskivanje predela demarkacije linije ukoliko je ona smeštena u nivou gingive ili u subgingivalnom prostoru.
2. Obezbeđivanje prostora za smeštanje dovoljne debljine elastičnog materijala između zuba i zida gingivalnog sulkusa. Optimalna debljina i krutost otisnog materijala bitno ne remeti kapilarni prostor gingivalnog sulkusa, uz izbegavanje cepanja i deformacije materijala nakon vađenja iz podminiranih prostora. Prasad i sar. (2011) navode da je za preciznost silikonskih elastomera neophodna horizontalna dilatacija gingivalnog sulkusa od 0,2 mm.
3. Elasoneri su hidrofobni materijali, tako da je neophodno isušivanje površine zuba od krvi i gingivalne tečnosti za vreme uzimanja otiska.

U cilju ekspozicije cervikalnog predela brušenog zuba koristile su se različite tehnike (Azzi 1983, Donovan 2004, Beter 2009). Izbor retrakcione tehnike zavisi od kliničkog slučaja (Pergola 1983, Nemetz 1990). Osamdesetih godina prošloga veka Benson je retrakcione tehnike podelio na mehaničku i mehaničko-hemijsku, elektrohiruršku i gingivalnu kiretažu. Gingivalna kiretaža i elektrohirurgija nisu naišle na širu praktičnu primenu zbog agresivnijeg pristupa i komplikovanosti zahvata (Tosches 2009).

Danas najčešće korišćena tehnika retrakcije gingive jeste mehaničko-hemijska (Albaker 2010, Al-Ani 2010). Mehanička komponenta podrazumeva korišćenje retrakcionog konca, kako bi se obezbedila kompresija tkiva i jednaka koncentracija retrakcionog sredstva (RS) u svim delovima gingivalnog sulkusa (slika 3). Debljina retrakcionog konca u funkciji je dubine gingivalnog sulkusa, što zavisi od parodontalnog statusa pacijenta (Abadzjev 2009). Na tržištu se nalaze retrakcioni konci različitih debljina (000, 00, 0, 1,2). Dužina upo-



Slika 3. Potiskivanje retrakcionog konca u gingivalni sulkus plastičnim instrumentom

trebljenog konca odgovara obimu vrata zuba, a one se u vidu omče u sulkus plasira posebnim instrumentom ili Hajdemanovom špatulom. Uloga retrakcionih sredstava (RS) je privremeno vertikalno i lateralno potiskivanje gingivalnog tkiva, kao i kontrola krvarenja i protoka fluida u gingivalnom sulkusu) (Jokstad 1999, Shannon 2002, Abadzjev 2009) (slika 4).



Slika 4. Mehaničko-hemijska metoda retrakcije gingive

U tu svrhu danas se koriste vazokonstriktori (adrenalin) i adstrigensi (aluminijum hlorid, aluminijum sulfat, cink hlorid). Njihovo dejstvo ograničeno je na tri do deset minuta (Nementz 1984, Nowakowska 2006). Od upotrebljenog RS očekuje se maksimalna efikasnost, bez ireverzibilnih oštećenja lokalnog tkiva i neželjenih sistemskih efekata (Benson 1986).

Korišćenje retrakcionog konca bez impregnacionog sredstva (mehanička retrakcija) pokazuje manji terapijski efekat (Kumbuloglu 2007, Beler 2009). Retrakcioni konac je izuzetno tanak (0,3-0,4mm) i isključivo mehanički pomera marginalnu gingivu. Aplikacija retrakcionog konca ni u kom slučaju ne sme ugroziti integritet „biološke širine“, odnosno prostora koji tkivo gingive zauzima iznad alveolarne kosti (Gargiulo 1961). Nedostatak ove metode je brzo zatvaranje (kolabiranje) gingivalnog sulkusa, odsustvo hemostaze i opasnost od infekcije (Prasad 2011). Preporučuje se u slučaju plitkog gingivalnog sulkusa, ili u modifikacijama otisnih postupaka kada konac zaostaje u sulkusu za vreme otiskivanja (Uhač 2004).

Elektrohrurška retrakcija gingive podrazumeva primenu visokofrekventne struje (1-4 MHz), koja izaziva efekat dijatermije, tj. povišenje unutrašnje temperature uz koagulaciju ćelija i bez dubljih oštećenja tkiva (Bowley 1998, Uhač 2004). S obzirom da predstavlja jako agresivnu metodu, elektrohirurška retrakcija može trajno da ošteti tkiva parodonta (Phatale 2010).

Najnovija hemijska retrakciona metoda se zasniva na korišćenju retrakcionih pasti i gelova, čime se postižu zadovoljavajući rezultati bez mehaničke traumatizacije gingive (Beler, 2009). Potiskivanje marginalne gingive ostvaruje se selektivnim pritiskom mase određene viskoznosti i volumena u spomenuto područje. Osnovu retrakcijske mase čini kaolin ili sitne vlaknaste strukture, koji svojom konzistencijom izaziva mehanički efekat, dok je aktivna komponenta je aluminijum hlorid (Poss 2002, Phatale 2010). Materijal se u prostor gingivalnog sulkusa aplikuje brizgalicom sa posebnim nastavkom. Nedostatak aplikacije hemijskog sredstva bez mehaničke potpore jeste manja efikasnost za gingivalne džepove dublje od

2 mm (Beler 2009). Istraživanja Manolakis i sar. (2004) ukazuju na značajano manje subjektivnih tegoba pacijenata (neugodnost, neprijatan miris i bol) kod primene paste u odnosu na retrakcioni konac. Wostmann i sar. (2004) ističu manji protok gingivalnog fluida nakon tretmana retrakcionom pastom u odnosu na ostale metode retrakcije gingive.

2.3. SREDSTVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE

2.3.1. Uloga sredstava za retrakciju gingive

Uloga RS jeste privremeno potiskivanje gingivalnog tkiva, kao i kontrola hemoragije i protoka gingivalnog fluida, čiji je balans uvek poremećen nakon marginalne preparacije zuba (Bowels 1991, Polat 2007). RS se koriste za ekspoziciju gingivalne demarkacione linije pri upotrebi konvencionalnih materijala ili CAD/CAM digitalno-optičkih tehnika, za fiksne protetske restauracije ili za adhezivne metode koje su jako popularne u estetskoj stomatologiji (Bennani 2008, Nowakowska 2010). Retrakcija perimplantantnog tkiva poželjna je i kod uzimanja otiska za izradu suprastruktura na implantatima (Bennani 2008). Da bi se smatralo optimalnim, RS treba da zadovolji sledeće kriterijume (Donovan 1985, Kostić 2012, Tarighi 2014):

1. Efikasnost, odnosno omogućavanje znatnog lateralnog i vertikalnog pomeranja gingivalnog tkiva, kontrolu hemoragije, kao i protoka gingivalne tečnosti.
2. Upotreba RS ne sme da značajno i trajno oštetiti okolno tkivo. Svaka manipulacija tkivom kao i njegov hemijski tretman rezultuju izvesnim oštećenjem tkiva. Međutim, to oštećenje treba da je reverzibilno, što znači da sledi potpuno histološko i kliničko ozdravljenje, u roku od 2 nedelje. Dozvoljeno definitivno apikalno pomeranje gingive, nakon mehaničko-hemijskog retrakcionog tretmana, ne sme biti veće $0,2 \pm 0,1$ mm (Phatale 2010).
3. Odsustvo sistemskih efekata, kao rezultata resorpcije RS u okolno tkivo. Količina resorbovanog materijala zavisi od vrste upotrebljenog materijala, maceracije gingivalnog tkiva i broja brušenih zuba.

Dejstvo konvencionalnih RS je adstrigensno i vazokonstriktorno (Woody 1993, de Nowakowska 2007).

2.3.2. Adstrigensna retrakciona sredstva

Adstrigensi su soli metala koje izazivaju gingivalnu retrakciju precipitacijom proteina i inhibicijom transkapilarnog kretanja plazma proteina (Fazekas 2002, Thomas 2011). Deluju tako što smanjuju ćelijsku permeabilnost i isušuju okolno tkivo, dovodeći da njegove reverzibilne recesije. Precipitacija proteina u fiziološkim uslovima deluje antihemoragijski, tako da se adstrigensi koriste kao hemostatici. Međutim, denaturisani proteini mogu dovesti do lokalnog oštećenja tkiva (Bowels 1991, Cowan 1992, Polat 2007). Sistemski efekti adstrigenasa nisu dokazani (Polat 2007).

RS na bazi aluminijuma imaju ulogu adstrigensa, smatraju se bezbednim i umereno efikasnim u potiskivanju gingivalnog tkiva. Najčešće se koriste aluminijum hlorid, aluminijum sulfat i alum (kalijum aluminijum sulfat ili aluminijum amonijum sulfat) (Poss 2002). Koncentracije preparata različite su i zavise od proizvođača. Istraživanja pokazuju potencijalnu toksičnost adstrigensnih soli aluminijuma u koncentracijama većim od 10% (Jokstad 1991, Kopač 2002).

Ređe upotrebljavani adstrigens je cink hlorid. On je, takođe, kaustičan, tako da se njegova upotreba koncentracijama većim od 20%, ne preporučuje (Bowels 1991).

Za razliku od preparata na bazi aluminijuma, ranije korišćeni ferisulfat ne daje željene kliničke rezultate. Ferisulfat koaguliše krv, ali se često hemoragija nakon uklanjanja konca ponovo javlja, stepen potiskivanja tkiva je nedovoljan, a produbljivanje sulkusa zanemarujuće (Baharav 1997). Nedostaci su mu obojenost tkiva i hemijska reakcija sa polietrima i silikonskim elastomerima (Wassell 2002, Csempeš 2003). Ferisulfat ima jako iritativno dejstvo kako na gingivalno tkivo, tako i na tkivo dentina koje, takođe, prebojava (Laud 1994, Concard 2009). Nije dozvoljena upotreba ovog sredstva u koncentraciji većoj od 20% (Cowan 1992), a oštećenja tkiva njegovom upotrebom su značajno veća u upoređenju sa aluminijum hloridom (Akca 2006). Zastupljenost ferisulfata u današnjoj stomatološkoj praksi veoma je mala (Nowakowska 2010).

Kako delovanje adstrigensnih RS traje nekoliko sati, nije dopušteno ponavljanje postupka u istoj poseti (Del Rocio 2001, Fayekas 2002).

2.3.3. Vazokonstriktorna retrakciona sredstva

Jedno od, do sada, najčešće upotrebljavanih RS je adrenalin (Harrison 1961, Fazekas 2002). Podaci Hansen i sar. ukazuju da je adrenalin drugoj polovini dvadesetog veka bio RS izbora većine američkih stomatologa (55-79%) (Hansen 1999). Adrenalin pokazuje lokalne

hemodinamičke efekte i veoma je efikasan vazokonstriktor koji aktivira simpatomimetičke α_1 receptore na perifernim krvnim sudovima izazivajući ishemijsku reakciju tkiva (Baab 1986, Matheny 1993, Uitto 2003). Lokalna vazokonstrikcija za posledicu ima i privremeno povlačenje, odnosno recesiju gingive (Felpel 1997, Patino-Marin 2005, Thomas 2011). Iako je jako RS jako efikasan, adrenalin kod mnogih pacijenata može dovesti do brojnih neželjenih efekata što znatno sužava njegovo indikaciono poručje.

Maksimalno preporučena doza epinerfina za srčane bolesnike iznosi 0,04 mg, što je količina koja se prosečno nalazi u 2 karpule lokalnog anestetika sa vazokonstriktorom, razblaženja 1:100000. Za zdrave pacijente maksimalna dozvoljena doza adrenalina iznosi 0,2mg (Donovan 1985, Csillag 2007). Resorpcija adrenalina je različita u zavisnosti od intaktnosti gingivalnog epitela. Madrid i sar. (2003) su pokazali da je intaktan cervikalni gingivalni epitel efikasna barijera za adrenalin vezan za proteine plazme. Svaki konac impregniran ADERENALINom sadrži 0,2 do 1 mg adrenalina, u zavisnosti od dijametra i proizvođača. To je 2,5 puta veća doza ovog vazokonstriktora preporučena za zdrave pacijente, a 12 puta veća za srčane bolesnike, te prilikom upotrebe adrenalina kao RS postoji velika mogućnost predoziranja (Polat 2007). Kellam i sar. su zaključili da se 64 do 94% adrenalina iz retrakcionog konca apsorbuje u gingivu (Kellam 1992). Stepem resorpcije retrakcionog sredstva veći je ukoliko je gingiva maceirana u toku brušenja zuba (Felpel 1997).

Upotreba adrenalina predstavlja rizik za pacijente na terapiji beta-blokatorima i antihipertenzivima (Hilley 1984). Kao rezultat njegove sistemske resorpcije moguća je tahikardija, ubrzano disanje, hipertenzija, nervoza, osećaj slabosti u ekstremitetima i depresija (Hilley 1984, Bader 2002). Kao miokardijalni stimulator adrenalin ubzava rad srca, podiže krvni pritisak (pre svega sistolni) i brzinu pulsa. Predoziranje epinefinom vodi ka ventrikularnoj tahikardiji i potencijalnoj fibrilaciji, anginalnim napadima, miokardijalnom i cerebrovaskularnom infarkatu (Donovan 1985, Csillag 2007).

Adrenalin u svrhu retrakcije gingive nije preporučljiv ni za pacijente sa hipertiroidizmom, kao ni za pacijente koji se leče od depresije inhibitorima monoamin oksidaze (triklični antidepresivi) (Hilley 1984). Kod obolelih od šećerne bolesti resorbovani adrenalin povećava nivo glikoze u krvi (Donovan 1985, Donaldson 2011). Ukoliko se saniranje čitave usne duplje vrši u totalnoj anesteziji, uz upotrebu anestetika na bazi fluorinated-hydrocarbona (npr. halotana), miokard postaje osetljiviji na dejstvo adrenalina, što može ugroziti život pacijenta (Hilley 1984). Upotreba adrenalina kao RS u takvim slučajevima je kontraindikovana (Bowels 1981, Hilley 1984). S obzirom na veliki stresogeni efekat stomatoloških intervencija, može se očekivati nagli porast nivoa adrenalina u krvi čak i kod zdravih pacijenata (Shaw

1987, Borea 1989, Hansen 1999). Ukoliko se retrakciona procedura izvodi nakon davanja lokalne anestezije kombinovane sa vazokonstriktorom na bazi adrenalina, rizik od štetanja organa RS na bazi adrenalina raste.

Iscrpna anamneza i poznavanje farmakološkog statusa pacijenta jedini su način da se spreče neželjeni sistemski efekti RS na bazi adrenalina (Kesić 2009). S obzirom na rizik kumulativnog dejstva ovog vazokonstriktora i na činjenicu da se u svakodnevnoj stomatološkoj praksi slabo zna o opštem zdravlju pacijenata, kao i da sami pacijenti često nisu upoznati sa svojim kardiovaskularnim statusom, ovu vrstu RS treba načelno izbegavati. Tome u prilog ide i činjenica da je efekat gotovo identičan prilikom korišćenja adrenalina ili aluminijum hlorida i aluminijum sulfata u svrhu recesije gingive (Touti 1983, Weir 1984, Bowels 1991, Feng 2011). Jedina prednost adrenalina u odnosu na preparate na bazi aluminijuma jeste bolja kontrola krvarenja (Fazekas 2002, Bowels 1991, Csillag 2007).

Retrakcija gingive adstrigensnim sredstvima i adrenalinom može dovesti do oštećenja tkiva parodonta (Benson 1986, Liu 2004, Al Hamad 2008, Nowakowska 2012). Dosadašnja istraživanja pokazala su da RS oštećuju pripojni epitel, epitel sulkusa, kao i vezivno tkivo u uslovima *in vitro* i *in vivo* (Jokstad 1991, Kallem 1992, Kopač 2001, Kopač 2002, Liu 2004, Akca 2006, Polat 2007). Promene na parodontalnom tkivu mogu biti posledica mehaničkog oštećenja pripojnog epitela tokom aplikacije retrakcionog konca, ali su češće vezane za dejstvo primenjenog RS (Loe 1963, Woyshechin 1964, Clarke 1981, Donaldson 2011). Retrakcija gingive treba da je reverzibilan proces koji ne predstavlja početak gingivita koji progresivno vodi u ozbiljnija oboljenja parodonta.

2.3.4. Alternativna retrakciona sredstva

U cilju nalaženja prihvatljivijeg RS treba sagledati mogućnost upotrebe simpatomimetičkih vazokonstriktora za koje se pretpostavlja se da poseduju željenu efikasnost, bez neželjenih lokalnih i sistemskih efekata (Kopač 2001). Tetrahidrozolin i oksimetazolin spadaju u grupu simpatomimetskih vazokonstriktora, odnosno α agonista i komercijalno su dostupni u vidu nazalnih dekongestiva i kapi za oči. Sistemske reakcije na upotrebu ovih proizvoda jako su retke, a s obzirom da su maksimalne preporučene doze značajno veće od potrebnih za efikasnu retrakciju gingive (Tardy 1990, Bowels 1991, Lev 1995). Pretpostavka je da tetrahidrozolin predstavlja biološki prihvatljivije RS od komercijalno dostupnih preparata.

2.4. BIOKOMPATIBILNOST SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE

2.4.1. Savremeni koncept ispitivanja biokompatibilnosti stomatoloških materijala

Biokompatibilnost materijala i sredstava koja se koriste u stomatološkoj praksi može se definisati kao njihova sposobnost da obavljaju svoju funkciju bez lokalnog ili sistemskog odgovora tkiva i organizma domaćina (Williams 1987). Biokompatibilnost, samim tim, podrazumeva udruženu interakciju tkiva domaćina, primenjenog materijala i njegove predviđene funkcije, pri čemu reakcija tkiva domaćina ostaje u granicama tolerancije (Moharamyadeh 2009) (slika 5). Implementacija materijala ili upotreba određenog hemijskog sredstva može dovesti do neželjenih reakcija kako na lokalnom, tako i na sistemskom nivou koje, ponekad, mogu ugroziti i život pacijenta. Iako su ove reakcije retke, velika učestalost svakodnevni stomatoloških intervencija čini broj ugroženih pojedinaca alarmantnim (Živković 1995, Marković 1998, Lygre 2002).



Slika 5. Biokompatibilnost postoji samo u slučaju harmoničnog odnosa tkiva domaćina, primenjenog materijala i funkcije koju on obavlja u organizmu.

Savremeni pristup istraživanja biokompatibilnosti stomatoloških materijala obuhvata njihovu evaluaciju kroz tri koraka predviđenih ISO standardom (ISO 7504/ 1994), koje je preporučila Međunarodna organizacija za utvrđivanje standard (International Organization for Standardization).

1. Inicijalni testovi: citotoksičnost, sistemska toksičnost, mutagenost
2. Sekundarni testovi: senzitivnost, implantacioni testovi, mukozna iritacija
3. Testovi primene

Istraživanje biokompatibilnosti stomatoloških materijala i medicinskih sredstava može se sagledati i kroz koncept specifičnosti primenjenih testova (Marković 2002, Kostić 2010):

1. Nespecifična toksičnost (ćelijske kulture i male laboratorijske životinje)
2. Specifična toksičnost (testovi primene npr. kod subhumanih primata)
3. Kliničko testiranje na ljudima

Termin nespecifično ispitivanje biokompatibilnosti odnosi se na činjenicu da test sistemi u potpunosti ne reflektuju situaciju koja postoji u ustima pacijenta. U specifičnom vidu ispitivanja koriste se biološki modeli koji simuliraju aktuelnu kliničku upotrebu materijala.

U oba koncepta ispitivanja biokompatibilnosti stomatološki materijali se postupno analiziraju kroz tri predviđena koraka, počevši od jednostavnijih do komplikovanijih test metoda, od *in vitro* i testova na životinjama, do pretkliničkog i kliničkog testiranja na ljudima. Pristup višem nivou podrazumeva dokazanu biokompatibilnost na nižem nivou ispitivanja (slika 6). Međutim, postoje stomatološki materijali koji se koriste u praksi a pokazuju ozbiljnu toksičnost u *in vitro* testovima kao što su zink oksid i eugenol, što se objašnjava interakcijom između dentina i supstanci koje se oslobađaju iz materijala. Takav materijal po navedenim konceptima istraživanja ne bi se smatrao zadovoljavajućim za dalje ispitivanje, pa vredan materijal ne bi ni došao do stomatologa (Čolić 2007).



Slika 6. Savremeni koncept ispitivanja materijala u stomatologiji.

Ispitivanje biokompatibilnosti ne može se svesti samo na jednostavno testiranje, već se mora zasnovati na planiranom i strukturalnom istraživanju. Korišćenje standarda je opšte prihvaćeno načelo kako bi se dobijeni rezultati mogli komparirati. Ispitivanje biokompatibilnosti medicinskih sredstava koja se koriste u stomatologiji definisano je ISO standardom 10993 (1994) Biološka evaluacija medicinskih sredstava (tabela 1). Takođe se može koristiti i druga vrsta testova, tj. nestandardni testovi, ukoliko su prihvatljiviji za dato istraživanje. Glavna prednost standarda jeste reproduktivnost i to što su dobra baza za komparaciju podataka dobi-

jenih u različitim laboratorijama. Standardne metode koriste se svuda gde je to moguće, a ne-standardni testovi za rešavanje specifičnih problema (Čolic 2007).

Tabela 1. ISO standard 10993-Biološka evaluacija medicinskih sredstava

| ISO (International Standard Organization)10993, Ženeva, Švajcarska | |
|--|--|
| Biološka evaluacija medicinskih sredstava | |
| ISO 10993-1 | Evaluacija i testiranje |
| ISO 10993-2 | Pravilno postupanje sa eksperimentalnim životinjama |
| ISO 10993-3 | Testiranje genotoksičnosti, karcinogenosti i reproduktivne toksičnosti |
| ISO 10993-4 | Odabir testova za interakciju sa krvlju |
| ISO 10993-5 | Testovi citotoksičnosti: <i>In vitro</i> metode |
| ISO 10993-6 | Testovi lokalnog efekta implantacije |
| ISO 10993-9 | Identifikacija i kvantifikacija potencijalnih degradacionih produkata |

Današnji naučni koncepti testiranja biokompatibilnosti bazirani su na potrebi za brzom i jeftinom metodom, izbegavajući testove na životinjama gde god je to moguće. Kako *in vitro* eksperimenti ne mogu u potpunosti imitirati kliničke uslove u kojima će ispitivani materijal biti korišćen, savremeni koncepti nastoje simulirati važne parametre kliničke situacije što je moguće preciznije. *In vitro* metode se usavršavaju uvođenjem odgovarajućih barijera između materijala i ciljnih ćelija (target ćelija), biranjem klinički relevantnih markera za merenje bioloških efekata ispitivanog materijala i uvođenjem 3D modela ćelijskih kultura (St John 2004). Pomenute metode će omogućiti bolje razumevanje mehanizama bioloških reakcija stomatoloških materijala.

2.4.2. *In vitro* ispitivanje biokompatibilnosti materijala u stomatologiji

In vitro metode istraživanja relevantne su za testiranje stomatoloških materijala i medicinskih sredstava na ćelijskom i molekularnom nivou. One precizno utvrđuju kako i zašto određeni faktor izaziva ili doprinosi nastanku ili suprotno, sprečava razvoj određene bolesti. Cilj *in vitro* testiranja je simulacija bioloških reakcija na material koji dolazi u kontakt sa tkivom organizma (Živković 1997, Tang 1999, Raković 2010).

U eksperimentalnim studijama u *in vitro* uslovima može se pratiti lanac događaja koji se odvija pod dejstvom određenog faktora (ispitivanog materijala ili medicinskog sredstva) na ćelije ili organe u strogo kontrolisanim uslovima (Dahl 2006, Jorge 2007). Studije *in vitro* su

fokusirane i kontrolišu odabrane faktore (varijable). Podaci iz *in vitro* testova mogu dati informaciju o osnovnim biološkim osobinama, kao što je, na primer, toksičnost komponenti materijala i uticaj različitih uslova na njih. Ukoliko se u *in vitro* studiji utvrdi da je određeni materijal na bilo koji način štetan za organizam on se dalje ispituje na animalnim eksperimentalnim modelima (Dee 2002).

Osnovne prednosti in vitro metoda (Watacha 2001):

- kontrolisani uslovi ispitivanja
- odsustvo sistemskih efekata
- kontrolisanost ispitivanih varijabla
- testiranje je brzo i ekonomično
- mogućnost ponavljanja pod identičnim uslovima
- potrebna je mala količina materijala za testiranje
- ograničen je toksični efekat
- mogu se koristiti humane ćelije i tkiva
- mogu se koristiti transgenične ćelije koje nose humane gene
- smanjuje se potreba za ispitivanjem na eksperimentalnim životinjama.

Nedostaci in vitro metoda (Nakamura 1984, Tsuchiya 1994, Hanks 1996):

- ne može se ispitati opšti toksični efekat
- ne može se dobiti dozno zavistan odgovor (radi procene rizika za humanu populaciju)
- ne mogu biti procenjeni sistemski efekti ispitivanog materijala
- ne mogu biti testirane interakcije između tkiva i organa
- ne može biti ispitana farmakokinetika ispitanog medicinskog sredstva
- ne može biti procenjena osetljivost pojedinih organa na sastojke materijala
- vremenska ograničenost (ne mogu biti ispitani hronični efekti testiranog materijala)
- fenomen koji je uočen u uslovima *in vitro* može biti različit od odgovora ćelija u organizovanom tkivu u kome postoje kompenzatorni i adaptivni mehanizmi
- ako je neki fenomen zapažen u *in vitro* uslovima, neophodno je da se ispita da li on vodi nastanku određene promene (poremećaju građe ili funkcije, nastanku bolesti ili sprečavanju njenog nastanka) u *in vivo* uslovima.

In vitro testovi izvode se na kulturama ćelija i tkiva, organima i specijalno dizajniranim modelima. Takođe, ovi testovi podrazumevaju i analizu interakcije testiranog materijala i mikroorganizama (Dee 2002, Taylor 2008).

Kultura tkiva ili organa predstavlja održavanje celih organa ili fragmenata tkiva u *in vitro* uslovima, uz očuvanje međućelijskih veza kakve postoje u uslovima *in vivo*. Sa druge strane, kultura ćelija je gajenje određenog tipa ćelija izolovanih iz odgovarajućeg organa ili tkiva u laboratorijskim uslovima.

Najčešći su *in vitro* testovi na izolovanim, adherentnim kulturama ćelija, kako bi se izmerila citotoksičnost i biološka prihvatljivost materijala ili medicinskog sredstva (Dee 2001, Raković 2010). Njihovom primenom dobijaju se odgovori na niz postavljenih pitanja o uticaju primenjenog materijala ili medicinskog sredstva na mehanizam, aktivaciju i inhibiciju specifičnih celularnih funkcija, na sintezu DNK, ćelijsku proliferaciju i tip njene smrti (apoptoza i nekroza tkiva) (Cimpan 2000, Gough 2001).

Citotoksičnost je izazivanje posledica toksičnog dejstva ispitivanog materijala ili medicinskog sredstva u laboratorijskim uslovima (Williams 1987, Schmaiz 1994). Toksičnim se proglašava materijal koji ispušta ili medicinsko sredstvo koje sadrži dovoljnu količinu hemijskih supstanci da inhibira ključne celularne metaboličke tokove i ubije ćeliju. Pri tom, broj ugroženih ćelija zavisi od količine i jačine prisutnog toksina, kao i od trajanja perioda izlaganja. Testovi citotoksičnosti se u novije vreme dopunjuju ispitivanjem genotoksičnosti materijala, odnosno detekcijom DNK oštećenja i hromozomskih aberacija (Bakopoulou 2009).

Kulture ćelija (ćelijske linije) mogu se podeliti na (Polyzois 1994, Tang 1999):

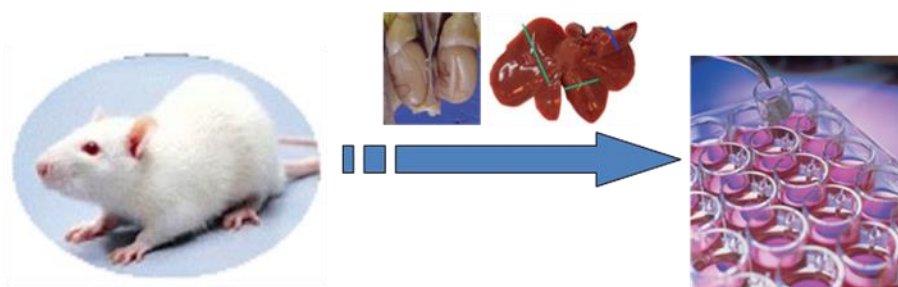
1. Primarne kulture ćelija koje se dobijaju direktno od organa ili tkiva. Mogu se pasažirati 2-3 puta (sekundarne kulture ćelija).
2. Diploidne koje sadrže jedan tip ćelija sa diploidnim brojem hromozoma i pasažiraju se 50-100 puta.
3. Kontinuirane (inmortalne, permanentne) koje sadrže samo jedan tip ćelija i mogu se pasažirati beskonačno.

Prednosti i nedostaci ispitivanja citotoksičnosti na ćelijskom kulturama prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. Prednosti i nedostaci ćelijskih kultura

| Prednosti ćelijskih kultura | Nedostaci ćelijskih kultura |
|--|---|
| homogenost | ćelijske linije su transformisane, da bi mogle da rastu u uslovima <i>in vitro</i> |
| konzistentnost i reproducibilnost rezultata | teškoće u postavljanju optimalnih uslova za laboratorijsko održavanje ćelijske kulture |
| mogućnost proučavanja direktnih efekata na ćelijskoj populaciji | moguće su razlike u izloženosti dejstvu leka (vezivanje za proteine, distribucija leka nije uzeta u obzir...) |
| pogodan model u toksikološkim istraživanjima (efekat pojedinih jedinjenja na specifičan tip ćelija; niska cena testova toksičnosti u odnosu na eksperimente <i>in vivo</i>) | nakon izvesnog vremena menjaju se karakteristike ćelija u kulturi (promene u enzimskoj aktivnosti, favorizovano preživljavanje ćelija koje brže rastu...) |
| broj parametara koji utiču na ispitivani proces sveden na minimum | |
| isključen uticaj drugih organa, cirkulatornog i imunog sistema | |

Primarne ćelijske kulture ćelije se izoluju direktno iz životinje, i gaje u medijumu (slika 7) (Murray 2007, Watacha 2006). Dobijaju se presovanjem tkiva kroz filtere i njegovom enzimskom disagregacijom do pojedinačnih ćelija za šta se koriste proteolitički enzimi, npr. tripsin ili kolagenaza.

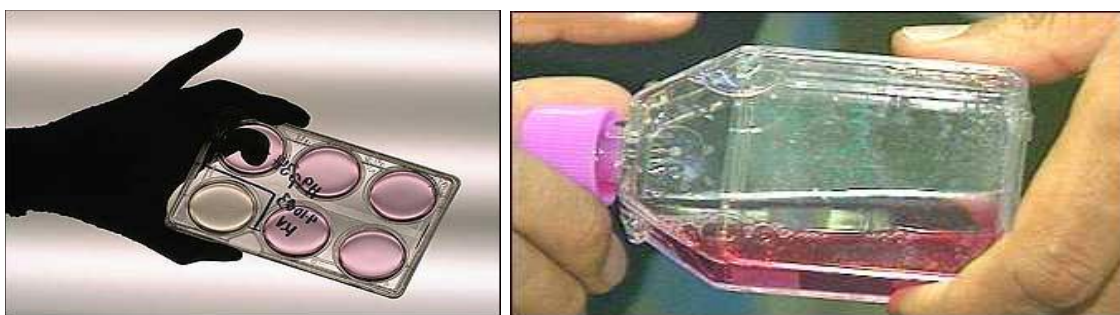
**Slika 7.** Procedura dobijanja primarne ćelijske kulture.

Po završetku inkubacionog vremena (perfuzije), reakcija se prekida dodavanjem hladnog medijuma. Cilj postupka jeste dobijanje što čistijeg preparata, tj. sa što manjim brojem drugih ćelija što se postiže centrifugiranjem na gradijentu ili selektivnim gajenjem (odgova-

rajućim sastavom medijuma). Potreban period za oporavak ćelija od izolacije i prijanjanje za podlogu je 2-24 sati. Primarne ćelijske kulture imaju ograničen životni vek trajanja koji se meri se danima ili nedeljama (Hanks 1996, Schlamz 1997).

Kontinuirane ćelijske linije dobijaju se transformacijom ćelija *in vitro* (tretman ćelija mutagenima, virusima ili onkogenima; infekcija retrovirusima) ili su poreklom od tumorskih ćelija (na pr. *HeLa* ćelije tumora grlića materice, *Namalwa* ćelije tumora limfnih žlezda i dr.). različite i jasno definisane ćelijske linije čuvaju se u bankama ćelija, a suspenzija željenih ćelija se doprema poručiocu u zamrznutom stanju (na suvom ledu). Po potrebi ćelije se odmrzavaju i počinje njihova kultivacija. Prednost ove vrste ćelijskih linija je trajnost, one zadržavaju svoje genetske i morfološke karakteristike tokom velikog dela svog života (Huang 2002, Jurišić 2008).

Prilikom odabira ćelijskih linija poželjnija je upotreba su kontinuiranih jer pospešuju reproduktivnost ogleda i smanjuju varijabilnost rezultata dobijenih u različitim laboratorijama (Schmaiz 1994, Dee 2002).



(a)

(b)

Slika 8. Kultivacija ćelijskih linija u hranjivom medijumu

(a) ploča za kultivaciju sa bunarima, (b) flask.

Ćelijske linije kultivišu se u specijalnom medijumu, kompleksnom rastvoru koji sadrži različite komponente potrebne za normalan rast i metaboličku aktivnost ćelija (slika 8). Vrsta medijuma koja se koristi specifična je za svaku ćelijsku liniju. Na tržištu se nalaze tečni medijumi ili medijumi u prahu. Standardnim komponentama medijuma (ugljeni hidrati, aminokiseline, soli, vitamin i hormoni) dodaju se puferi (bikarbonati, fenol red) i serum koji sadrži faktore rasta, neophodne za bolji rast i proliferaciju ćelija u kulturi (*fetal calf/bovine serum* – *FCS*, *FBS*, *fetal horse serum*), kao i antibiotici i antimikotici (penicilin, streptomycin i amfotericin).

Materijal za testiranje ili medicinsko sredstvo se može direktno aplikovati na ćelijsku kulturu (*testovi direktnog kontakta*) ili ekstrahovati u određenom rastvoru (ćelijski medijum, fiziološki rastvor, veštačka pljuvačka i dr.) (Kostić 2010, Kostić 2012). Različita koncentracija ekstrakta ispitivanog materijala dobijenog pod precizno definisanim uslovima dodaje se ćelijskoj kulturi (*testovi indirektnog kontakta*) (Polyzois 1994, Scweickl 1996). Izbor metode ispitivanja zavisi od svojstava ispitivanog materijala, cilja istraživanja i upotrebe podataka za procenjivanje biokompatibilnosti. U cilju standardizacije *in vitro* istraživanja, kao i lakšeg upoređivanja dobijenih rezultata, veoma je značajno pratiti: tip i broj ćelija, faze njihovog rasta (period učestale replikacije ćelija), opservacioni period, veličinu i površinu uzorka materijala ili koncentraciju ispitivanog medicinskog sredstva (Tang 1999).

Podela najčešće korišćenih *in vitro* tesova (Vermes 2000, Cipman 2000, Jorge 2006, Jurišić 2008):

1. Testovi vijabilnosti i proliferacije

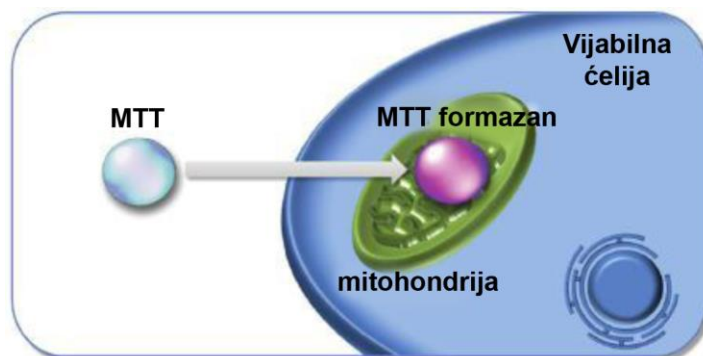
- Kolorimetrijski testovi: MTT (promena aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze), LDH (promena aktivnosti laktat dehidrogenaze), Almar plavo (hemijska redukcija hranjivog medijuma), bojenja mrtvih ćelija neutral crvenim, tripan plavim, propidijum jodidom.
- Testovi inkorporacije radioizotopa u DNK, RNK i proteine: BrdU, ³H-timidin
- Merjenja količine intracelularnih supstanci (proteina, DNK)

2. Testovi celularnih funkcija:

- Marker inflamacije
- Indikatori toksičnosti: determinacija glutationa (GSH)
- Indikatori ćelijskog stresa (HSP- Heat-Shock protein)
- Tip ćelijske smrti (specifični indikator apoptoze odnosno nekroze).

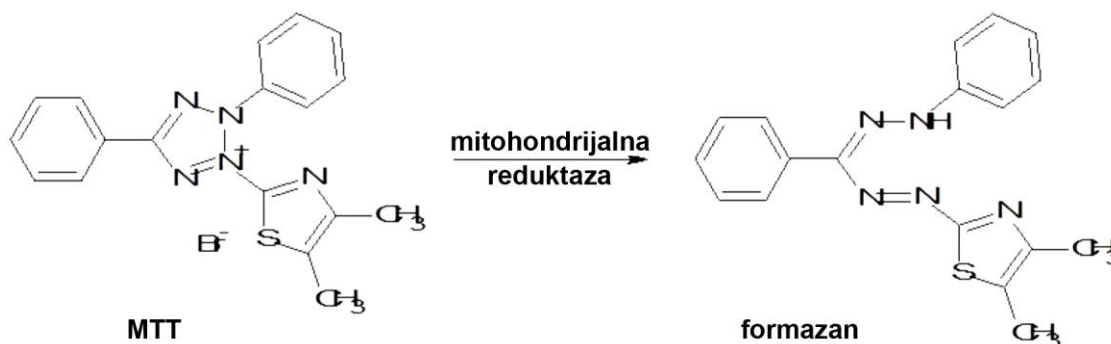
MTT test ćelijske vijabilnosti i proliferacije (Mosmann 1983, Vega-Avila 2011)

Jedan od široko upotrebljivanih nestandardnih testova jestre MTT test (metil-tetrazolijum test) (slika 9), čija je prednost ispitivanje na mikronivou i ekonomičnost. Radi se o jako osetljivom kvantitativnom testu ćelijske vijabilnosti i proliferacije (Lefebre 1994, Tang 1999). Indikovano je za ispitivanje citotoksičnosti tečnih materijala ili ekstrakata materijala u čvrstom stanju.



Slika 9. Princip MTT testa.

MTT test spada u grupu metaboličkih testova koji se baziraju na promeni određenog supstrata od strane normalno prisutnih enzima u metabolizmu ćelija. Sastavni deo mitohondrijalnog respiratornog lanca vijabilnih ćelija je enzim sukcinat-dehidrogenaza, koji redukuje žutu tetrazolijumovu so MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) do formazana, jedinjenja plave boje koje se u vidu kristala taloži u ćelijama (slika 10).



Slika 10. Šematski prikaz hemijske reakcije MTT redukcije

Najnovija ispitivanja, međutim, osporavaju dominantnu ulogu mitohondrijalnog transporta elektrona u celularnoj redukciji MTT-a. Obzirom da se veliki broj ovih reduktivnih procesa odvija u citoplazmi, uz učešće kofaktora NADH i NADPH, MTT test se ne može striktno nazvati mitohondrijalnim.

Liziranjem membrane odgovarajućim supstancama, kao što je izopropanol, formazan se rastvara i dobija se obojeni rastvor čija se apsorbance očitava na talasnoj dužini od 540 nm na višekanalnom spektrofotometru (*ELISA plate reader*). Spektrofotometar je povezan sa kompjuterom, radi brzog i automatskog dobijanja željenih podataka. Samo vijabilne ćelije poseduju opisani reduktivni potencijal, te stoga postoji direktna srazmernost izmerene apsorbance i broja živih ćelija. Toksično dejstvo testiranih materijala smanjuje aktivnost celularnih enzima, pa samim tim i redukciju MTT.

2.4.3. *In vivo* ispitivanje biokompatibilnosti materijala u stomatologiji

In vivo testiranje materijala podrazumeva utvrđivanje njihove biokompatibilnosti na eksperimentalnim životinjama, a ređe i na ljudima koji su dobrovoljno pristali na tu saradnju (Browne 1994).

Iako *in vitro* sistemi pružaju važne fundamentalne informacije o određenim elementima ćelijskih i molekularnih interakcija testiranog materijala, oni ne mogu zameniti ispitivanja na životinjama. Animalni modeli se koriste za proveru naučnih hipoteza, prikupljanje informacija, izolovanje ili ispitivanje supstanci ili razjašnjenje efekata nekog postupka, kao i njihovo korišćenje u bihejvioralnim eksperimentima. Eksperimentalne životinje su model sredine analogan humanom, te efikasnost *in vivo* istraživanja znatno prelazi razmere testiranja na ćelijskim kulturama. Sa druge strane, postoji širok opseg anatomohistoloških, fizioloških i biohemijskih razlika između svojstava tkiva ljudi i životinja, pa se svi dobijeni rezultati mogu smatrati relevantnim tek nakon testova primene (Browne 1994, Raković 2010). Najbolji modeli su nehumani primati, ali se oni i najređe koriste u istraživanjima (Schou 1993, Schmalz 1997).

Postupanje sa eksperimentalnim životinjama jasno je definisano Pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama. Principi eksperimentalnog rada na životinjama:

- Ne raditi eksperiment ako se podaci mogu dobiti na drugi način
- Ciljevi eksperimenta su definisani i dostižni
- Informacije o prethodnim istraživanjima – izbeći ponavljanje
- Patnja treba da je svedena na minimum
- Što jasniji ciljevi istraživanja, tako da je potreban broj životinja najmanji moguć.

Najčešći eksperimenti na animalnim modelima jesu testovi implantacije (subkutana i intramuskularna), iritacije tkiva, sistemske reakcije (akutna i hronična toksičnost materijala) i alergijski testovi.

Metoda procene reakcije tkiva sastavni je deo eksperimentalnog plana i zavisi od vrste i namene ispitivanog materijala. Lokalne reakcije tkiva kvalitativno i kvantitativno se procenjuju uz pomoć histologije i histohemije, skenirajuće i transmisionne elektronske mikroskopije, u zavisnosti od svrhe eksperimenta. Osnovu većine *in vivo* procedura čini kvalitativno određivanje relativnog broja različitih ćelijskih tipova i količine komponenti vancelularnog matriksa. Sistemske reakcije su, isto tako, veoma bitne za proučavanje kompatibilnosti materijala u uslovima *in vivo* (Raković 2010).

Sem animalnih moguće su i humane studije koje nisu invazivne i bave se problemima već definisanih bolesti, ustanovljenim metodama lečenja i razlikama među individua koje

čine grupu ispitanika. Studije na životinjama, a posebno one na ljudima, podležu strogim moralnim načelima i ne mogu se vršiti bez odobrenja ovlaštenog Etičkog Komiteta.

Testovi primene su najrelevantniji testovi biokompatibilnosti materijala i medicinskih sredstava, jer se nijedan materijal ne može smatrati relevantnim bez kliničke primene. Izvode se na volonterima, skupi su, vremenski ograničeni, teški za kontrolu i interpretiranje rezultata, a pravno i etički vrlo složeni.

Ispitivanje biokompatibilnosti materijala imperativ je prilikom njegovog uvođenja u kliničku praksu. Ipak, upotreba materijala u kliničkoj praksi je presudan korak da laboratorijsko ispitivanje dobije smisao i postane svakodnevna praksa.

2.4.4. Interakcije tkiva sa ispitivanim materijalom (Čolić 2007, Raković 2010)

Interakcije oralnih tkiva sa materijalima i medicinskim sredstvima koja se koriste u stomatologiji mogu se podeliti na:

- lokalne interakcije (tabela 3)
- sistemske interakcije
- pridružene komplikacije

Tabela 3. Lokalne interakcije na mestu kontakta tkiva sa materijalima

| Efekti materijala na tkiva domaćina | Efekti tkiva na materijal |
|--|--|
| krv-materijal interakcije toksičnost materijala | fiziko-mehaničke efekti: habanje, zamor, korozija, stres-korozivno lomljenje |
| promene u zarastanju rane tumorigeneza | biološke efekte: apsorpcija tkivnih komponenata enzimska razgradnja, kalcifikacija |

Sistemske interakcije odnose se na opšte reakcije organizma na prisustvo i dejstvo materijala. One obuhvataju veliki broj reakcija, od kojih su najvažnije alergijske ili reakcije hipersenzibiliteta.

Pridružene komplikacije prateći su elementi upotrebe materijala i predstavljaju mešavinu lokalnih i sistemskih reakcija, koje se mogu pažljivom pripremom i odgovarajućim preventivnim merama svesti na minimum (neadekvatno zarastanje rana, infekcija i dr.).

Odgovor organizma na prisustvo materijala je dinamičan proces, obzirom da se telo menja starenjem ili pod uticajem bolesti (Huang 2002).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Uporedna analiza citotoksičnog efekta sredstava za retrakciju gingive u uslovima *in vitro*.
2. Uporedna analiza potencijalno toksičnog efekta sredstava za retrakciju gingive na gingivalno tkivo u uslovima *in vivo*.

4. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Komercijalno dostupna sredstva za retrakciju gingive ispoljavaju izvestan toksični efekat na tkiva sa kojima dolaze u kontakt prilikom uzimanja otiska za fiksne stomatološke nadoknade, a stepen oštećenja gingivalnog tkiva je različit i zavisi od vrste, koncentracije i dužine delovanja retrakcionih sredstava. U ovom istraživanju se pošlo od pretpostavke da se mogu naći biološki prihvatljivija sredstva za retrakciju gingive od komercijalno dostupnih preparata na bazi aluminijum hlorida i adrenalina, te da ista treba tražiti među simpatomimetskim vazokonstriktorima.

5. MATERIJAL I METODE

5.1. ISPITIVANJE DEJSTVA SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE NA *IN VITRO* EKSPRERIMENTALNIM MODELIMA

In vitro ispitivanja citotoksičnosti sredstava za retrakciju gingive obavljena su u Laboratoriji za ćelijsku kulturu Medicinskog fakulteta u Nišu.

5.1.1. Ispitivani materijal

5.1.1.1. Ispitivana sredstva za retrakciju gingive

Ispitivanje je obuhvatilo dva komercijalno dostupna RS, kao i preparat na bazi tetrahidrozolina (tabela 4).

Tabela 4. Materijali korišćeni u *in vitro* ispitivanju

| Ime preparata | Hemijski sastav | Proizvođač |
|----------------------------|---|------------------|
| <i>Retrargin</i> (R) | 25% aluminijum hlorid heksahidrat, pH=0,8 | Galenika, Srbija |
| <i>Gingiva Liquid</i> (GL) | 10% aluminijum hlorid heksahidrat, pH= 1,8 | Roeko, Italija |
| <i>Visine Original</i> (V) | 0,05% tetrahidrozolin hidrohlorid, pH=5,6 | Pfizer, SAD |

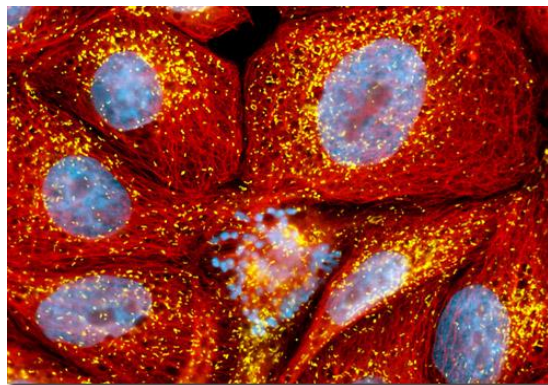
Za ispitivanje efekta na vijabilnost ćelija korišćeni su rastvori ispitivanih RS dobijeni njihovim razblaženjem u Ringerovom rastvoru (Ringer rastvor, Actavis, Srbija) u sledećim koncentracijama: 5%, 10%, 25% i 50%. Rastvori RS pripremani su neposredno pre upotrebe i sterilisani metodom filtracije primenom filtera sa porama veličine 0,2 μm .

5.1.1.2. Ćelijska kultura

Karakteristike MDCK ćelijske linije

MDCK (Madin-Darby canine kidney) kontinuirana ćelijska linija ustanovljena je od strane Madin i Darby šestdesetih godina dvadesetog veka. Ćelije su poreklom iz bubrežnog

tkiva odraslog psa ženskog pola. *MDCK* predstavljaju najčešće korišćene ćelije epitelnog tipa u laboratorijskim ispitivanjima (Abdoli 2013, Seitz 2010). S obzirom na njihovu morfološku i funkcionalnu sličnost sa epitelom oralne sluzokože, *MDCK* ćelije izabrane su za *in vitro* istraživanje uticaja RS na gingivalno tkivo (slika 11).



Slika 11. MDCK ćelijska linija.

Održavanje MDCK ćelijske kulture

Za potrebe održavanja *MDCK* ćelijske linije korišćen je hranljivi medijum DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Minimal Essential Medium, PAA Laboratories GmbH, Austria) kome su dodati L1-glutamin (PAA Laboratories GmbH, Austria), antibiotik-antimikotik rastvor (PAA Laboratories GmbH, Austria) i 10% fetalni goveđi serum (FBS, PAA Laboratories GmbH, Austria). Rad sa ćelijama obavljan je u sterilnim uslovima u vertikalnoj laminarnoj komori. Ćelijska kultura održavana je u inkubatoru (Jouan EG 110 IR), u atmosferi zasićenoj vlažnošću, u prisustvu 5% CO₂, na temperaturi od 37°C.

Kontinuirana proliferacija *MDCK* ćelija obezbeđena je zamenom hranljivog medijuma i njihovim presađivanjem (pasažom). Pasaža ćelija podrazumeva uklanjanje hranljivog medijuma iz posude u kojoj se gaje ćelije i odvajanje ćelija od podloge procesom tripsinizacije. Tripsinizacija se vrši inkubacijom *MDCK* ćelija sa 3 ml rastvora Tripsin-EDTA u trajanju od 10 minuta, u inkubatoru na 37°C, u atmosferi zasićenoj vlažnošću, u prisustvu 5% CO₂ i prekida se dodavanjem 5 ml hranljivog medijuma. Ćelije koje su odvojene od dna kultivacione posude se resuspenduju i suspenzija ćelija se zatim prebacuje u sterilnu epruvetu i centrifugira 10 minuta na 4°C i 1200 obrt/min (Hettich Zentrifugen Unnersal 320R, Nemačka).

Broj ćelija i potrebna gustina određuju se bojanjem ćelija tripan plavim. Tripan plavo selektivno boji mrtve ćelije, dok žive ostaju nebojene zahvaljujući očuvanom integritetu ćelijske membrane.

Brojanje živih ćelija vrši se u Malasezovoj hemocitometarskoj komori, u koju se stavlja smeša suspenzije ćelija i boje tripan plavo u odnosu 1:1, a zatim se ćelije posmatraju pod svetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss Jena Laboval 4, Nemačka). Brojanje se vrši u 10 polja komore, a broj ćelija dobija se po formuli:

$$\text{broj ćelija u 10 polja} \times 10 \times 2 \times 10^3 = \text{broj ćelija u 1 ml}$$

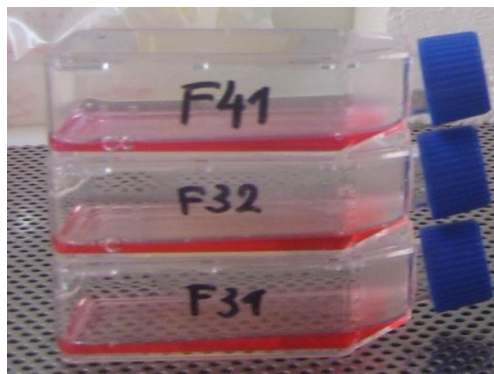
× 10 je potrebno da se dobije broj ćelija na ukupnu površinu komore, jer je ukupan broj polja u komori 100;

× 2 je potrebno zbog dvostrukog razblaženja bojom;

× 10³ je potrebno zbog pretvaranja 1 µl u 1 ml

Odgovarajućim razblaživanjem hranljivim medijumom dobija se željena gustina ćelija za eksperimentalni rad.

Ćelije se zatim sade u specijalne posude za gajenje (flaskove), sa 5 ml hranljivog medijuma (slika 12).



Slika 12. Flaskovi za kultivaciju ćelija

5.1.2. Metode ispitivanja

MTT test

U vijabilnim ćelijama aktivan je enzim sukcinat-dehidrogenaza koji je sastavni deo mitohondrijalnog respiratornog lanca i koji redukuje žutu tetrazolijumovu so- MTT do formazana, jedinjenja plave boje koje se u vidu kristala taloži u ćelijama. Medijum u kome su inkubirane ćelije je uklonjen, ćelije su isprane sa 100 µl PBS-a (fosfatna pufferisana so) i dodato im je po 100 µl MTT-a koncentracije 1 mg/ml. Nakon 3 h inkubacije na 37°C, nastali kristali formazana rastvoreni su sa 100 µl izopropanola. Spektrofotometrijsko merenje intenziteta redukcije MTT-a vršeno je na talasnoj dužini od 540 nm, na višekanalnom fotometru (Multiskan Ascent N^o354, Thermo Labystems, Finska) (slika 13). Spektrofotometar je povezan sa kompjuterom radi brzog i



Slika 13. Višekanalni spektrofotometar Multiskan Ascent No354, Thermo Labystems, Finska
Institut za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu.

automatskog dobijanja željenih podataka. Sposobnost redukcije MTT-a pokazuju samo vijabilne ćelije, te je izmerena apsorbancija direktno srazmerna broju živih ćelija. Eventualna citotoksičnost materijala smanjuje aktivnost mitohondrijalnih enzima, a samim tim i redukciju MTT.

5.1.3. Eksperimentalni dizajn

5.1.3.1. Ispitivanje citotoksičnog efekta sredstava za retrakciju gingive

Za ispitivanje citotoksičnog efekta korišćena su razblaženja RS u Ringerovom rastvoru.

Rad sa ćelijama obavljan je u sterilnim uslovima, u vertikalnoj laminarnoj komori. Nakon pasažiranja ćelije su posađene u sterilne ploče za kultivaciju ćelija sa 96 mesta. Broj ćelija po pojedinačnom mestu iznosio je 5×10^4 ćelija u 100 μ l medijuma. Ploče za kultivaciju ćelija odložene su u inkubator (u atmosferi zasićenoj vlažnošću, u prisustvu 5% CO₂ i na temperaturi od 37°C) u trajanju od 24 časa, kako bi se ćelije zalepile za podlogu i adaptirale na uslove istraživanja.

Nakon 24 časa hranjivi medijum je uklonjen i ćelijama je dodato po 50 μ l rastvora RS različitih koncentracija (5%, 10%, 25% i 50%). Trajanje inkubacije ćelijskih kultura u ispitivanim rastvorima RS iznosilo je tri, šest ili deset minuta. Ćelije su inkubirane sa rastvorima RS u standardnim uslovima.

Rastvori RS su nakon perioda inkubacije uklonjeni, ćelije su isprane fosfatnim puferom (PBS), a nakon toga je urađen MTT-test. Svaka koncentracija RS ispitivana je u tetraplikatu.

Kontrolnoj grupi ćelija je umesto rastvora RS dodato 50 μ l Ringerovog rastvora. Nakon inkubacije u trajanju od tri, šest ili deset minuta, Ringerov rastvor je uklonjen, ćelije su isprane PBS-om i urađen je MTT-test.

Ceo postupak je ponovljen tri puta.

5.1.3.2. Ispitivanje sposobnosti ćelija da se oporave od delovanja sredstava za retrakciju gingive

Za ispitivanje sposobnosti ćelija da se oporave od delovanja RS, korišćena su različita razblaženja RS u Ringerovom rastvoru.

Rad sa ćelijama obavljan je u sterilnim uslovima, u vertikalnoj laminarnoj komori. Nakon pasažiranja ćelije su posađene u sterilne ploče za kultivaciju ćelija sa 96 bunara. Broj ćelija po pojedinačnom bunaru iznosio je 5×10^4 ćelija u 100 μ l medijuma. Ploče za kultivaciju ćelija odložene su u inkubator sa zasićenom vlažnošću, u prisustvu 5% CO₂, na

temperaturu od 37°C u trajanju od 24 časa, kako bi se ćelije zalepile za podlogu i adaptirale na uslove kultivacije. Nakon 24 časa hranjivi medijum je uklonjen i ćelijama je dodato po 50 µl rastvora RS različitih koncentracija. Dužina trajanja kontakta rastvora ispitivanih RS sa ćelijskom kulturom iznosila je tri, šest ili deset minuta. Ćelije su inkubirane sa rastvorima RS u standardnim uslovima.

Rastvori RS su nakon perioda inkubacije uklonjeni, a ćelije su isprane u PBS-u. U svaki bunar je stavljeno 100 µl hranjivog medijuma i nastavljena je kultivacija ćelija u standardnim uslovima. Nakon perioda od 24 časa urađen je MTT-test kako bi se izmerila vijabilnost ćelija. Svaka koncentracija RS ispitivana je u tetraplikatu.

Kontrolnoj grupi ćelija je umesto rastvora RS dodato 50 µl Ringerovog rastvora. Nakon inkubacije u trajanju od tri, šest ili deset minuta, Ringerov rastvor je uklonjen, a ćelije su isprane PBS-om. U svaki bunar kultivacione ploče stavljeno je 100 µl hranjivog medijuma i nakon jednodnevne inkubacije u standardnim uslovima na 37°C urađen je MTT-test.

Ceo postupak je ponovljen tri puta.

5.1.4. Tumačenje dobijenih rezultata

Dobijene vrednosti izmerenih parametara bile su osnov za statističku analizu citotoksičnosti ispitivanih materijala u poređenju sa kontrolnim testiranjem i uzorcima međusobno. Dobijeni podaci su statistički obrađeni u programu SPSS 15.0. Korišćena je analiza varijanse (ANOVA), sa sledstvenom Post-Hoc analizom, a za statistički značajne vrednosti smatrani su nivoi od $p < 0,05$.

Intenzitet redukcije MTT-a srazmeran je broju vijabilnih ćelija. Kontrolnu grupu su predstavljale ćelije koje su inkubirane samo sa Ringerovim rastvorom bez prisustva RS. Rezultati su predstavljeni kao procenat vijabilnih ćelija u prisustvu rastvora ispitivanih RS u odnosu na kontrolu.

Kvantitativne promene u vijabilnosti ćelija predstavljene su i opisno (Dahl 2006):

1. necitotoksični: >90% vijabilnih ćelija,
2. blago citotoksični: 60-90% vijabilnih ćelija,
3. umereno citotoksični: 30-59% vijabilnih ćelija, i
4. ozbiljno citotoksični: <30% vijabilnih ćelija.

Vijabilnost ćelija kontrolne grupe predstavljena je kao 100%.

5.2. ISPITIVANJE DEJSTVA SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE NA *IN VIVO* EKSPRERIMENTALNIM MODELIMA

In vivo istraživanja obavljena su u skladu sa Pravilnikom o postupanju sa eksperimentalnim životinjama i sa Helsinškom deklaracijom (Odobrenje Etičkog Komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu, broj 01-2066-2) na Institutu za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu.

5.2.1. Ispitivani materijal

5.2.1.1. Ispitivana sredstva za retrakciju gingive

Ispitivanje je obuhvatilo tri komercijalno dostupna RS, kao i preparat na bazi tetrahidrozolina (tabela 5).

Tabela 5. Materijali korišćeni u *in vivo* ispitivanju

| Ime preparata | Hemijski sastav | Proizvođač |
|--------------------------------------|---|---|
| <i>Retrargin</i> | 25% aluminijum hlorid heksahidrat, pH=0,8 | Galenika, Srbija |
| <i>Gingiva Liquid</i> | 10% aluminijum hlorid heksahidrat, pH= 1,8 | Roeko, Italija |
| <i>Surgident Solution Retraction</i> | 8% epinefrin-HCl, pH=2,5 | Sigma Dental Systems Emasdi GmbhH, Nemačka |
| <i>Visine Original</i> | 0,05% tetrahidrozolin hidrohlorid, pH=5,6 | Pfizer, SAD |

5.2.1.2. Eksperimentalne životinje

U eksperimentu je korišćeno 32 eksperimentalna kunića, muškog pola, uzrasta 8 nedelja i težine 1,8-2,2 kg.

Životinje su bile zdrave i aklimatizovane na laboratorijsku sredinu i standardnu laboratorijsku ishranu i čuvane u plastičnim kavezima. Tokom eksperimenta praćene su eventualne promene ponašanja, pojave bolesti ili gubitka telesne težine, da se pojava neke nepravilnosti ne bi odrazila na verodostojnost dobijenih rezultata.

Životinje su bile podeljene u četiri eksperimentalne grupe, po 8 kunića.

5.2.2. Metode ispitivanja

Svetlosna mikroskopija

Uzorci gingivalnog tkiva su nakon biopsije fiksirani u 10%-om formalinu. Materijal je, tokom dalje obrade, podvrgnut dehidraciji u rastućim koncentracijama etanola (50%-tni do apsolutnog). Prosvetljavanje materijala vršeno je u ksilolu nakon čega je ukalupljen u parafinske kalupe. Tkivni blokovi sečeni su na mikrotomu (LKB Broma, Švedska) (1,5 μ m) i bojeni klasičnom metodom–Hematoksilin & Eozin (HE). Bojeni preparati analizirani su patohistološki na sistemu za analizu slika Lucia 3,2 G (Laboratory Imaging, Češka) na mikroskopu NU-2 (Carl Zeiss, Nemačka).

Zastupljenost kolagenih vlakana analizirana je pod polarizacionim svetlom.

5.2.3. Eksperimentalni dizajn

5.2.3.1. Aplikacija ispitivanog materijala

Svaka intervencija na životinjama izvođena je u opštoj anesteziji u operacionoj sali za eksperimentalne životinje, pod sterilnim uslovima.

Životinja je pre svakog predviđenog tretmana uvođena u anesteziju intramuskularnom aplikacijom Zoetil (Virbac), u dozi od 10 mg/kg telesne težine. Anestezija je trajala 15 do 30 minuta. Anestezirane životinje postavljene su u ležećem položaju na leđima.

Eksperimentalno istraživanje obavljeno je na sva četiri sekutića kunića. Gingivalno tkivo kunića bilo je klinički zdravo, pripojeno uz vrat zuba u vidu kragne formirajući gingivalni sulkus prosečne dubine 0,5 mm (slika 14).



Slika 14. Gingivalni sulkus centralnih sekutića kunića.

Aplikacija RS vršena je u gingivalni sulkus levih sekutića kunića gornje i donje vilice (slika 14). U cilju podrške i ravnomerne raspodele RS korišćen je neimpregnirani retrakcioni konac Roeko Comprecord (Coltene Whale Dent AG, Nemačka) (slika 15).



Slika 15. Retrakcioni konac korišćen u eksperimentu.

Nakon potapanja u RS konac je pažljivo postavljan celim obimom zuba plastičnim instrumentom i stomatološkom pincetom (slika 16).



Slika 16. Aplikacija RS u gingivalni sulkus kunića.

Dejstvo RS u gingivalnom sulkusu kunića trajalo je 7 minuta, što je analogno dužini pripreme sulkusa pacijenata pri uzimanju sekundarnog otiska za fiksne nadoknade (5 do 10 minuta) (Trifunović 1998).

Sekutići desnih kvadranta služili su kao kontrola:

- Gornji – negativna kontrola (odsustvo intervencije) i
- Donji – lažni tretman-aplikacija retrakcionog konca bez RS.

Dužina trajanja opservacionih perioda, nakon kojih je usledila biopsija tretiranog tkiva, iznosila je jedan sat, jedan, sedam i trideset dana.

Plan aplikacije, kao i dužina opservacionog perioda za svaki od ispitivanih RS prikazan je u tabeli 6.

Tabela 6. Plan eksperimenta

| prvi kunić | | drugi kunić | | treći kunić | | četvrti kunić | |
|------------|---------|-------------|--------|-------------|---------|---------------|--------|
| 1 dan | 1 dan | 1 sat | 1 sat | 1 dan | 1 dan | 1sat | 1 sat |
| NK | IM | NK | IM | NK | IM | NK | IM |
| LT | IM | LT | IM | LT | IM | LT | IM |
| 1sat | 1 sat | 1 dan | 1 dan | 1 sat | 1 sat | 1 dan | 1 dan |
| peti kunić | | šesti kunić | | sedmi kunić | | osmi kunić | |
| 30 dana | 30 dana | 7 dana | 7 dana | 30 dana | 30 dana | 7 dana | 7 dana |
| NK | IM | NK | IM | NK | IM | NK | IM |
| LT | IM | LT | IM | LT | IM | LT | IM |
| 7dana | 7dana | 30dana | 30dana | 7dana | 7dana | 30dana | 30dana |

*Aplikacija ispitivanih materijala –IM; negativna kontrola (intaktna gingiva)-NK; lažan tretman (aplikacija retrakcionih konaca bez ispitivanog materijala)-LT; opservacioni period- jedan sat, jedan, sedam i trideset dana.

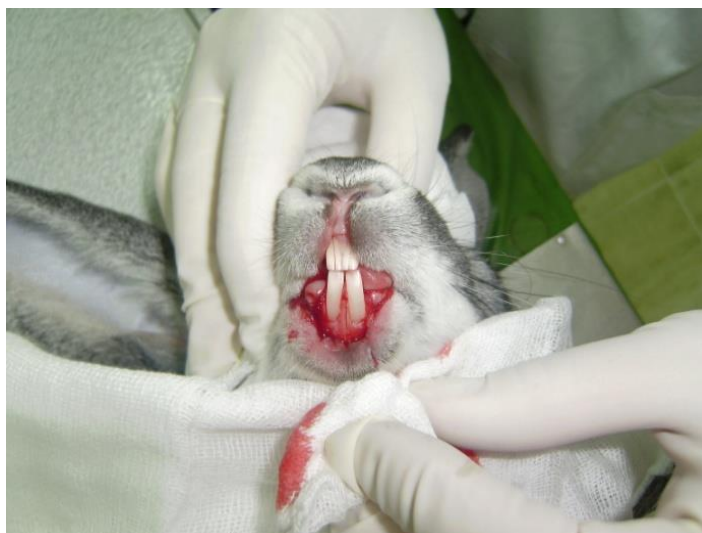
5.2.3.2. Biopsija tretiranog tkiva

Nakon predviđenih opservacionih perioda isečak gingivalnog tkiva uzet je biopsijom. Biopsijom tkiva nije došlo do povrede sekutića kunića i susednog gingivalnog sulkusa.

Skalpelom su načinjene dve vertikalne incizije na labijalnoj gingivi i jedna horizontalan u visini alveolatnog grebena. Uzorci tkiva veličine 2x2mm pažljivo su odvojeni u vertikalnom smeru raspatorijumom (slika 17 i 18). Tkivo je isprano povidon jodidom. Isečci tkiva analizirani su patohistološki pod svetlosnim mikroskopom.



Slika 17. Biopsija tretiranog gingivalnog tkiva kunića.



Slika 18. Izgled tkiva gingive kunića nakon biopsije tretiranog tkiva.

Nakon biopsija tkiva praćeno je zdravstveno stanje kunića i eventualna pojava infekcije. Nije bilo potrebe za upotrebom antibiotika. Način ishrane bio je prilagođen rani u ustima. Zarastanje rana odvijalo se uobičajenim tokom, bez komplikacija.

5.2.4. Tumačenje dobijenih rezultata

Ocena rezultata svetlosno mikroskopske analize biopsiranog tkiva izvršena je semi-kvantitativno, na osnovu prisustva inflamatorne reakcije i fibroze tkiva, kao i eventualnih destruktivno-nekrotičnih promena (tabela 7).

Tabela 7. Ocena stepena inflamatorne reakcije (Zmener 2004)

| Inflamatorna reakcija | Promene u tkivu |
|-----------------------|--|
| nema reakcije | formiranje fibrozne kapsule i odsustvo inflamatornih ćelija. |
| blaga reakcija | prisustvo fibrozne kapsule sa manjim brojem limfocita i plazmocita. |
| umerena reakcija | formiranje fibrozne kapsule sa prisustvom makrofaga, polimorfonukleara, limfocita i plazmocita. |
| intenzivna reakcija | prisustvo obimne akumulacije polimorfonukleara, limfocita, plazmocita, makrofaga, džinovskih ćelija tipa stranog tela i kapilara sa izraženom kongestijom. |

6. REZULTATI

6.1. REZULTATI ISPITIVANJA CITOTOKSIČNOG DEJSTVA SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE NA *IN VITRO* EKSPERIMENTALNIM MODELIMA

6.1.1. Rezultati ispitivanja intenziteta redukcije MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora sredstava za retrakciju gingive

6.1.1.1. Redukcija MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora RS za period inkubacije od tri minuta

Sposobnost redukcije MTT-a pokazuju samo vijabilne ćelije, te je izmereni intenzitet redukcije MTT-a direktno srazmeran broju živih ćelija. Deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora RS nakon njegovog trominutnog dejstva na kulturu ćelija, prikazani su u tabelama 8-10. ANOVA analiza je pokazala statističku zavisnost intenziteta redukcije MTT-a u odnosu na koncentraciju rastvora kod svih ispitivanih materijala ($p < 0,001$), a Post Hoc analiza je utvrdila statistički značajne razlike između različitih koncentracija date u tabelama. Generalno, vijabilnost ćelija opada sa porastom koncentracije rastvora materijala (grafikon 1).

Tabela 8. Vijabilnost ćelija nakon trominutnog dejstva rastvora *Visine* u odnosu na kontrolu

| Koncentracija | N | X ± SD % | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|-------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 5% | 12 | 105,84 ± 8,93 ^{d***} | 3,65 | 96,46 – 115,21 | 94,57 | 114,60 | 8,44 |
| 10% | 12 | 99,65 ± 11,44 ^{d**} | 4,04 | 90,09 – 109,21 | 90,12 | 121,47 | 11,48 |
| 25% | 12 | 96,02 ± 10,20 ^{d*} | 3,60 | 87,50 – 104,55 | 82,45 | 115,58 | 10,62 |
| 50% | 12 | 80,74 ± 6,74 | 2,55 | 74,51 – 86,97 | 68,96 | 89,33 | 8,34 |

ANOVA: $F = 8,30$, $p = 0,0005 < 0,001$

d – vs 50%; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

* N- broj ponavljanja

X- srednja vrednost

SD- standardna devijacija

Cv- koeficijent varijacije

SE- standardna greška

95% CI- interval pouzdanosti

Min- najniža vrednost

Max- najviša vrednost

Tabela 9. Vijabilnost ćelija nakon trominutnog dejstva rastvora *Retrargin* u odnosu na kontrolu

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|-------------------------------|------|---------------|-------|-------|------|
| 5% | 12 | 80,76 ± 6,69 ^{cd***} | 2,36 | 75,17 – 86,35 | 71,95 | 90,88 | 8,28 |
| 10% | 12 | 82,44 ± 4,71 ^{cd***} | 1,67 | 78,50 – 86,38 | 75,01 | 88,09 | 5,72 |
| 25% | 12 | 12,79 ± 0,93 ^{d**} | 0,33 | 12,01 – 13,56 | 11,40 | 14,31 | 7,26 |
| 50% | 12 | 11,03 ± 0,60 | 0,21 | 10,52 – 11,54 | 10,00 | 11,85 | 5,48 |

ANOVA: F = 760,77, p = 0,0000 < 0,001

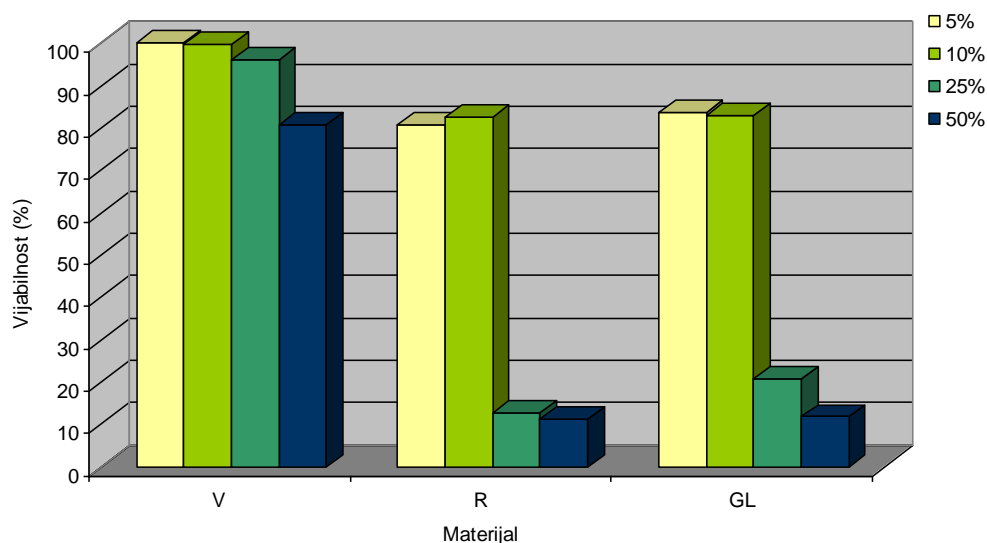
c – vs 25%, d – vs 50%; ** – p<0,01, *** – p<0,001

Tabela 10. Vijabilnost ćelija nakon trominutnog dejstva rastvora *Gingiva Liquid* u odnosu na kontrolu

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|--------------------------------|------|---------------|-------|-------|-------|
| 5% | 12 | 83,74 ± 12,70 ^{cd***} | 4,49 | 73,12 – 94,36 | 69,66 | 98,63 | 15,17 |
| 10% | 12 | 83,11 ± 9,27 ^{cd***} | 3,28 | 75,36 – 90,86 | 71,39 | 93,16 | 11,15 |
| 25% | 12 | 20,87 ± 8,76 | 3,10 | 13,55 – 28,19 | 12,35 | 32,42 | 41,96 |
| 50% | 12 | 11,75 ± 0,54 | 0,19 | 11,29 – 12,20 | 11,00 | 12,50 | 4,63 |

ANOVA: F = 149,55, p = 0,0000 < 0,001

c – vs 25%, d – vs 50%; *** – p<0,001



Grafikon 1. Vijabilnost ćelija nakon trominutnog dejstva rastvora ispitivanih materijala različitih koncentracija.

**6.1.1.2. Redukcija MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora RS
za period inkubacije od šest minuta**

Deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora RS, za šestominutni period dejstva ispitivanih materijala prikazani su u tabelama 11-12. ANOVA analizom potvrđena je statistička zavisnost intenziteta redukcije MTT-a u odnosu na koncentraciju rastvora kod svih ispitivanih materijala ($p < 0,001$), a rezultati Post Hoc analize i statistički značajne razlike između različitih koncentracija dati su tabelama 11-13. Vijabilnost ćelija opada sa porastom koncentracije materijala (grafikon 2).

Tabela 11. Vijabilnost ćelija nakon šestominutnog dejstva rastvora *Visine* u odnosu na kontrolu

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|-------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 5% | 12 | 95,40 ± 12,20 ^{d***} | 4,31 | 85,20 – 105,60 | 77,77 | 117,78 | 12,79 |
| 10% | 12 | 96,27 ± 12,12 ^{d***} | 4,28 | 86,14 – 106,41 | 81,21 | 113,74 | 12,59 |
| 25% | 12 | 82,87 ± 7,06 | 2,50 | 76,97 – 88,77 | 72,43 | 92,58 | 8,52 |
| 50% | 12 | 69,41 ± 8,85 | 3,13 | 62,01 – 76,81 | 49,75 | 77,17 | 12,75 |

ANOVA: F = 12,05, p = 0,0000 < 0,001

d – vs 50%; *** – p < 0,001

Tabela 12. Vijabilnost ćelija nakon šestominutnog dejstva rastvora *Retrargin* u odnosu na kontrolu

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|--------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 5% | 12 | 97,89 ± 8,16 ^{bcd***} | 2,89 | 91,07 – 104,72 | 87,51 | 112,34 | 8,34 |
| 10% | 12 | 81,81 ± 8,79 ^{cd***} | 3,11 | 74,46 – 89,16 | 66,51 | 91,02 | 10,75 |
| 25% | 12 | 11,40 ± 3,48 | 1,23 | 8,49 – 14,31 | 7,76 | 15,13 | 30,53 |
| 50% | 12 | 10,73 ± 3,63 | 1,28 | 7,70 – 13,76 | 6,93 | 14,23 | 33,81 |

ANOVA: F = 399,50, p = 0,0000 < 0,001

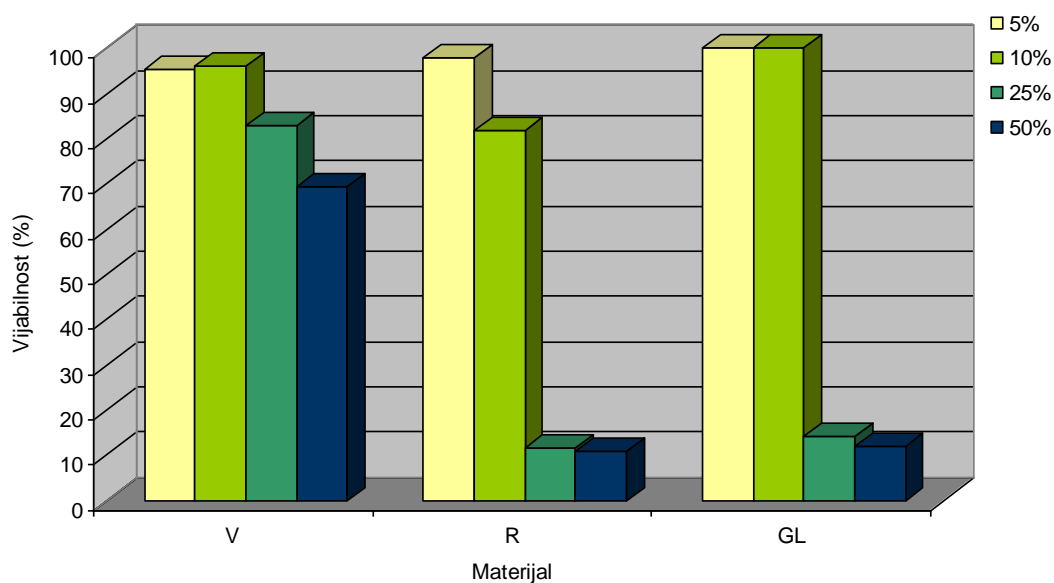
b – vs 10%, c – vs 25%, d – vs 50%; *** – p < 0,001

Tabela 13. Vijabilnost ćelija nakon šestominutnog dejstva rastvora Gingival Liquid u odnosu na kontrolu

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|--------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 5% | 12 | 104,41 ± 7,58 ^{cd***} | 2,68 | 98,07 – 110,74 | 93,80 | 118,05 | 7,26 |
| 10% | 12 | 103,69 ± 8,35 ^{cd***} | 2,95 | 96,72 – 110,67 | 90,41 | 118,05 | 8,05 |
| 25% | 12 | 14,16 ± 4,00 | 1,41 | 10,82 – 17,50 | 9,77 | 22,40 | 28,23 |
| 50% | 12 | 12,08 ± 3,00 | 1,06 | 9,57 – 14,58 | 8,55 | 16,05 | 24,83 |

ANOVA: F = 579,96, p = 0,0000 < 0,001

c – vs 25%, d – vs 50%; *** – p<0,001



Grafikon 2. Vijabilnost ćelija nakon šestominutnog dejstva rastvora ispitivanih materijala različitih koncentracija

**6.1.1.3. Redukcija MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora RS
za period dejstva od deset minuta**

Deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora, za desetominutni period dejstva, za ispitivane materijale dati su u tabelama 14-16 i na grafikonu 3. Statistička zavisnost intenziteta redukcije ćelija u odnosu na koncentraciju kod svih ispitivanih materijala potvrđena je ANOVOM ($p < 0,001$). Statistički značajne razlike između vijabilnosti različitih koncentracija utvrđene Post Hoc analizom prikazane su u tabelama.

Tabela 14. Vijabilnost ćelija nakon desetominutnog dejstva rastvora *Visine* u odnosu na kontrolu

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|----------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 5% | 12 | 95,88 ± 6,83 ^{b*,cd***} | 2,41 | 90,18 – 101,59 | 86,61 | 105,48 | 7,12 |
| 10% | 12 | 86,60 ± 2,87 ^{d***} | 1,02 | 84,19 – 89,00 | 82,27 | 91,63 | 3,32 |
| 25% | 12 | 79,50 ± 5,52 ^{d***} | 1,95 | 74,89 – 84,12 | 72,06 | 91,11 | 6,94 |
| 50% | 12 | 44,62 ± 11,01 | 3,89 | 35,42 – 53,83 | 30,49 | 59,41 | 24,67 |

ANOVA: $F = 77,61$, $p = 0,0000 < 0,001$

b – vs 10%, c – vs 25%, d – vs 50%; * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$

Tabela 15. Vijabilnost ćelija nakon desetominutnog dejstva rastvora *Retrargin* u odnosu na kontrolu

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|-------------------------------|------|---------------|-------|-------|-------|
| 5% | 12 | 88,62 ± 3,62 ^{cd***} | 1,28 | 85,59 – 91,65 | 82,94 | 94,05 | 4,09 |
| 10% | 12 | 70,96 ± 26,23 ^{cd**} | 9,28 | 49,03 – 92,89 | 43,51 | 97,02 | 36,97 |
| 25% | 12 | 11,77 ± 2,72 | 0,96 | 9,49 – 14,04 | 9,08 | 15,48 | 23,11 |
| 50% | 12 | 11,41 ± 1,96 | 0,69 | 9,77 – 13,05 | 9,39 | 13,89 | 17,18 |

ANOVA: $F = 71,96$, $p = 0,0000 < 0,001$

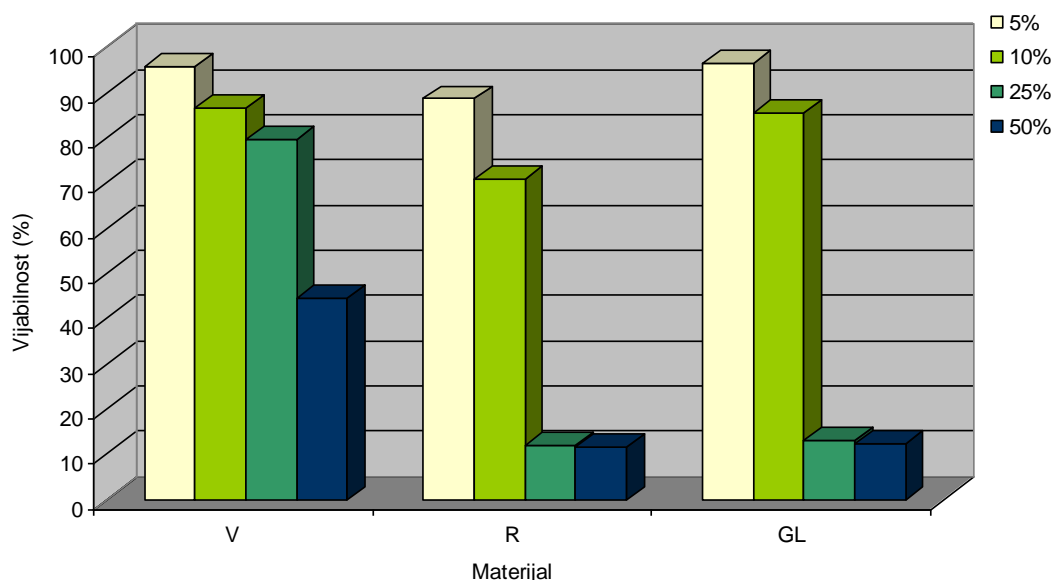
c – vs 25%, d – vs 50%; ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

Tabela 16. Vijabilnost ćelija nakon desetominutnog dejstva rastvora Gingival Liquid u odnosu na kontrolu

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|--------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 5% | 12 | 96,40 ± 11,82 ^{cd***} | 4,18 | 86,52 – 106,28 | 80,73 | 111,42 | 12,26 |
| 10% | 12 | 85,49 ± 23,18 ^{cd***} | 8,19 | 66,12 – 104,87 | 60,00 | 110,72 | 27,11 |
| 25% | 12 | 12,86 ± 4,43 | 1,57 | 9,16 – 16,56 | 8,18 | 20,05 | 34,44 |
| 50% | 12 | 12,14 ± 3,69 | 1,30 | 9,06 – 15,22 | 8,47 | 16,08 | 30,36 |

ANOVA: F = 93,46, p = 0,0000 < 0,001

c – vs 25%, d – vs 50%; *** – p<0,001



Grafikon 3. Vijabilnost ćelija nakon desetominutnog dejstva rastvora ispitivanih materijala različitih koncentracija.

Analizom rezultata u tabelama 8-16 uočava se ravnomerno smanjenje vijabilnosti ćelija sa porastima koncentracija rastvora materijala *Visine*, dok je smanjenje vijabilnosti za koncentracije 25 i 50% višestruko niži u odnosu na koncentracije 5 i 10% kod rastvora *Retrargin* i *Gingival Liquid*.

6.1.2. Rezultati ispitivanja uticaja dužine dejtva rastvora za retrakciju gingive na intenzitet redukcije MTT-a

Ispitivan je uticaj dužine dejstva različitih koncentracija rastvora RS na redukciju intenziteta MTT-a.

6.1.2.1.Redukcija MTT-a u zavisnosti od dužine dejstva različitih koncentracija rastvora *Visine*

Deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a za različite koncentracije rastvora *Visine* u odnosu dužinu dejstva na ćelijsku kulturu prikazani su u tabelama 17-20 i na grafikonu 4. ANOVA analiza je utvrdila statističku zavisnost intenziteta redukcije MTT-a u odnosu na period dejstva na ćelijsku kulturu kod materijala *Visine* za koncentracije rastvora 10% ($p < 0,05$), a još izraženiju pri koncentracijama 25 i 50% ($p < 0,001$). Post Hoc analiza je utvrdila značajno višu vrednost vijabilnosti ćelija nakon perioda dejstva od tri minuta rastvora, a nivo statističke značajnosti raste sa porastom koncentracije.

Tabela 17. Vijabilnost ćelija nakon različite dužine dejstva 5% rastvora *Visine* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|---------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 3 min | 12 | 105,84 ± 8,93 | 3,65 | 96,46 – 115,21 | 94,57 | 114,60 | 8,44 |
| 6 min | 12 | 95,40 ± 12,20 | 4,31 | 85,20 – 105,60 | 77,77 | 117,78 | 12,79 |
| 10 min | 12 | 95,88 ± 6,83 | 2,41 | 90,18 – 101,59 | 86,61 | 105,48 | 7,12 |

ANOVA: F = 2,44, p = 0,1137

Tabela 18. Vijabilnost ćelija nakon različite dužine dejstva 10% rastvora *Visine* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|-----------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 3min | 12 | 99,65 ± 11,44 ^{c*} | 4,04 | 90,09 – 109,21 | 90,12 | 121,47 | 11,48 |
| 6min | 12 | 96,27 ± 12,12 | 4,28 | 86,14 – 106,41 | 81,21 | 113,74 | 12,59 |
| 10min | 12 | 86,60 ± 2,87 | 1,02 | 84,19 – 89,00 | 82,27 | 91,63 | 3,32 |

ANOVA: F = 3,85, p = 0,0376 < 0,05

c – vs 10 min; * – p < 0,05

Tabela 19. Vijabilnost ćelija nakon različite dužine dejstva 25% rastvora *Visine* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|-------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 3min | 12 | 96,02 ± 10,20 ^{bc**} | 3,60 | 87,50 – 104,55 | 82,45 | 115,58 | 10,62 |
| 6min | 12 | 82,87 ± 7,06 | 2,50 | 76,97 – 88,77 | 72,43 | 92,58 | 8,52 |
| 10min | 12 | 79,50 ± 5,52 | 1,95 | 74,89 – 84,12 | 72,06 | 91,11 | 6,94 |

ANOVA: F = 9,93, p = 0,0009 < 0,001

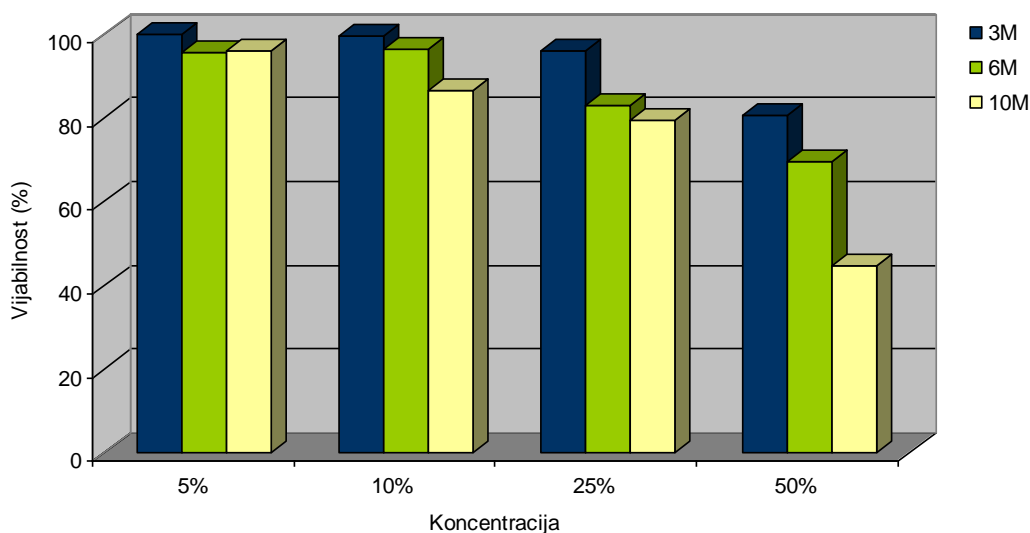
b – vs 6 min, c – vs 10 min; ** – p < 0,01

Tabela 20. Vijabilnost ćelija nakon različite dužine dejstva 50% rastvora *Visine* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|------------------------------|------|---------------|-------|-------|-------|
| 3min | 12 | 80,74 ± 6,74 ^{c***} | 2,55 | 74,51 – 86,97 | 68,96 | 89,33 | 8,34 |
| 6min | 12 | 69,41 ± 8,85 ^{c***} | 3,13 | 62,01 – 76,81 | 49,75 | 77,17 | 12,75 |
| 10min | 12 | 44,62 ± 11,01 | 3,89 | 35,42 – 53,83 | 30,49 | 59,41 | 24,67 |

ANOVA: F = 31,13, p = 0,0000 < 0,001

c – vs 10 min; *** – p < 0,001



Grafikon 4. Vijabilnost ćelija nakon različite dužine dejstva različitih koncentracija rastvora *Visine*.

6.1.2.2. Redukcija MTT-a u zavisnosti od dužine dejstva različitih koncentracija rastvora *Retrargin*

U tabelama 21-24 i na grafikonu 5 prikazani su deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a za različite koncentracije *Retrargin* u odnosu na dužinu trajanja dejstva na ćelijsku kulturu. ANOVA analiza je utvrdila statističku zavisnost intenziteta redukcije MTT-a u odnosu na dužinu dejstva za ispitivani materijal samo pri koncentraciji od 5% ($p < 0,001$), pri čemu je najveća vijabilnost ćelija uočena nakon šestominutnog dejstva rastvora. Post Hoc analizom je, takođe, potvrđeno da je vijabilnost ćelija statistički veća pri šestominutnom dejstvu u odnosu na desetominutno ($p < 0,05$), odnosno trominutno dejstvo ($p < 0,001$).

Tabela 21. Vijabilnost ćelija nakon različite dužine dejstva 5% rastvora *Retrargin* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|----------------------------------|------|----------------|-------|--------|------|
| 3min | 12 | 80,76 ± 6,69 | 2,36 | 75,17 – 86,35 | 71,95 | 90,88 | 8,28 |
| 6min | 12 | 97,89 ± 8,16 ^{a***, c*} | 2,89 | 91,07 – 104,72 | 87,51 | 112,34 | 8,34 |
| 10min | 12 | 88,62 ± 3,62 | 1,28 | 85,59 – 91,65 | 82,94 | 94,05 | 4,09 |

ANOVA: F = 14,19, p = 0,0001 < 0,001

a – vs 3M, c – vs 10M; * – p < 0,05, *** – p < 0,001

Tabela 22. Vijabilnost ćelija nakon različite dužine dejstva 10% rastvora *Retrargin* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|---------------|------|---------------|-------|-------|-------|
| 3min | 12 | 82,44 ± 4,71 | 1,67 | 78,50 – 86,38 | 75,01 | 88,09 | 5,72 |
| 6min | 12 | 81,81 ± 8,79 | 3,11 | 74,46 – 89,16 | 66,51 | 91,02 | 10,75 |
| 10min | 12 | 70,96 ± 26,23 | 9,28 | 49,03 – 92,89 | 43,51 | 97,02 | 36,97 |

ANOVA: F = 1,27, p = 0,3015

Tabela 23. Vijabilnost ćelija nakon različite dužine dejstva 25% rastvora *Retrargin* u odnosu na kontrolu

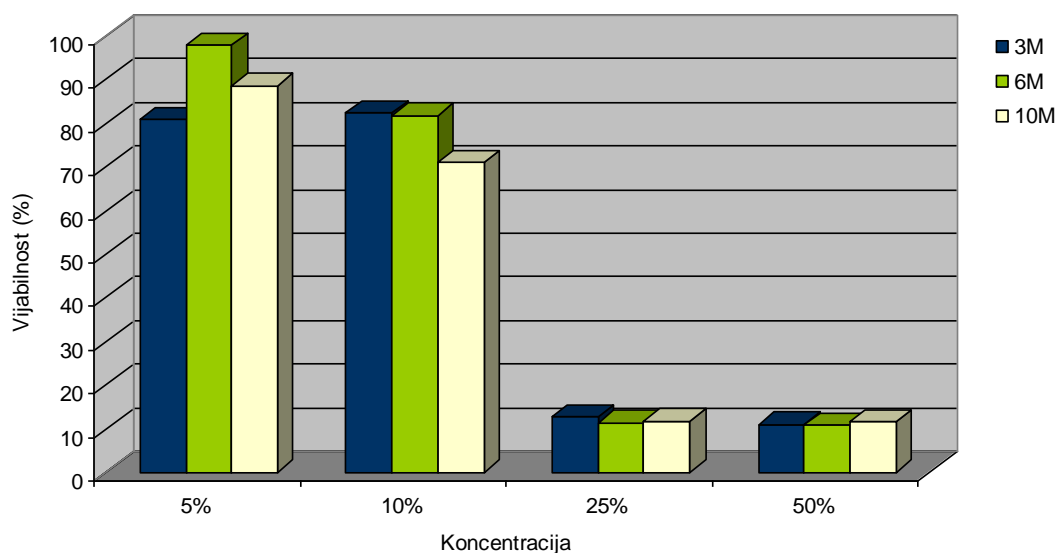
| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|-------------|------|---------------|-------|-------|-------|
| 3min | 12 | 12,79 ±0,93 | 0,33 | 12,01 – 13,56 | 11,40 | 14,31 | 7,26 |
| 6min | 12 | 11,40 ±3,48 | 1,23 | 8,49 – 14,31 | 7,76 | 15,13 | 30,53 |
| 10min | 12 | 11,77 ±2,72 | 0,96 | 9,49 – 14,04 | 9,08 | 15,48 | 23,11 |

ANOVA: F = 0,61, p = 0,5536

Tabela 24. Vijabilnost ćelija nakon različite dužine dejstva 50% rastvora *Retrargin* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|--------------|------|---------------|-------|-------|-------|
| 3min | 12 | 11,03 ± 0,60 | 0,21 | 10,52 – 11,54 | 10,00 | 11,85 | 5,48 |
| 6min | 12 | 10,73 ± 3,63 | 1,28 | 7,70 – 13,76 | 6,93 | 14,23 | 33,81 |
| 10min | 12 | 11,41 ± 1,96 | 0,69 | 9,77 – 13,05 | 9,39 | 13,89 | 17,18 |

ANOVA: F = 0,16, p = 0,8528



Grafikon 5. Vijabilnost ćelija nakon različite dužine dejstva različitih koncentracija rastvora *Retrargin*.

6.1.2.3. Redukcija MTT-a u zavisnosti od dužine dejstva različitih koncentracija rastvora *Gingival Liquid*

Deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a za različite koncentracije materijala *Gingival Liquid* u odnosu na period dejstva na ćelijsku kulturu prikazani su u tabelama 25-28 i na grafikonu 6. Izuzev pri najvišoj koncentraciji (50%) ANOVA analiza je utvrdila statističku zavisnost intenziteta redukcije MTT-a u odnosu na dužinu dejstva za sve ostale koncentracije i to na nivou statističke značajnosti $p < 0,01$ za koncentraciju 10%, odnosno $p < 0,05$ za koncentracije 10 i 25%. Interesantno je da je najveća vijabilnost prikazana pri koncentracijama 5 i 10%, nakon šestominutnog dejstva. Post Hoc analizom utvrđeno je da je statistički značajno veća no pri tromiutnom dejstvu ($p < 0,01$).

Tabela 25. Vijabilnost ćelija nakon različite dužine dejstva 5% rastvora *Gingival Liquid* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 3min | 12 | 83,74 ± 12,70 | 4,49 | 73,12 – 94,36 | 69,66 | 98,63 | 15,17 |
| 6min | 12 | 104,41 ± 7,58 ^{a**} | 2,68 | 98,07 – 110,74 | 93,80 | 118,05 | 7,26 |
| 10min | 12 | 96,40 ± 11,82 | 4,18 | 86,52 – 106,28 | 80,73 | 111,42 | 12,26 |

ANOVA: F = 7,27, p = 0,0040 < 0,01

a – vs 3M; ** – p < 0,01

Tabela 26. Vijabilnost ćelija nakon različite dužine dejstva 10% rastvora *Gingival Liquid* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 3min | 12 | 83,11 ± 9,27 | 3,28 | 75,36 – 90,86 | 71,39 | 93,16 | 11,15 |
| 6min | 12 | 103,69 ± 8,35 ^{a**} | 2,95 | 96,72 – 110,67 | 90,41 | 118,05 | 8,05 |
| 10min | 12 | 85,49 ± 23,18 | 8,19 | 66,12 – 104,87 | 60,00 | 110,72 | 27,11 |

ANOVA: F = 4,39, p = 0,0255 < 0,05

a – vs 3M; ** – p < 0,01

Tabela 27. Vijabilnost ćelija nakon različite dužine dejstva 25% rastvora *Gingival Liquid* u odnosu na kontrolu

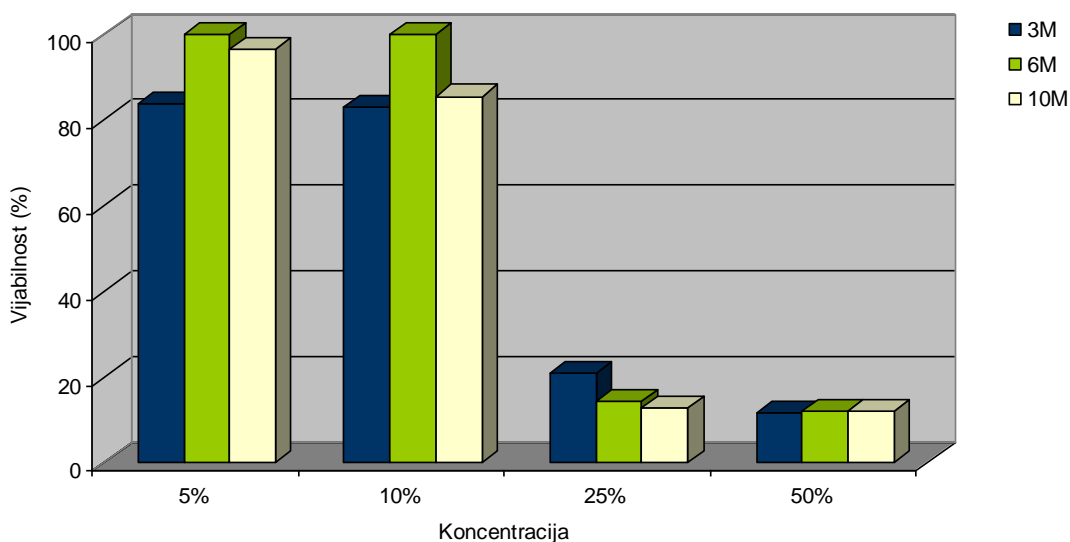
| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|--------------|------|---------------|-------|-------|-------|
| 3min | 12 | 20,87 ± 8,76 | 3,10 | 13,55 – 28,19 | 12,35 | 32,42 | 41,96 |
| 6min | 12 | 14,16 ± 4,00 | 1,41 | 10,82 – 17,50 | 9,77 | 22,40 | 28,23 |
| 10min | 12 | 12,86 ± 4,43 | 1,57 | 9,16 – 16,56 | 8,18 | 20,05 | 34,44 |

ANOVA: F = 3,95, p = 0,0350 < 0,05

Tabela 28. Vijabilnost ćelija nakon različite dužine dejstva 50% rastvora *Gingival Liquid* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|--------------|------|---------------|-------|-------|-------|
| 3min | 12 | 11,75 ± 0,54 | 0,19 | 11,29 – 12,20 | 11,00 | 12,50 | 4,63 |
| 6min | 12 | 12,08 ± 3,00 | 1,06 | 9,57 – 14,58 | 8,55 | 16,05 | 24,83 |
| 10min | 12 | 12,14 ± 3,69 | 1,30 | 9,06 – 15,22 | 8,47 | 16,08 | 30,36 |

ANOVA: F = 0,05, p = 0,9544



Grafikon 6. Vijabilnost ćelija nakon različite dužine dejstva različitih koncentracija rastvora *Gingival Liquid*.

6.1.3. Rezultati ispitivanja uticaja vrste rastvora za retrakciju gingive na intenzitet redukcije MTT-a

Ispitivan je uticaj vrste materijala na intenzitet redukcije MTT-a, odnosno vijabilnost ćelija.

6.1.3.1. Redukcija MTT-a u prisustvu 5% rastvora različitih RS

Deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a za 5% koncentraciju rastvora ispitivanih materijala i zadate periode dejstva na ćelijsku kulturu, prikazani su u tabelama 29-31 na grafikonu 7. ANOVA analiza je utvrdila statističku zavisnost vijabilnosti ćelija u odnosu na tip testiranog materijala samo za trominutni period dejstva ($p < 0,001$), a Post Hoc analiza je utvrdila značajno višu vijabilnost pri dejstvu *Visine* u odnosu na *Retrargin* ($p < 0,001$), kao i *Gingival Liquid* ($p < 0,01$).

Tabela 29. Vijabilnost ćelija nakon trominutnog dejstva 5% rastvora RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|----------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| V | 12 | 105,84 ± 8,93 ^{b***c**} | 3,65 | 96,46 – 115,21 | 94,57 | 114,60 | 8,44 |
| R | 12 | 80,76 ± 6,69 | 2,36 | 75,17 – 86,35 | 71,95 | 90,88 | 8,28 |
| GL | 12 | 83,74 ± 12,70 | 4,49 | 73,12 – 94,36 | 69,66 | 98,63 | 15,17 |

ANOVA: $F = 12,71$, $p = 0,0003 < 0,001$

b – vs R, c – vs GL; ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

Tabela 30. Vijabilnost ćelija nakon šestominutnog dejstva 5% rastvora RS u odnosu na kontrolu

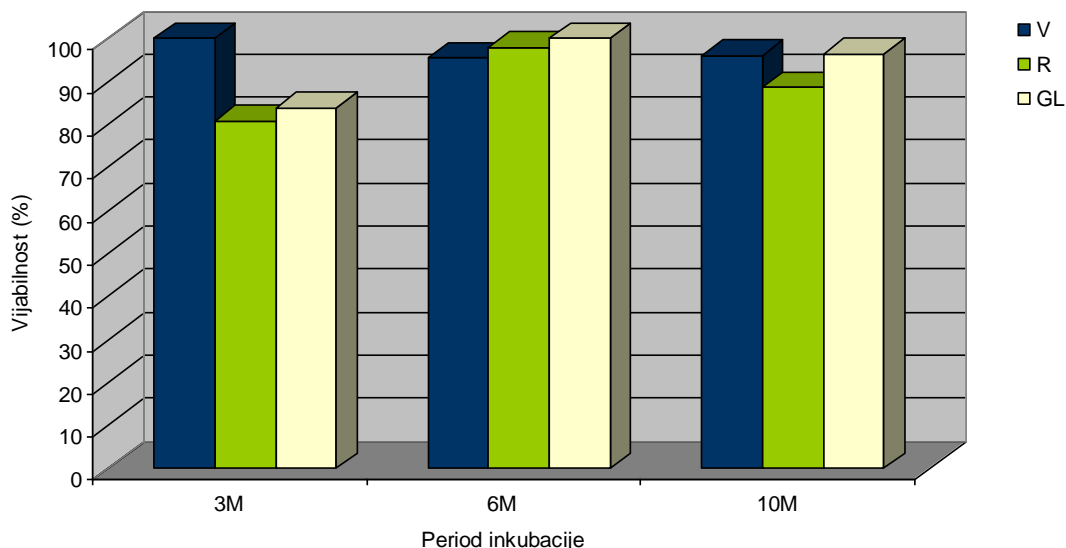
| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|---------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| V | 12 | 95,40 ± 12,20 | 4,31 | 85,20 – 105,60 | 77,77 | 117,78 | 12,79 |
| R | 12 | 97,89 ± 8,16 | 2,89 | 91,07 – 104,72 | 87,51 | 112,34 | 8,34 |
| GL | 12 | 104,41 ± 7,58 | 2,68 | 98,07 – 110,74 | 93,80 | 118,05 | 7,26 |

ANOVA: $F = 1,90$, $p = 0,1745$

Tabela 31. Vijabilnost ćelija nakon desetominutnog dejstva 5% rastvora RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|---------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| V | 12 | 95,88 ± 6,83 | 2,41 | 90,18 – 101,59 | 86,61 | 105,48 | 7,12 |
| R | 12 | 88,62 ± 3,62 | 1,28 | 85,59 – 91,65 | 82,94 | 94,05 | 4,09 |
| GL | 12 | 96,40 ± 11,82 | 4,18 | 86,52 – 106,28 | 80,73 | 111,42 | 12,26 |

ANOVA: F = 2,28, p = 0,1272



Grafikon 7. Vijabilnost ćelija nakon dejstva 5% rastvora različitih RS.

6.1.3.2. Redukcija MTT-a u prisustvu 10% rastvora različitih RS

U tabelama 32-34 dati su deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a za 10% koncentracije ispitivanih materijala i različite periode dejstva na ćelijsku kulturu. ANOVA analiza je utvrdila statističku zavisnost intenziteta redukcije MTT-a u odnosu na tip materijala kod trominutnog ($p < 0,01$) i šestominutnog dejstva na ćelije ($p < 0,001$). Post Hoc analiza je u oba slučaja utvrdila statistički značajne razlike između različitih tipova upotrebljenih materijala, date u tabelama. Za sve dužine dejstva RS na ćelije njihova vijabilnost je najniža nakon upotrebe rastvora *Retrargin* (grafikon 8).

Tabela 32. Vijabilnost ćelija nakon trominutnog dejstva 10% rastvora RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|---------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| V | 12 | 99,65 ± 11,44 ^{b**c**} | 4,04 | 90,09 – 109,21 | 90,12 | 121,47 | 11,48 |
| R | 12 | 82,44 ± 4,71 | 1,67 | 78,50 – 86,38 | 75,01 | 88,09 | 5,72 |
| GL | 12 | 83,11 ± 9,27 | 3,28 | 75,36 – 90,86 | 71,39 | 93,16 | 11,15 |

ANOVA: F = 9,54, p = 0,0011 < 0,01

b – vs R, c – vs GL; ** – p<0,01

Tabela 33. Vijabilnost ćelija nakon šestominutnog dejstva 10% rastvora RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|-------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| V | 12 | 96,27 ± 12,12 ^{b*} | 4,28 | 86,14 – 106,41 | 81,21 | 113,74 | 12,59 |
| R | 12 | 81,81 ± 8,79 | 3,11 | 74,46 – 89,16 | 66,51 | 91,02 | 10,75 |
| GL | 12 | 103,69 ± 8,35 ^{b***} | 2,95 | 96,72 – 110,67 | 90,41 | 118,05 | 8,05 |

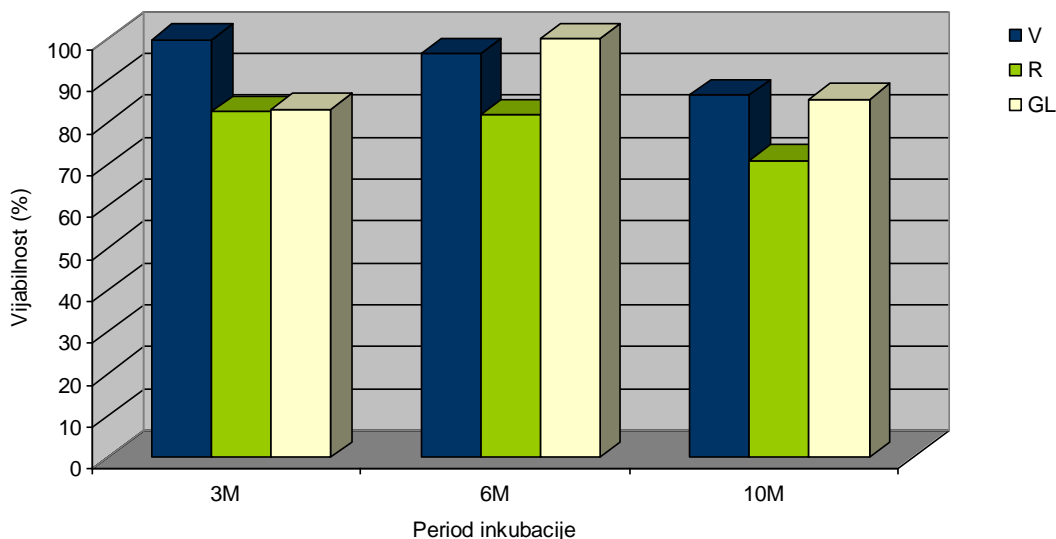
ANOVA: F = 10,11, p = 0,0008 < 0,001

a – vs V, b – vs R, c – vs GL; * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001

Tabela 34. Vijabilnost ćelija nakon desetominutnog dejstva 10% rastvora RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|---------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| V | 12 | 86,60 ± 2,87 | 1,02 | 84,19 – 89,00 | 82,27 | 91,63 | 3,32 |
| R | 12 | 70,96 ± 26,23 | 9,28 | 49,03 – 92,89 | 43,51 | 97,02 | 36,97 |
| GL | 12 | 85,49 ± 23,18 | 8,19 | 66,12 – 104,87 | 60,00 | 110,72 | 27,11 |

ANOVA: F = 1,48, p = 0,2500



Grafikon 8. Vijabilnost ćelija nakon dejstva 10% rastvora različitih RS.

6.1.3.3. Redukcija MTT-a u prisustvu 25% rastvora različitih RS

U tabelama 35-37 dati su deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a za 25% koncentraciju rastvora ispitivanih materijala i zadate periode dejstva na ćelijsku kulturu. ANOVA analiza je utvrdila maksimalnu statističku zavisnost intenziteta redukcije vijabilnosti ćelija u odnosu na tip materijala za sve dužine dejstva ($p < 0,001$), a Post Hoc analiza višestruko višu i statistički značajno veću vijabilnost ćelija pri dejstvu *Visine* u odnosu na materijale *Retrargin* i *Gingival Liquid* ($p < 0,001$) (grafikon 9).

Tabela 35. Vijabilnost ćelija nakon trominutnog dejstva 25% rastvora RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|--------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| V | 12 | 96,02 ± 10,20 ^{bc***} | 3,60 | 87,50 – 104,55 | 82,45 | 115,58 | 10,62 |
| R | 12 | 12,79 ± 0,93 | 0,33 | 12,01 – 13,56 | 11,40 | 14,31 | 7,26 |
| GL | 12 | 20,87 ± 8,76 | 3,10 | 13,55 – 28,19 | 12,35 | 32,42 | 41,96 |

ANOVA: F = 278,59, p = 0,0000 < 0,001

b – vs R, c – vs GL; *** – p < 0,001

Tabela 36. Vijabilnost ćelija nakon šestominutnog dejstva 25% rastvora RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|-------------------------------|------|---------------|-------|-------|-------|
| V | 12 | 82,87 ± 7,06 ^{bc***} | 2,50 | 76,97 – 88,77 | 72,43 | 92,58 | 8,52 |
| R | 12 | 11,40 ± 3,48 | 1,23 | 8,49 – 14,31 | 7,76 | 15,13 | 30,53 |
| GL | 12 | 14,16 ± 4,00 | 1,41 | 10,82 – 17,50 | 9,77 | 22,40 | 28,23 |

ANOVA: F = 505,15, p = 0,0000 < 0,001

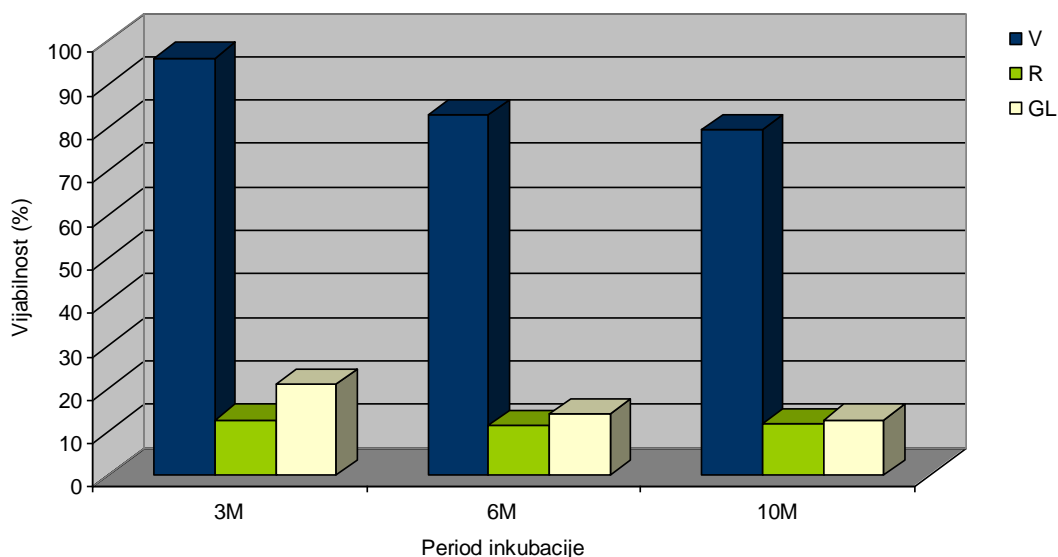
b – vs R, c – vs GL; *** – p<0,001

Tabela 37. Vijabilnost ćelija nakon desetominutnog dejstva 25% rastvora RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|-------------------------------|------|---------------|-------|-------|-------|
| V | 12 | 79,50 ± 5,52 ^{bc***} | 1,95 | 74,89 – 84,12 | 72,06 | 91,11 | 6,94 |
| R | 12 | 11,77 ± 2,72 | 0,96 | 9,49 – 14,04 | 9,08 | 15,48 | 23,11 |
| GL | 12 | 12,86 ± 4,43 | 1,57 | 9,16 – 16,56 | 8,18 | 20,05 | 34,44 |

ANOVA: F = 628,80, p = 0,0000 < 0,001

b – vs R, c – vs GL; *** – p<0,001



Grafikon 9. Vijabilnost ćelija nakon dejstva 25% rastvora različitih RS.

6.1.3.4. Redukcija MTT-a u prisustvu 50% rastvora različitih RS

Deskriptivni parametri intenziteta redukcije ćelija za 50% koncentraciju ispitivanih materijala i zadate periode dejstva na ćelijsku kulturu dati su u tabelama 38-40. Kao i pri koncentraciji materijala od 25%, ANOVA analiza je i pri maksimalno ispitivanoj koncentraciji od 50% utvrdila i maksimalnu statističku zavisnost intenziteta redukcije broja ćelija u odnosu na tip materijala za sve periode dejstva na ćelijsku kulturu ($p < 0,001$) (grafikon 10). Post Hoc analiza potvrdila je višestruko višu i statistički značajno veću vijabilnost pri dejstvu materijala *Visine* u odnosu na *Retrargin* i *Gingival Liquid* ($p < 0,001$).

Tabela 38. Vijabilnost ćelija nakon trominutnog dejstva 50% rastvora RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|-------------------------------|------|---------------|-------|-------|------|
| V | 12 | 80,74 ± 6,74 ^{bc***} | 2,55 | 74,51 – 86,97 | 68,96 | 89,33 | 8,34 |
| R | 12 | 11,03 ± 0,60 | 0,21 | 10,52 – 11,54 | 10,00 | 11,85 | 5,48 |
| GL | 12 | 11,75 ± 0,54 | 0,19 | 11,29 – 12,20 | 11,00 | 12,50 | 4,63 |

ANOVA: F = 845,94, p = 0,0000 < 0,001

b – vs R, c – vs GL; *** – p < 0,001

Tabela 39. Vijabilnost ćelija nakon šestominutnog dejstva 50% rastvora RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|-------------------------------|------|---------------|-------|-------|-------|
| V | 12 | 69,41 ± 8,85 ^{bc***} | 3,13 | 62,01 – 76,81 | 49,75 | 77,17 | 12,75 |
| R | 12 | 10,73 ± 3,63 | 1,28 | 7,70 – 13,76 | 6,93 | 14,23 | 33,81 |
| GL | 12 | 12,08 ± 3,00 | 1,06 | 9,57 – 14,58 | 8,55 | 16,05 | 24,83 |

ANOVA: F = 267,96, p = 0,0000 < 0,001

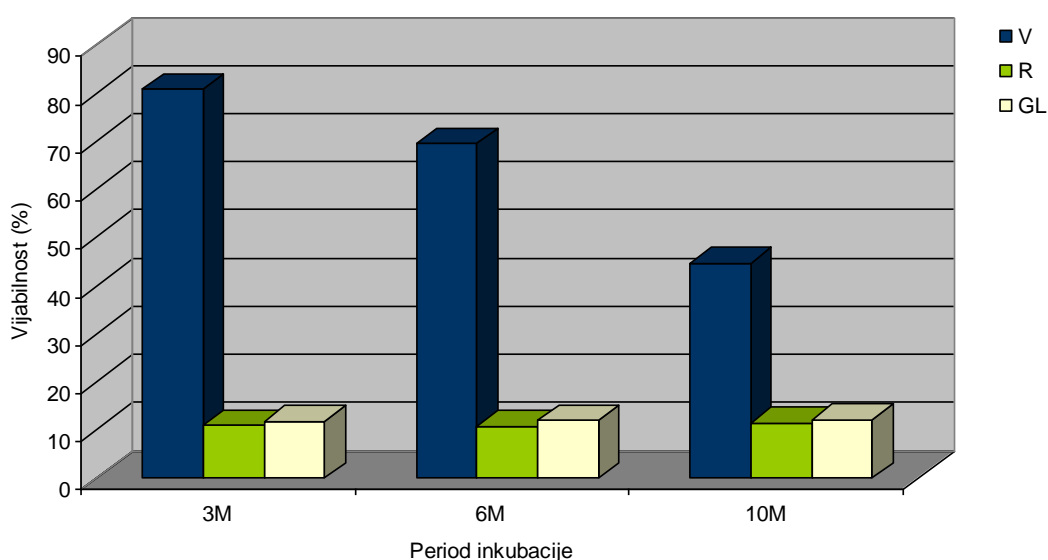
b – vs R, c – vs GL; *** – p < 0,001

Tabela 40. Vijabilnost ćelija nakon desetominutnog dejstva 50% rastvora RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|--------------------------------|------|---------------|-------|-------|-------|
| V | 12 | 44,62 ± 11,01 ^{bc***} | 3,89 | 35,42 – 53,83 | 30,49 | 59,41 | 24,67 |
| R | 12 | 11,41 ± 1,96 | 0,69 | 9,77 – 13,05 | 9,39 | 13,89 | 17,18 |
| GL | 12 | 12,14 ± 3,69 | 1,30 | 9,06 – 15,22 | 8,47 | 16,08 | 30,36 |

ANOVA: F = 62,29, p = 0,0000 < 0,001

b – vs R, c – vs GL; *** – p<0,001



Grafikon 10. Vijabilnost ćelija nakon dejstva 50% rastvora različitih RS.

Analizom rezultata pri višim koncentracijama rastvora RS (25 i 50%) uočava se izrazito veća vijabilnost ćelija nakon dejstva materijala *Visine* u odnosu na materijale *Retrargin* i *Gingival Liquid*, bez obzira na period dejstva na ćelijsku kulturu.

6.2. OPORAVAK ĆELIJA PRAĆEN 24 ČASA NAKON DELOVANJA SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE

6.2.1. Rezultati ispitivanja sposobnosti ćelija da se oporave nakon delovanja sredstava za retrakciju gingive

6.2.1.1. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od koncentracije rastvora RS nakon 24 h oporavka od trominutnog dejstva RS

Intenzitet redukcije MTT-a direktno je srazmeran broju živih ćelija, te se njegovim merenjem određivala vijabilnost ćelija nakon dejstva rastvora ispitivanih RS koji je praćen jednodnevnim oporavkom ćelija u hranjivom medijumu. Deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora RS, nakon njihovog trominutnog delovanja i naknadne jednodnevne inkubacije ćelija prikazani su u tabelama 41-43. ANOVA analiza je utvrdila statističku zavisnost intenziteta redukcije MTT-a u odnosu na koncentraciju rastvora kod svih ispitivanih materijala ($p < 0,001$). Post Hoc analiza je utvrdila statistički značajne razlike između različitih koncentracija rastvora date u tabelama. Generalno, vijabilnost ćelija se smanjivala sa porastom koncentracije rastvora materijala, a porast koncentracija na 25% i 50% kod *Retrargin* i *Gingival Liquid* je doveo do višestrukog smanjenja vijabilnosti ćelija u odnosu na koncentracije od 5 i 10% (grafikon 11).

Tabela 41. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja rastvora *Visine* u trajanju od tri minuta

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|-----------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 5% | 12 | 98,69 ± 4,32 ^{d**} | 1,53 | 95,08 – 102,30 | 91,46 | 104,67 | 4,37 |
| 10% | 12 | 96,21 ± 2,72 ^{d*} | 0,96 | 93,94 – 98,48 | 91,88 | 101,25 | 2,82 |
| 25% | 12 | 90,34 ± 4,59 ^{d*} | 1,62 | 86,50 – 94,18 | 81,60 | 97,77 | 5,08 |
| 50% | 12 | 64,19 ± 10,95 | 3,87 | 55,04 – 73,35 | 41,32 | 75,50 | 17,06 |

ANOVA: $F = 48,06$, $p = 0,0000 < 0,001$

d – vs 50%; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$

Tabela 42. Vijabilnost čelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja rastvora *Retrargin* u trajanju od tri minuta

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|--------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 5% | 12 | 101,67 ± 5,10 ^{cd***} | 1,80 | 97,41 – 105,93 | 95,53 | 111,13 | 5,01 |
| 10% | 12 | 97,06 ± 5,08 ^{cd***} | 1,80 | 92,81 – 101,30 | 90,31 | 103,12 | 5,23 |
| 25% | 12 | 7,67 ± 0,80 | 0,28 | 7,00 – 8,34 | 6,43 | 8,49 | 10,46 |
| 50% | 12 | 7,68 ± 0,70 | 0,25 | 7,09 – 8,26 | 6,67 | 8,61 | 9,06 |

ANOVA: F = 1697,99, p = 0,0000 < 0,001

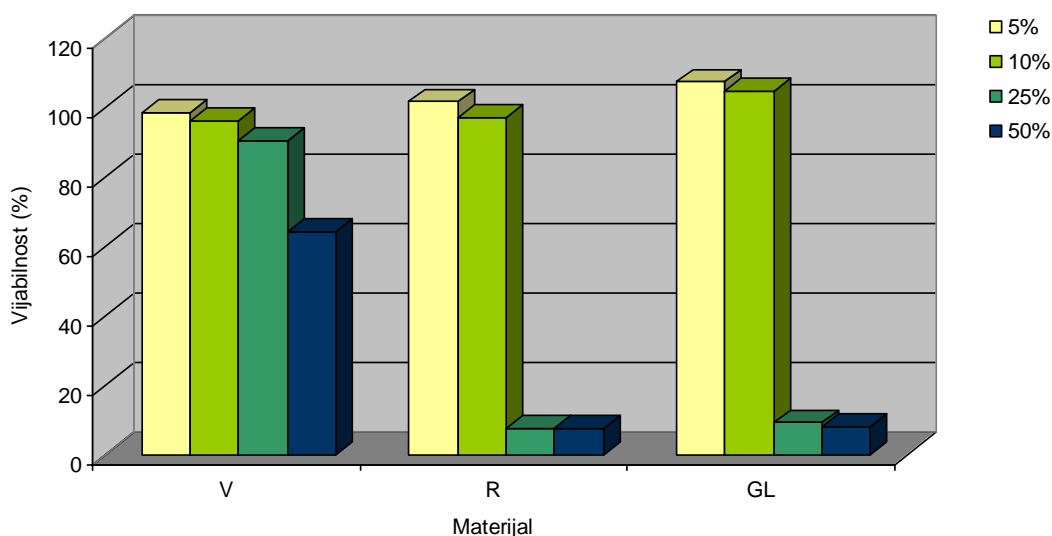
c – vs 25%, d – vs 50%; *** – p<0,001

Tabela 43. Vijabilnost čelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja rastvora *Gingival Liquid* u trajanju od tri minuta

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|--------------------------------|------|-----------------|--------|--------|------|
| 5% | 12 | 107,39 ± 5,89 ^{cd***} | 2,08 | 102,47 – 112,31 | 100,46 | 115,44 | 5,48 |
| 10% | 12 | 104,69 ± 6,06 ^{cd***} | 2,14 | 99,62 – 109,75 | 95,86 | 111,66 | 5,79 |
| 25% | 12 | 9,20 ± 0,90 | 0,32 | 8,45 – 9,95 | 7,82 | 10,58 | 9,75 |
| 50% | 12 | 8,10 ± 0,81 | 0,29 | 7,43 – 8,77 | 6,92 | 9,36 | 9,96 |

ANOVA: F = 1390,01, p = 0,0000 < 0,001

c – vs 25%, d – vs 50%; *** – p<0,001



Grafikon 11. Srednja vrednost vijabilnosti čelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja rastvora RS u trajanju od tri minuta.

6.2.1.2. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od koncentracije rastvora RS nakon 24 h oporavka od šestominutnog dejstva RS

Deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora RS nakon šestominutnog dejstva i naknadne inkubacije ćelijske kulture prikazani su u tabelama 44-46. ANOVA analizom potvrđena je statističku zavisnost intenziteta redukcije MTT-a od koncentracije rastvora za sve ispitivane materijale ($p < 0,001$), a rezultati Post Hoc analize i statistički značajne razlike između različitih koncentracija dati su tabelama. Ćelijski oporavak opada sa porastom koncentracije rastvora materijala. Porast koncentracija rastvora na 25% i 50% kod uzoraka *Retrargin* i *Gingival Liquid* dovodi do višestrukog smanjenja ćelijskog oporavka u odnosu na koncentracije od 5 i 10% (grafikon 12).

Tabela 44. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja rastvora *Visine* u trajanju od šest minuta

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|------------------------------|-------|-----------------|-------|--------|-------|
| 5% | 12 | 104,53 ± 3,11 ^{d**} | 1,10 | 101,92 – 107,13 | 99,37 | 107,80 | 2,98 |
| 10% | 12 | 92,67 ± 15,67 ^{d*} | 5,54 | 79,56 – 105,77 | 70,20 | 110,53 | 16,91 |
| 25% | 12 | 61,86 ± 12,89 | 15,16 | 26,00 – 97,72 | 12,68 | 104,27 | 69,33 |
| 50% | 12 | 48,75 ± 20,57 | 10,45 | 24,03 – 73,47 | 13,16 | 78,66 | 60,65 |

ANOVA: $F = 7,29, p = 0,0009 < 0,001$

d – vs 50%; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$

Tabela 45. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja rastvora *Retrargin* u trajanju od šest minuta

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|--------------------------------|-------|-----------------|--------|--------|-------|
| 5% | 12 | 105,52 ± 3,80 ^{cd***} | 1,34 | 102,34 – 108,69 | 101,39 | 111,58 | 3,60 |
| 10% | 12 | 66,85 ± 12,10 ^{cd*} | 14,88 | 31,66 – 102,04 | 27,23 | 114,22 | 62,97 |
| 25% | 12 | 7,65 ± 0,92 | 0,38 | 6,68 – 8,62 | 6,49 | 9,00 | 12,06 |
| 50% | 12 | 7,26 ± 0,73 | 0,26 | 6,65 – 7,87 | 6,37 | 8,28 | 10,04 |

ANOVA: $F = 36,22, p = 0,0000 < 0,001$

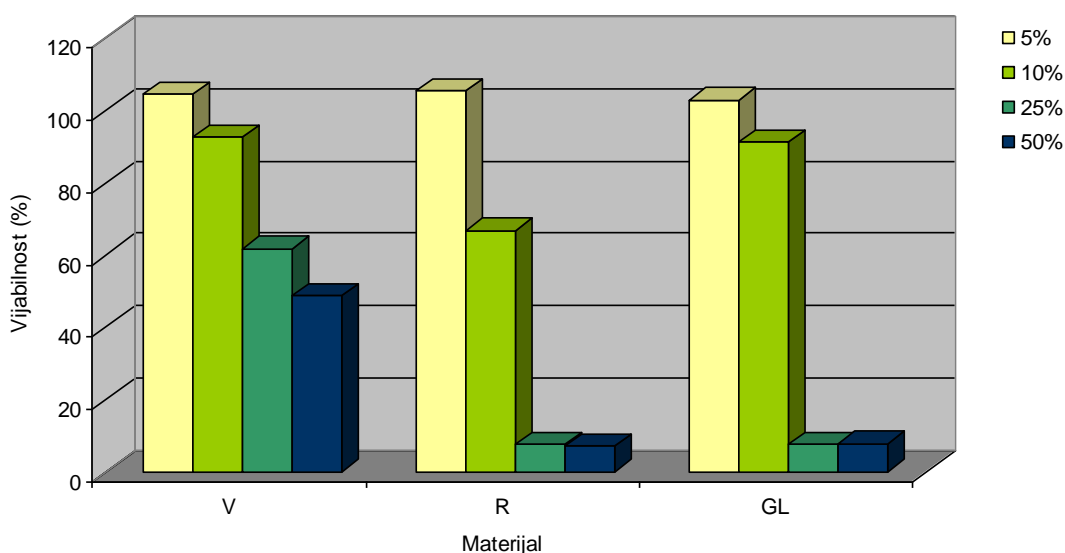
c – vs 25%, d – vs 50%; *** – $p < 0,001$

Tabela 46. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja rastvora Gingival Liquid u trajanju od šest minuta

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|--------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 5% | 12 | 102,87 ± 7,68 ^{cd***} | 2,72 | 96,45 – 109,29 | 88,54 | 112,33 | 7,47 |
| 10% | 12 | 91,33 ± 9,29 ^{cd***} | 3,28 | 83,57 – 99,10 | 79,61 | 105,19 | 10,17 |
| 25% | 12 | 7,69 ± 0,41 | 0,17 | 7,26 – 8,13 | 7,03 | 8,22 | 5,37 |
| 50% | 12 | 7,89 ± 0,30 | 0,11 | 7,64 – 8,14 | 7,39 | 8,22 | 3,82 |

ANOVA: F = 511,10, p = 0,0000 < 0,001

c – vs 25%, d – vs 50%; *** – p<0,001



Grafikon 12. Srednja vrednost vijabilnosti ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja rastvora RS u trajanju od šest minuta.

6.2.1.3. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od koncentracije rastvora RS nakon 24 h oporavka od desetominutnog dejstva RS

Deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora RS nakon desetominutnog dejstva i naknadne jednodnevne inkubacije ćelija dati su u tabelama 47-49. Statistička zavisnost intenziteta redukcije MTT-a u odnosu na koncentraciju kod svih ispitivanih materijala potvrđena je ANOVOM (p<0,001). Procenat oporavka opada sa porastom koncentracije rastvora materijala, a kao i nakon trominutnog i šestominutnog dejstva i pri desetominutnom dejstvu. Porast koncentracija rastvora na 25% i 50% kod *Retrargin* i *Gingival Liquid* doveo je do višestrukog smanjenja ćelijskog oporavka u odnosu na koncentracije

od 5% i 10%. Kod uzoraka rastvora *Retrargin* primećeno je i četverostruko smanjenje oporavka i kod 10% koncentracije rastvora u odnosu na koncentraciju od 5% (grafikon 13).

Tabela 47. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja rastvora *Visine* u trajanju od deset minuta

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|--------------------------------|------|---------------|-------|--------|-------|
| 5% | 12 | 96,11 ± 4,53 ^{cd***} | 1,60 | 92,32 – 99,89 | 90,22 | 104,92 | 4,71 |
| 10% | 12 | 89,62 ± 5,87 ^{c*d***} | 2,07 | 84,72 – 94,53 | 77,72 | 95,95 | 6,55 |
| 25% | 12 | 75,42 ± 9,02 ^{d***} | 3,19 | 67,89 – 82,96 | 63,99 | 87,35 | 11,95 |
| 50% | 12 | 38,37 ± 11,79 | 4,17 | 28,51 – 48,23 | 22,43 | 52,71 | 30,73 |

ANOVA: F = 77,56, p = 0,0000 < 0,001

c – vs 25%, d – vs 50%; * – p<0,05, *** – p<0,001

Tabela 48. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja rastvora *Retrargin* u trajanju od deset minuta

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|--------------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 5% | 12 | 97,41 ± 6,68 ^{bcd***} | 2,36 | 91,82 – 103,00 | 85,12 | 106,27 | 6,86 |
| 10% | 12 | 21,18 ± 12,31 | 4,35 | 10,89 – 31,47 | 8,17 | 36,09 | 58,10 |
| 25% | 12 | 6,57 ± 0,62 | 0,22 | 6,05 – 7,09 | 5,73 | 7,39 | 9,45 |
| 50% | 12 | 6,26 ± 0,45 | 0,16 | 5,89 – 6,64 | 5,73 | 6,89 | 7,16 |

ANOVA: F = 309,09, p = 0,0000 < 0,001

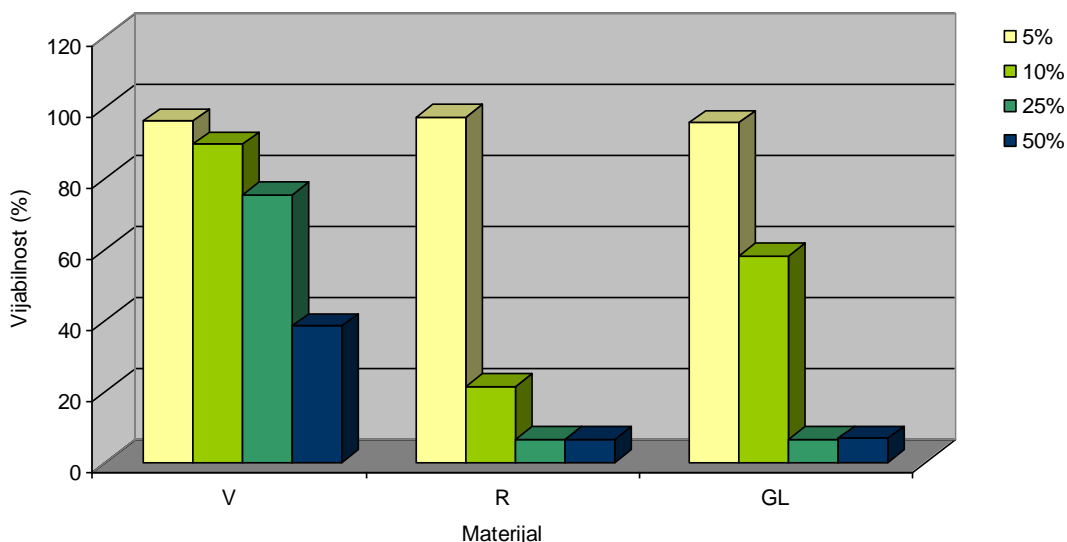
b – vs 10%, c – vs 25%, d – vs 50%; *** – p<0,001

Tabela 49. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja rastvora *Gingival Liquid* u trajanju od deset minuta

| Koncentracija | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|---------------|----|---------------------------------|-------|---------------|-------|--------|-------|
| 5% | 12 | 95,65 ± 3,83 ^{b*cd***} | 1,35 | 92,44 – 98,85 | 91,18 | 101,54 | 4,00 |
| 10% | 12 | 58,32 ± 29,09 ^{cd***} | 10,29 | 33,99 – 82,64 | 21,33 | 88,27 | 49,89 |
| 25% | 12 | 6,39 ± 0,39 | 0,14 | 6,06 – 6,72 | 5,74 | 6,87 | 6,13 |
| 50% | 12 | 6,67 ± 1,11 | 0,39 | 5,74 – 7,59 | 5,63 | 8,92 | 16,61 |

ANOVA: F = 15094,17, p = 0,0000 < 0,001

b – vs 10%, c – vs 25%, d – vs 50%; * – p<0,05, *** – p<0,001



Grafikon 13. Srednja vrednost vijabilnosti ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja rastvora RS u trajanju od deset minuta.

Analizom rezultata uočava se ravnomeran pad ćelijske vijabilnosti sa porastom koncentracije rastvora za *Visine*, a smanjenje oporvka za koncentracije 25 i 50% višestruko je niže u odnosu na koncentracije 5 i 10% kod uzoraka *Retrargin* i *Gingival Liquid*.

6.2.2. Rezultati ispitivanja sposobnosti ćelija da se oporave nakon različite dužine delovanja sredstava za retrakciju gingive

Ispitivan je dužine dejstva ispitivanih rastvora RS na ćelijsku vijabilnost posle naknadne jednodnevne inkubacije ćelijske kulture.

6.2.2.1. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od dužine dejstva rastvora *Visine* nakon 24 h oporavka

Deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a za zadate koncentracije rastvora *Visine* u odnosu na dužinu dejstva prikazani su u tabelama 50-53. ANOVA analiza je utvrdila statističku zavisnost intenziteta redukcije ćelijske vijabilnosti u odnosu na period dejstva 50% rastvora materijala *Visine* ($p < 0,05$), a još izraženiju pri koncentracijama 5 i 25% ($p < 0,01$). Post Hoc analiza je utvrdila značajno veću vijabilnost za trominutno u odnosu na desetominutno dejstvo za koncentracije rastvora od 10, 25 i 50%, nakon naknadne jednodnevne inkubacije ćelija (grafikon 14).

Tabela 50. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 5% rastvora *Visine* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|--------------------------------|------|-----------------|-------|--------|------|
| 3 min | 12 | 98,69 ± 4,32 | 1,53 | 95,08 – 102,30 | 91,46 | 104,67 | 4,37 |
| 6 min | 12 | 104,53 ± 3,11 ^{a*c**} | 1,10 | 101,92 – 107,13 | 99,37 | 107,80 | 2,98 |
| 10 min | 12 | 96,11 ± 4,53 | 1,60 | 92,32 – 99,89 | 90,22 | 104,92 | 4,71 |

ANOVA: F = 9,15, p = 0,0014 < 0,01

a – vs 3min c – vs 10 min; * – p < 0,05, ** – p < 0,01

Tabela 51. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 10% rastvora *Visine* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|----------------------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| 3 min | 12 | 96,21 ± 2,72 ^{c*} | 0,96 | 93,94 – 98,48 | 91,88 | 101,25 | 2,82 |
| 6 min | 12 | 92,67 ± 15,67 | 5,54 | 79,56 – 105,77 | 70,20 | 110,53 | 16,91 |
| 10 min | 12 | 89,62 ± 5,87 | 2,07 | 84,72 – 94,53 | 77,72 | 95,95 | 6,55 |

ANOVA: F = 0,91, p = 0,4184

c – vs 10min; * – p < 0,05

Tabela 52. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 25% rastvora *Visine* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|-----------------------------|-------|---------------|-------|--------|-------|
| 3 min | 12 | 90,34 ± 4,59 ^{c**} | 1,62 | 86,50 – 94,18 | 81,60 | 97,77 | 5,08 |
| 6 min | 12 | 61,86 ± 42,89 | 15,16 | 26,00 – 97,72 | 12,68 | 104,27 | 69,33 |
| 10 min | 12 | 75,42 ± 9,02 | 3,19 | 67,89 – 82,96 | 63,99 | 87,35 | 11,95 |

ANOVA: F = 2,51, p = 1054

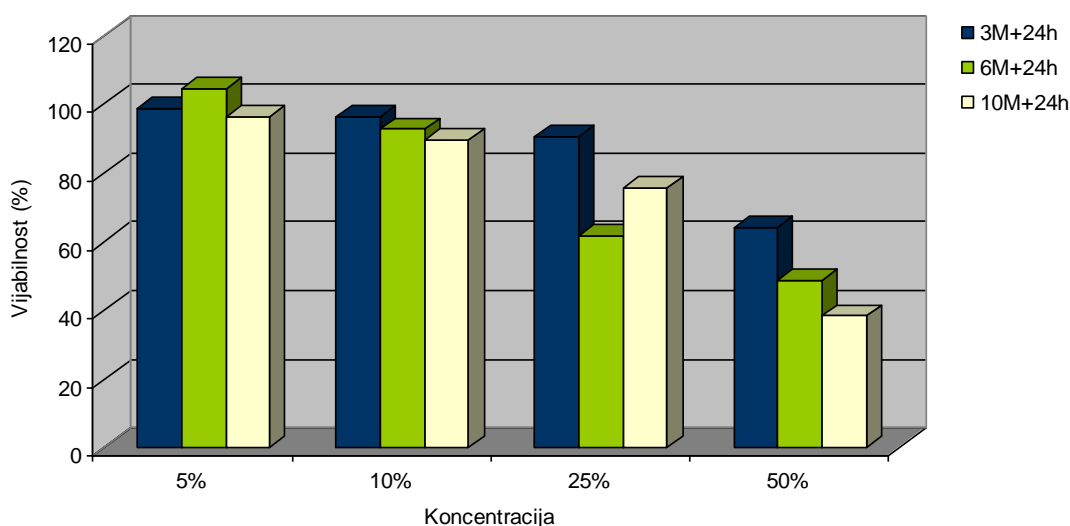
c – vs 10 min; ** – p < 0,01

Tabela 53. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 50% rastvora *Visine* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|------------------------------|-------|---------------|-------|-------|-------|
| 3 min | 12 | 64,19 ± 10,95 ^{c**} | 3,87 | 55,04 – 73,35 | 41,32 | 75,50 | 17,06 |
| 6 min | 12 | 48,75 ± 29,57 | 10,45 | 24,03 – 73,47 | 13,16 | 78,66 | 60,65 |
| 10 min | 12 | 38,37 ± 11,79 | 4,17 | 28,51 – 48,23 | 22,43 | 52,71 | 30,73 |

ANOVA: F = 3,56, p = 0,0461 < 0,05

c – vs 10 min; ** – p < 0,01



Grafikon 14. Srednja vrednost vijabilnosti ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja rastvora *Visine*.

6.2.2.2. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od dužine dejstva rastvora *Retrargin* nakon 24 h oporavka

U tabelama 54-57 prikazani su deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a za različite koncentracije materijala *Retrargin* u odnosu na period dejstva na ćelijsku kulturu. ANOVA analiza je utvrdila statističku zavisnost intenziteta redukcije vijabilnosti ćelija u odnosu na period dejstva kod materijala *Retrargin* pri svim koncentracijama i to p < 0,05 pri koncentraciji od 5% i 25%, odnosno p < 0,001 pri koncentracijama od 10% i 50%. Najveći ćelijski oporavak uočen je pri najnižoj koncentraciji od 5% i nakon trominutnog dejstva, dok je kod svih ostalih koncentracija primećen nakon šestominutnog dejstva i naknadne jedno-

dnevne inkubacije ćelija (grafikon 15). Post Hoc analizom potvrđena je statistički značajna razlika u odnosu na period dejstva nakon desetominutnog dejstva rastvora RS na ćelijsku kulturu i njihove naknadne inkubacije u hranjivom medijumu.

Tabela 54. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 5% rastvora *Retrargin* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|-----------------------------|------|-----------------|--------|--------|------|
| 3 min | 12 | 101,67 ± 5,10 | 1,80 | 97,41 – 105,93 | 95,53 | 111,13 | 5,01 |
| 6 min | 12 | 105,52 ± 3,80 ^{c*} | 1,34 | 102,34 – 108,69 | 101,39 | 111,58 | 3,60 |
| 10 min | 12 | 97,41 ± 6,68 | 2,36 | 91,82 – 103,00 | 85,12 | 106,27 | 6,86 |

ANOVA: F = 4,64, p = 0,0215 < 0,05

c – vs 10min; * – p < 0,05

Tabela 55. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 10% rastvora *Retrargin* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|------------------------------|-------|----------------|-------|--------|-------|
| 3 min | 12 | 97,06 ± 5,08 ^{c***} | 1,80 | 92,81 – 101,30 | 90,31 | 103,12 | 5,23 |
| 6 min | 12 | 66,85 ± 42,10 | 14,88 | 31,66 – 102,04 | 27,23 | 114,22 | 62,97 |
| 10 min | 12 | 21,18 ± 12,31 | 4,35 | 10,89 – 31,47 | 8,17 | 36,09 | 58,10 |

ANOVA: F = 17,96, p = 0,0000 < 0,001

c – vs 10min; *** – p < 0,001

Tabela 56. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 25% rastvora *Retrargin* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|---------------------------|------|-------------|------|------|-------|
| 3 min | 12 | 7,67 ± 0,80 ^{c*} | 0,28 | 7,00 – 8,34 | 6,43 | 8,49 | 10,46 |
| 6 min | 12 | 7,65 ± 0,92 ^{c*} | 0,38 | 6,68 – 8,62 | 6,49 | 9,00 | 12,06 |
| 10 min | 12 | 6,57 ± 0,62 | 0,22 | 6,05 – 7,09 | 5,73 | 7,39 | 9,45 |

ANOVA: F = 5,00, p = 0,0180

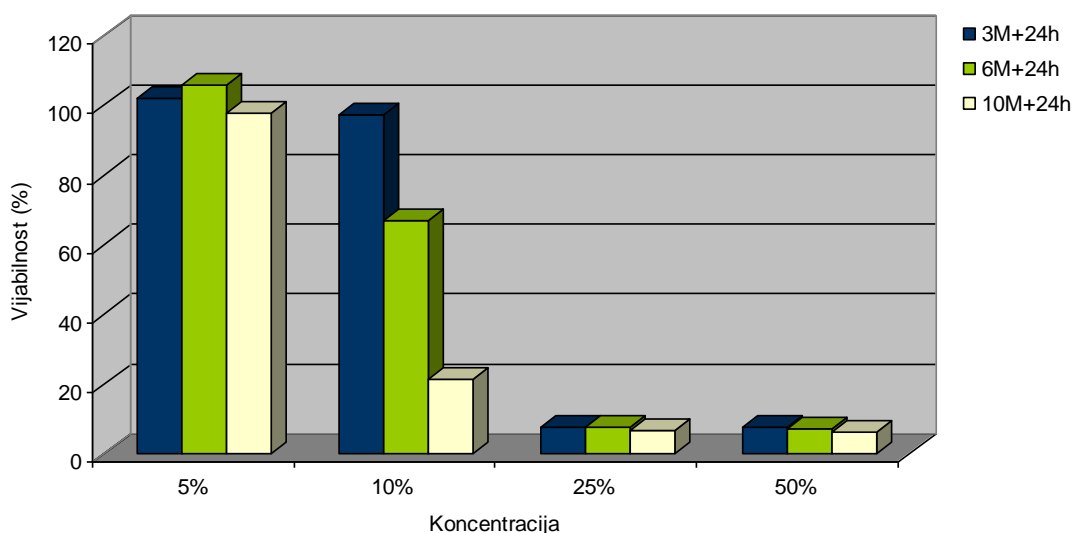
c – vs 10min; * – p < 0,05

Tabela 57. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 50% rastvora *Retrargin* u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|-----------------------------|------|-------------|------|------|-------|
| 3 min | 12 | 7,68 ± 0,70 ^{c***} | 0,25 | 7,09 – 8,26 | 6,67 | 8,61 | 9,06 |
| 6 min | 12 | 7,26 ± 0,73 ^{c*} | 0,26 | 6,65 – 7,87 | 6,37 | 8,28 | 10,04 |
| 10 min | 12 | 6,26 ± 0,45 | 0,16 | 5,89 – 6,64 | 5,73 | 6,89 | 7,16 |

ANOVA: F = 10,41, p = 0,0007 < 0,001

c – vs 10min* – p < 0,05, *** – p < 0,01



Grafikon 15. Srednja vrednost vijabilnosti ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja rastvora *Retrargin*.

6.2.2.3. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od dužine dejstva rastvora *Gingival Liquid* nakon 24 h oporavka

Deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a za materijal *Gingival Liquid* za zadate koncentracije rastvora u odnosu na period dejstva prikazani su u tabelama 58-61. Pri koncentracijama od 5% i 50% ANOVA analiza je utvrdila statističku zavisnost intenziteta redukcije vijabilnosti ćelija u odnosu na period dejstva na nivou statističke značajnosti $p < 0,01$, dok je za koncentracije 10% i 25% bila na nivou statističke značajnosti od $p < 0,001$. Interesantno je da je najveći oporavak uočen pri koncentracijama rastvora od 5 i 10% nakon perioda dejstva od šest minuta i naknadne inkubacije ćelijske kulture. Post Hoc analizom utvrđene su statistički značajne razlike, te su najniže vrednosti vijabilnosti ćelija uočene su

pri dužini dejstva od deset minuta, a najviše pri dužini dejstva od tri minuta i naknadne jednodnevne inkubacije ćelija (grafikon 16).

Tabela 58. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 5% rastvora Gingival Liquid u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|------------------------------|------|-----------------|--------|--------|------|
| 3 min | 12 | 107,39 ± 5,89 ^{c**} | 2,08 | 102,47 – 112,31 | 100,46 | 115,44 | 5,48 |
| 6 min | 12 | 102,87 ± 7,68 | 2,72 | 96,45 – 109,29 | 88,54 | 112,33 | 7,47 |
| 10 min | 12 | 95,65 ± 3,83 | 1,35 | 92,44 – 98,85 | 91,18 | 101,54 | 4,00 |

ANOVA: F = 7,77, p = 0,0030 < 0,01

c – vs 10min; ** – p < 0,01

Tabela 59. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 10% rastvora Gingival Liquid u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|---------------------------------|-------|----------------|-------|--------|-------|
| 3 min | 12 | 104,69 ± 6,06 ^{b*c***} | 2,14 | 99,62 – 109,75 | 95,86 | 111,66 | 5,79 |
| 6 min | 12 | 91,33 ± 9,29 ^{c*} | 3,28 | 83,57 – 99,10 | 79,61 | 105,19 | 10,17 |
| 10 min | 12 | 58,32 ± 29,09 | 10,29 | 33,99 – 82,64 | 21,33 | 88,27 | 49,89 |

ANOVA: F = 14,11, p = 0,0001 < 0,001

b – vs 6 min, c – vs 10 min; * – p < 0,05, ** – p < 0,01

Tabela 60. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 25% rastvora Gingival Liquid u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|------------------------------|------|-------------|------|-------|------|
| 3 min | 12 | 9,20 ± 0,90 ^{bc***} | 0,32 | 8,45 – 9,95 | 7,82 | 10,58 | 9,75 |
| 6 min | 12 | 7,69 ± 0,41 ^{c**} | 0,17 | 7,26 – 8,13 | 7,03 | 8,22 | 5,37 |
| 10 min | 12 | 6,39 ± 0,39 | 0,14 | 6,06 – 6,72 | 5,74 | 6,87 | 6,13 |

ANOVA: F = 39,75, p = 0,0000 < 0,001

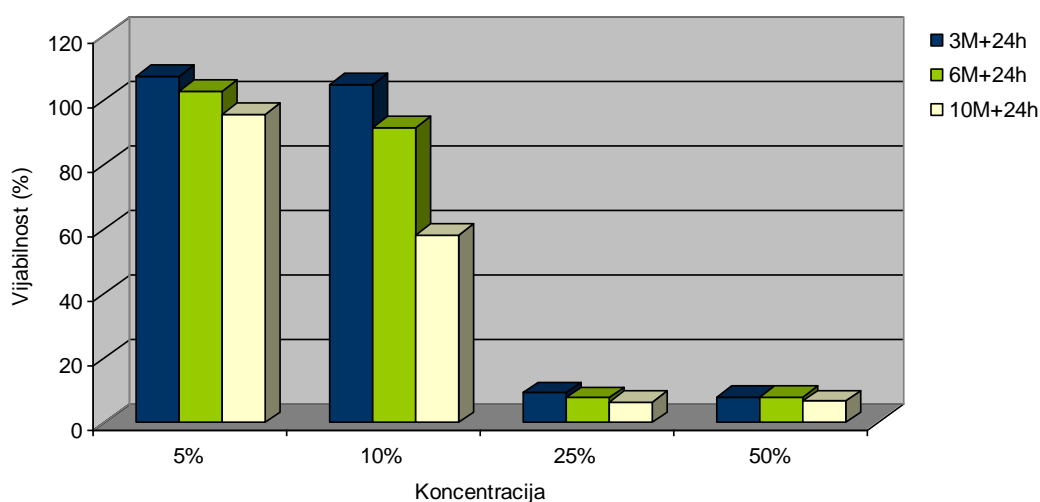
b – vs 6 min, c – vs 10 min; ** – p < 0,01, *** – p < 0,001

Tabela 61. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 50% rastvora Gingival Liquid u odnosu na kontrolu

| Period dejstva | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|----------------|----|---------------------------|------|-------------|------|------|-------|
| 3 min | 12 | 8,10 ± 0,81 ^{c*} | 0,29 | 7,43 – 8,77 | 6,92 | 9,36 | 9,96 |
| 6 min | 12 | 7,89 ± 0,30 ^{c*} | 0,11 | 7,64 – 8,14 | 7,39 | 8,22 | 3,82 |
| 10 min | 12 | 6,67 ± 1,11 | 0,39 | 5,74 – 7,59 | 5,63 | 8,92 | 16,61 |

ANOVA: F = 7,29, p = 0,0039

c – vs 10 min; * – p<0,05



Grafikon 16. Srednja vrednost vijabilnosti ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja rastvora Gingival Liquid.

6.2.3. Rezultati ispitivanja sposobnosti ćelija da se oporave nakon delovanja različitih vrsta sredstava za retrakciju gingive

Ispitivan je uticaj tipa rastvora materijala različitih koncentracija i perioda njihovog dejstva na redukciju vijabilnosti ćelija nakon njihove jednodnevnog oporavka.

6.2.3.1. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od dužine dejstva 5% rastvora različitih RS nakon 24 h oporavka

Deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a za 5% rastvore ispitivanih materijala i zadate periode dejstva na ćelijsku kulturu prikazani su u tabelama 62-64 i na grafikonu

17. ANOVA analiza je utvrdila statističku zavisnost intenziteta redukcije vijabilnosti ćelija u zavisnosti od tipa materijala jedino nakon trominutnog delovanja na ćelijsku kulturu i njene naknadne jednodnevne inkubacije u medijumu ($p < 0,001$), dok je Post Hoc analiza utvrdila značajno višu ćelijsku vijabilnost kod materijala *Visine* u odnosu na *Gingival Liquid* ($p < 0,01$).

Tabela 62. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od trominutnog delovanja 5% rastvora različitih RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|-----------------------------|------|-----------------|--------|--------|------|
| V | 12 | 98,69 ± 4,32 ^{c**} | 1,53 | 95,08 – 102,30 | 91,46 | 104,67 | 4,37 |
| R | 12 | 101,67 ± 5,10 | 1,80 | 97,41 – 105,93 | 95,53 | 111,13 | 5,01 |
| GL | 12 | 107,39 ± 5,89 | 2,08 | 102,47 – 112,31 | 100,46 | 115,44 | 5,48 |

ANOVA: $F = 5,91, p = 0,0092 < 0,01$

c – vs GL; ** – $p < 0,01$

Tabela 63. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od šestominutnog delovanja 5% rastvora različitih RS u odnosu na kontrolu

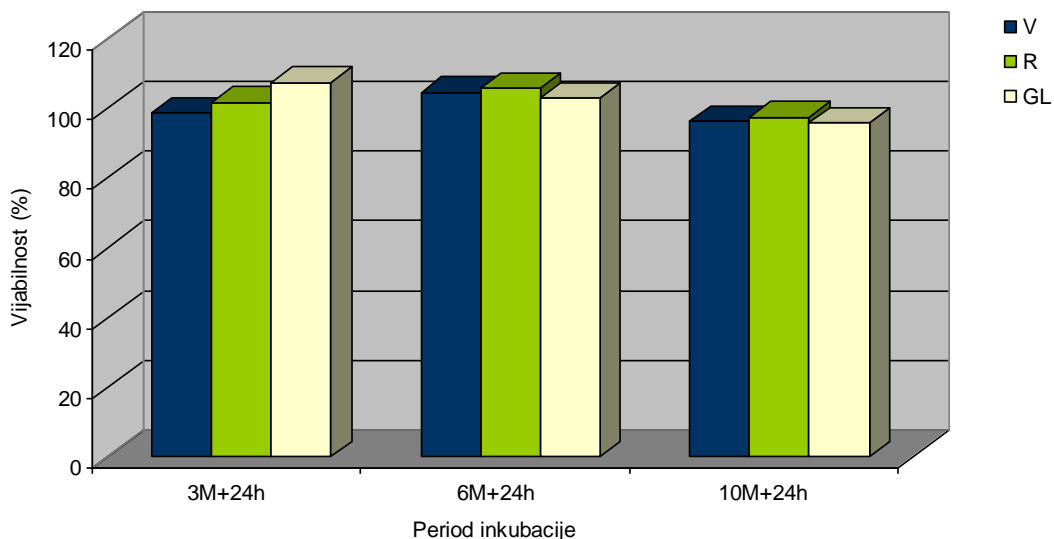
| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|---------------|------|-----------------|--------|--------|------|
| V | 12 | 104,53 ± 3,11 | 1,10 | 101,92 – 107,13 | 99,37 | 107,80 | 2,98 |
| R | 12 | 105,52 ± 3,80 | 1,34 | 102,34 – 108,69 | 101,39 | 111,58 | 3,60 |
| GL | 12 | 102,87 ± 7,68 | 2,72 | 96,45 – 109,29 | 88,54 | 112,33 | 7,47 |

ANOVA: $F = 0,51, p = 0,6052$

Tabela 64. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od desetominutnog delovanja 5% rastvora različitih RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|--------------|------|----------------|-------|--------|------|
| V | 12 | 96,11 ± 4,53 | 1,60 | 92,32 – 99,89 | 90,22 | 104,92 | 4,71 |
| R | 12 | 97,41 ± 6,68 | 2,36 | 91,82 – 103,00 | 85,12 | 106,27 | 6,86 |
| GL | 12 | 95,65 ± 3,83 | 1,35 | 92,44 – 98,85 | 91,18 | 101,54 | 4,00 |

ANOVA: $F = 0,25, p = 0,7798$



Grafikon 17. Srednja vrednost vijabilnosti ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 5% rastvora različitih RS.

6.2.3.2. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od dužine dejstva 10% rastvora različitih RS nakon 24 h oporavka

U tabelama 65-67 dati su deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a nakon dejstva 10% rastvora ispitivanih materijala i jednodnevnog oporavka kulture ćelija. ANOVA i Post Hoc analiza su utvrdile statističku zavisnost intenziteta redukcije vijabilnosti ćelija u odnosu na tip materijala kod trominutnog ($p < 0,01$) i šestominutnog dejstva ($p < 0,001$) i naknadne inkubacije ćelija. Nakon trominutnog i šestominutnog dejstva rastvora ćelijski oporavak je najniži kod *Retrargin* materijala (grafikon 18).

Tabela 65. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od trominutnog delovanja 10% rastvora različitih RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|----------------------------|------|----------------|-------|--------|------|
| V | 12 | 96,21 ± 2,72 ^{c*} | 0,96 | 93,94 – 98,48 | 91,88 | 101,25 | 2,82 |
| R | 12 | 97,06 ± 5,08 ^{c*} | 1,80 | 92,81 – 101,30 | 90,31 | 103,12 | 5,23 |
| GL | 12 | 104,69 ± 6,06 | 2,14 | 99,62 – 109,75 | 95,86 | 111,66 | 5,79 |

ANOVA: $F = 7,48, p = 0,0035 < 0,01$

c – vs GL; * – $p < 0,05$

Tabela 66. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od šestominutnog delovanja 10% rastvora različitih RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|---------------|-------|----------------|-------|--------|-------|
| V | 12 | 92,67 ± 15,67 | 5,54 | 79,56 – 105,77 | 70,20 | 110,53 | 16,91 |
| R | 12 | 66,85 ± 42,10 | 14,88 | 31,66 – 102,04 | 27,23 | 114,22 | 62,97 |
| GL | 12 | 91,33 ± 9,29 | 3,28 | 83,57 – 99,10 | 79,61 | 105,19 | 10,17 |

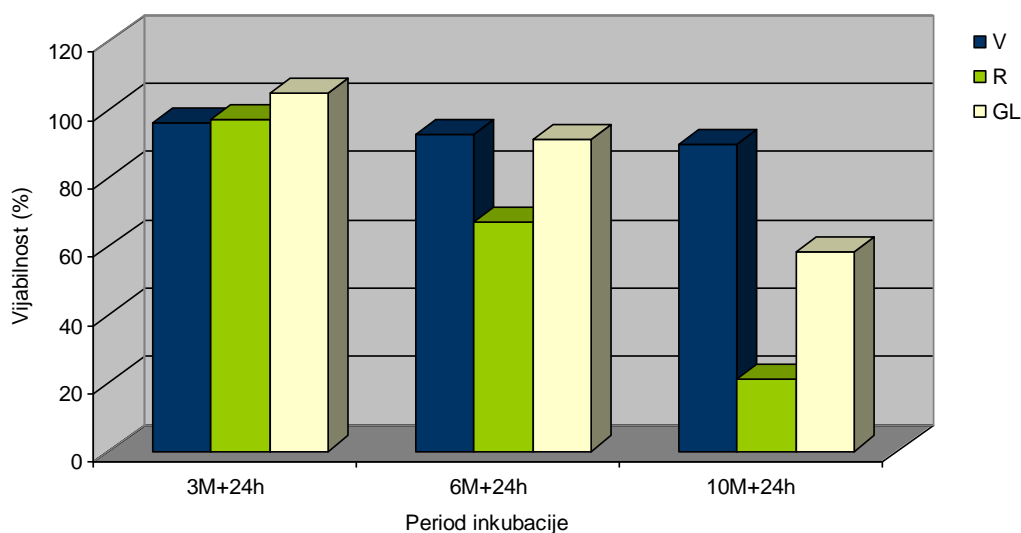
ANOVA: F = 2,41, p = 0,1142

Tabela 67. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od desetominutnog delovanja 10% rastvora različitih RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|-----------------------------|-------|---------------|-------|-------|-------|
| V | 12 | 89,62 ± 5,87 ^{b**} | 2,07 | 84,72 – 94,53 | 77,72 | 95,95 | 6,55 |
| R | 12 | 21,18 ± 12,31 | 4,35 | 10,89 – 31,47 | 8,17 | 36,09 | 58,10 |
| GL | 12 | 58,32 ± 29,09 ^{b*} | 10,29 | 33,99 – 82,64 | 21,33 | 88,27 | 49,89 |

ANOVA: F = 27,29, p = 0,0000<0,001

b – vs R; * – p<0,05, ** – p<0,01



Grafikon 18. Srednja vrednost vijabilnosti ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 10% rastvora različitih RS.

6.2.3.3. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od dužine dejstva 25% rastvora različitih RS nakon 24 h oporavka

U tabelama 68-70 i na grafikonu 19 dati su deskriptivni parametri intenziteta redukcije vijabilnosti ćelija za koncentraciju rastvora ispitivanih materijala od 25% i zadate periode dejstva na ćelijsku kulturu. ANOVA analiza je utvrdila maksimalnu statističku zavisnost intenziteta redukcije MTT-a u zavisnosti od tipa materijala za period dejstva od deset minuta ($p < 0,001$), a nižeg nivoa statističke značajnosti ($p < 0,01$) za period dejstva od tri minuta i naknadne inkubacije ćelijske kulture. Posle šestominutnog perioda dejstva nije utvrđena statistički značajna zavisnost intenziteta redukcije vijabilnosti ćelija u odnosu na tip materijala. Rezultati Post Hoc analize i utvrđene statističke značajnosti razlika u ćelijskoj proliferaciji prikazani su u navedenim tabelama.

Tabela 68. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od trominutnog delovanja 25% rastvora različitih RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|----------------------------|------|----------------|-------|--------|------|
| V | 12 | 96,21 ± 2,72 ^{c*} | 0,96 | 93,94 – 98,48 | 91,88 | 101,25 | 2,82 |
| R | 12 | 97,06 ± 5,08 ^{c*} | 1,80 | 92,81 – 101,30 | 90,31 | 103,12 | 5,23 |
| GL | 12 | 104,69 ± 6,06 | 2,14 | 99,62 – 109,75 | 95,86 | 111,66 | 5,79 |

ANOVA: F = 7,48, p = 0,0035 < 0,01

c – vs GL; * – p < 0,05

Tabela 69. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od šestominutnog delovanja 25% rastvora različitih RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|---------------|-------|----------------|-------|--------|-------|
| V | 12 | 92,67 ± 15,67 | 5,54 | 79,56 – 105,77 | 70,20 | 110,53 | 16,91 |
| R | 12 | 66,85 ± 42,10 | 14,88 | 31,66 – 102,04 | 27,23 | 114,22 | 62,97 |
| GL | 12 | 91,33 ± 9,29 | 3,28 | 83,57 – 99,10 | 79,61 | 105,19 | 10,17 |

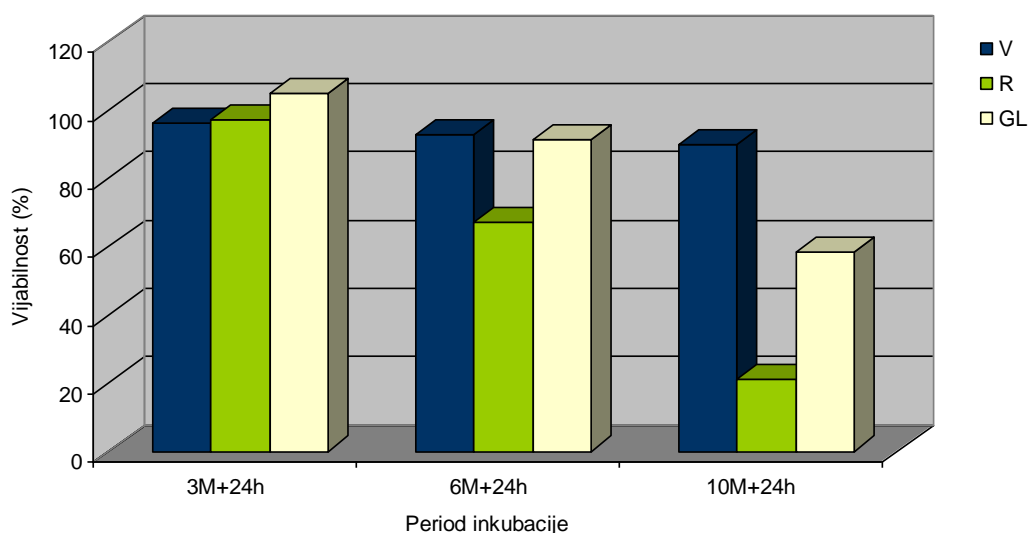
ANOVA: F = 2,41, p = 0,1142

Tabela 70. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od desetominutnog delovanja 25% rastvora različitih RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|------------------------------|-------|---------------|-------|-------|-------|
| V | 12 | 89,62 ± 5,87 ^{b***} | 2,07 | 84,72 – 94,53 | 77,72 | 95,95 | 6,55 |
| R | 12 | 21,18 ± 12,31 ^{c*} | 4,35 | 10,89 – 31,47 | 8,17 | 36,09 | 58,10 |
| GL | 12 | 58,32 ± 29,09 | 10,29 | 33,99 – 82,64 | 21,33 | 88,27 | 49,89 |

ANOVA: F = 27,29, p = 0,0000 < 0,001

b – vs R, c – vs GL; * – p<0,05, *** – p<0,001



Grafikon 19. Srednja vrednost vijabilnosti ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 25% rastvora različitih RS.

6.2.3.4. Vijabilnost ćelija u zavisnosti od dužine dejstva 50% rastvora različitih RS nakon 24 h oporavka

Deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a za 50% koncentraciju ispitivanih materijala i zadate periode dejstva nakon jednodnevnog oporavka ćelijske kulture dati su u tabelama 71-73 i na grafikonu 20. ANOVA analiza je utvrdila maksimalnu statističku zavisnost intenziteta redukcije ćelijske vijabilnosti u odnosu na tip materijala za sve periode dejstva (p<0,001). Post Hoc analiza potvrdila je višestruko višu i statistički značajno veću vrednost oporavka ćelija nakon dejstva materijala *Visine* u odnosu na materijale *Retrargin* i *Gingival Liquid* (p<0,001).

Tabela 71. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od trominutnog delovanja
50% rastvora različitih RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|--------------------------------|------|---------------|-------|-------|-------|
| V | 12 | 64,19 ± 10,95 ^{bc***} | 3,87 | 55,04 – 73,35 | 41,32 | 75,50 | 17,06 |
| R | 12 | 7,68 ± 0,70 | 0,25 | 7,09 – 8,26 | 6,67 | 8,61 | 9,06 |
| GL | 12 | 8,10 ± 0,81 | 0,29 | 7,43 – 8,77 | 6,92 | 9,36 | 9,96 |

ANOVA: F = 209,61, p = 0,0000 < 0,001

b – vs R, c – vs GL; *** – p<0,001

Tabela 72. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od šestominutnog delovanja
50% rastvora različitih RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|--------------------------------|-------|---------------|-------|-------|-------|
| V | 12 | 48,75 ± 29,57 ^{bc***} | 10,45 | 24,03 – 73,47 | 13,16 | 78,66 | 60,65 |
| R | 12 | 7,26 ± 0,73 | 0,26 | 6,65 – 7,87 | 6,37 | 8,28 | 10,04 |
| GL | 12 | 7,89 ± 0,30 | 0,11 | 7,64 – 8,14 | 7,39 | 8,22 | 3,82 |

ANOVA: F = 15,51, p = 0,0000 < 0,001

b – vs R, c – vs GL; * – p<0,05

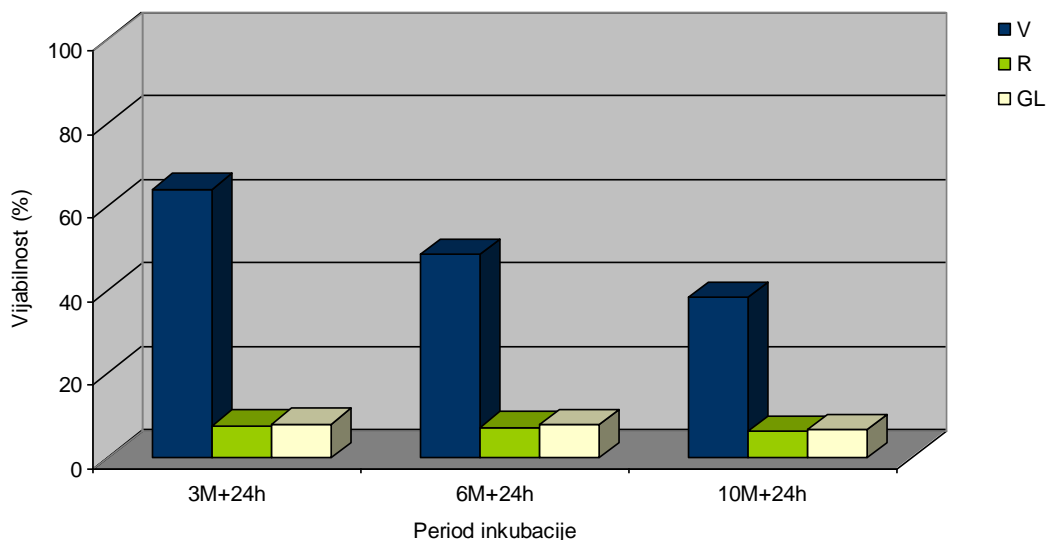
Tabela 73. Vijabilnost ćelija nakon jednodnevnog oporavka od desetominutnog delovanja
50% rastvora različitih RS u odnosu na kontrolu

| Materijal | N | X ± SD | SE | 95% CI | Min | Max | Cv |
|-----------|----|--------------------------------|------|---------------|-------|-------|-------|
| V | 12 | 38,37 ± 11,79 ^{bc***} | 4,17 | 28,51 – 48,23 | 22,43 | 52,71 | 30,73 |
| R | 12 | 6,26 ± 0,45 | 0,16 | 5,89 – 6,64 | 5,73 | 6,89 | 7,16 |
| GL | 12 | 6,67 ± 1,11 | 0,39 | 5,74 – 7,59 | 5,63 | 8,92 | 16,61 |

ANOVA: F = 57,98, p = 0,0000 < 0,001

b – vs R, c – vs GL; *** – p<0,001

Analizom rezultata pri višim koncentracijama (25 i 50%) rastvora materijala uočena je izrazito veća ćeliska vijabilnost nakon prisustva rastvora materijala *Visine* u odnosu na *Retrargin* i *Gingival Liquid*, bez obzira na period dejstva na ćelijsku kulturu.



Grafikon 20. Srednja vrednost vijabilnosti ćelija nakon jednodnevnog oporavka od delovanja 50% rastvora različitih RS.

6.3. POREĐENJE REZULTATA ISPITIVANJA CITOTOKSIČNOSTI SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE NA *IN VITRO* EKSPERIMENTALNIM MODELIMA

6.3.1. Rezultati ispitivanja redukcije MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora sredstva za retrakciju gingive

6.3.1.1. Zavisnost redukcije MTT-a od koncentracije rastvora RS nakon trominutnog dejstva na ćelije bez i nakon njihove naknadne inkubacije

Deskriptivni parametri intenziteta redukcije MTT-a u zavisnosti od koncentracije rastvora RS, za trominutni period dejstva bez i posle naknadne inkubacije ćelija i rezultati njihovog poređenja, za ispitivane materijale prikazani su u tabelama 74-76.

U slučaju materijala *Visine* vijabilnost ćelija je veća nakon trominutnog bez naknadne inkubacije u odnosu na jednodnevni oporavak ćelija pri svim koncentracijama rastvora, s tim da je statistička značajnost utvrđena samo pri koncentraciji od 50% ($p < 0,01$).

Nakon trominutnog dejstva 25% i 50% rastvora materijala *Retrargin* i *Gingival Liquid* vijabilnost ćelija je viša bez u poređenju sa naknadnom inkubacijom ćelijske kulture ($p < 0,001$). Nasuprot tome, pri nižim koncentracijama vijabilnost je statistički značajno viša pri trominutnom dejstvu sa naknadnom jednodnevnom inkubacijom ćelija ($p < 0,001$).

Tabela 74. Vijabilnost ćelija u odnosu na kontrolu nakon trominutnog dejstva rastvora *Visine*

| Koncentracija | | bez naknadne inkubacije ćelija | sa naknadnom inkubacijom ćelija |
|---------------|----|--------------------------------|---------------------------------|
| | N | X ± SD | X ± SD |
| 5% | 12 | 105,84 ± 8,93 | 98,69 ± 4,32 |
| 10% | 12 | 99,65 ± 11,44 | 96,21 ± 2,72 |
| 25% | 12 | 96,02 ± 10,20 | 90,34 ± 4,59 |
| 50% | 12 | 80,74 ± 6,74 ** | 64,19 ± 10,95 |

** – p<0,01

Tabela 75. Vijabilnost ćelija u odnosu na kontrolu nakon trominutnog dejstva rastvora *Retrargin*

| Koncentracija | | bez naknadne inkubacije ćelija | sa naknadnom inkubacijom ćelija |
|---------------|----|--------------------------------|---------------------------------|
| | N | X ± SD | X ± SD |
| 5% | 12 | 80,76 ± 6,69 | 101,67 ± 5,10 *** |
| 10% | 12 | 82,44 ± 4,71 | 97,06 ± 5,08 *** |
| 25% | 12 | 12,79 ± 0,93 *** | 7,67 ± 0,80 |
| 50% | 12 | 11,03 ± 0,60 *** | 7,68 ± 0,70 |

*** – p<0,001

Tabela 76. Vijabilnost ćelija u odnosu na kontrolu nakon trominutnog dejstva rastvora
Gingival Liquid

| Koncentracija | | bez naknadne inkubacije ćelija | sa naknadnom inkubacijom ćelija |
|---------------|----|--------------------------------|---------------------------------|
| | N | X ± SD | X ± SD |
| 5% | 12 | 83,74 ± 12,70 | 107,39 ± 5,89 *** |
| 10% | 12 | 83,11 ± 9,27 | 104,69 ± 6,06 *** |
| 25% | 12 | 20,87 ± 8,76 ** | 9,20 ± 0,90 |
| 50% | 12 | 11,75 ± 0,54 *** | 8,10 ± 0,81 |

** – p<0,01, *** – p<0,001

6.3.1.2. Zavisnost redukcije MTT-a od koncentracije rastvora RS

nakon šestominutnog dejstva na ćelije bez i nakon njihove naknadne inkubacije

Deskriptivni parametri intenziteta redukcije vijabilnosti ćelija u zavisnosti od koncentracije posle šestominutnog dejstva rastvora ispitivanih materijala bez i sa njihovom naknadnom inkubacijom i rezultati poređenja prikazani su u tabelama 77-79 .

Kod 10%, 25% i 50% rastvora *Visine* i *Retrargin* vijabilnost je veća pri šestominutnim dejstvu bez naknadne inkubacije ćelija, dok je pri 5% koncentraciji ona veća nakon jedno-dnevnog ćelijskog oporavka. Za materijal *Retrargin* primećene je statistička značajnost ($p < 0,05$).

Pri svim koncentracijama rastvora *Gingival Liquid* vijabilnost je viša bez u odnosu na naknadnu ćelijsku inkubaciju, sa statistički značajnom razlikom: $p < 0,05$ za 10% koncentraciju i $p < 0,01$ za koncentracije 25 i 50%.

Tabela 77. Vijabilnost ćelija u odnosu na kontrolu nakon šestominutnog dejstva rastvora *Visine*

| Koncentracija | | bez naknadne inkubacije ćelija | sa naknadnom inkubacijom ćelija |
|---------------|----|--------------------------------|---------------------------------|
| | N | X ± SD | X ± SD |
| 5% | 12 | 95,40 ± 12,20 | 104,53 ± 3,11 |
| 10% | 12 | 96,27 ± 12,12 | 92,67 ± 15,67 |
| 25% | 12 | 82,87 ± 7,06 | 61,86 ± 42,89 |
| 50% | 12 | 69,41 ± 8,85 | 48,75 ± 29,57 |

Tabela 78. Vijabilnost ćelija u odnosu na kontrolu nakon šestominutnog dejstva rastvora *Retrargin*

| Koncentracija | | bez naknadne inkubacije ćelija | sa naknadnom inkubacijom ćelija |
|---------------|----|--------------------------------|---------------------------------|
| | N | X ± SD | X ± SD |
| 5% | 12 | 97,89 ± 8,16 | 105,52 ± 3,80 * |
| 10% | 12 | 81,81 ± 8,79 | 66,85 ± 42,10 |
| 25% | 12 | 11,40 ± 3,48 | 7,65 ± 0,92 |
| 50% | 12 | 10,73 ± 3,63 | 7,26 ± 0,73 |

* – $p < 0,05$

Tabela 79. Vijabilnost ćelija u odnosu na kontrolu nakon šestominutnog dejstva rastvora *Gingival Liquid*

| Koncentracija | N | bez naknadne inkubacije ćelija | | sa naknadnom inkubacijom ćelija | |
|---------------|----|--------------------------------|---------|---------------------------------|------|
| | | X ± SD | | X ± SD | |
| 5% | 12 | 104,41 ± | 7,58 | 102,87 ± | 7,68 |
| 10% | 12 | 103,69 ± | 8,35 * | 91,33 ± | 9,29 |
| 25% | 12 | 14,16 ± | 4,00 ** | 7,69 ± | 0,41 |
| 50% | 12 | 12,08 ± | 3,00 ** | 7,89 ± | 0,30 |

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$

6.3.1.3. Zavisnost redukcije MTT-a od koncentracije rastvora RS

nakon desetominutnog dejstva na ćelije bez i nakon njihove naknadne inkubacije

Deskriptivni parametri intenziteta redukcije ćelijske vijabilnosti u zavisnosti od koncentracije rastvora RS, za desetominutni period dejstva bez i sa jednodnevnom naknadnom inkubacijom ćelija i rezultati njihovog poređenja prikazani su u tabelama 80-82.

Kod materijala *Visine* vijabilnost je veća nakon desetominutnog dejstva na ćelije bez njihovog jednodnevnog oporavka pri koncentracijama 25% i 50%, dok je za koncentracije 5% i 10% vijabilnost veća nakon dodatnog inkubacionog perioda, bez statistički značajnih razlika.

U slučaju 10%, 25% i 50% rastvora *Retrargin* vijabilnost ćelija bez perioda oporavka je statistički značajno veća ($p < 0,001$). Nasuprot tome, pri koncentraciji od 5% vijabilnost je veća nakon dodatne inkubacije ćelija, sa statističkom značajnošću od $p < 0,01$.

Za sve koncentracije rastvora *Gingival Liquid* vijabilnost ćelija je veća bez njihovog dodatnog oporavka, sa statistički značajnom razlikom za 10% koncentraciju ($p < 0,05$), kao i koncentracije od 25 i 50% ($p < 0,01$).

Kod materijala *Gingival Liquid* kod svih ispitivanih koncentracija rastvora vijabilnost je veća bez dodatne inkubacije ćelija, a pri koncentracijama od 25 i 50% postoji statistička značajnost ($p < 0,01$).

Tabela 80. Vijabilnost ćelija u odnosu na kontrolu nakon desetominutnog dejstva rastvora *Visine*

| Koncentracija | | bez naknadne inkubacije ćelija | sa naknadnom inkubacijom ćelija |
|---------------|----|--------------------------------|---------------------------------|
| | N | X ± SD | X ± SD |
| 5% | 12 | 95,88 ± 6,83 | 96,11 ± 4,53 |
| 10% | 12 | 86,60 ± 2,87 | 89,62 ± 5,87 |
| 25% | 12 | 79,50 ± 5,52 | 75,42 ± 9,02 |
| 50% | 12 | 44,62 ± 11,01 | 38,37 ± 11,79 |

Tabela 81. Vijabilnost ćelija u odnosu na kontrolu nakon desetominutnog dejstva rastvora *Retrargin*

| Koncentracija | | bez naknadne inkubacije ćelija | sa naknadnom inkubacijom ćelija |
|---------------|----|--------------------------------|---------------------------------|
| | N | X ± SD | X ± SD |
| 5% | 12 | 88,62 ± 3,62 | 97,41 ± 6,68 ** |
| 10% | 12 | 70,96 ± 26,23 *** | 21,18 ± 12,31 |
| 25% | 12 | 11,77 ± 2,72 *** | 6,57 ± 0,62 |
| 50% | 12 | 11,41 ± 1,96 *** | 6,26 ± 0,45 |

*** – p<0,001, ** – p<0,01

Tabela 82. Vijabilnost ćelija u odnosu na kontrolu nakon desetominutnog dejstva rastvora *Gingival Liquid*

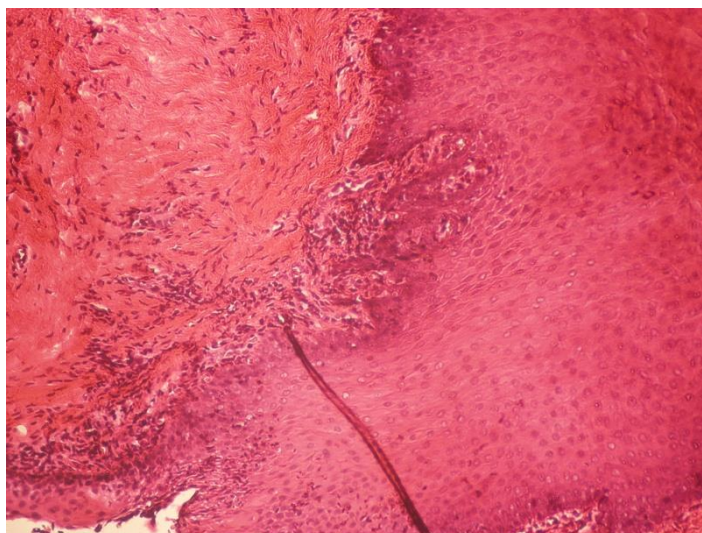
| Koncentracija | | bez naknadne inkubacije ćelija | sa naknadnom inkubacijom ćelija |
|---------------|----|--------------------------------|---------------------------------|
| | N | X ± SD | X ± SD |
| 5% | 12 | 96,40 ± 11,82 | 95,65 ± 3,83 |
| 10% | 12 | 85,49 ± 23,18 | 58,32 ± 29,09 |
| 25% | 12 | 12,86 ± 4,43 ** | 6,39 ± 0,39 |
| 50% | 12 | 12,14 ± 3,69 ** | 6,67 ± 1,11 |

** – p<0,01

6.4. REZULTATI ISPITIVANJA DEJSTVA SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE NA *IN VIVO* EKSPERIMENTALNIM MODELIMA

In vivo ispitivanja potencijalne toksičnosti komercijalno dostupnih RS i tetrahidrozolina obavljena su na gingivalnom tkivu kunića. Retrakcioni konac impregniran RS ili tetrahidrozolinom aplikovan je u gingivalni sulkus levih sekutića kunića, dok su desni služili kao kontrolna grupa (negativna kontrola i lažni tretman).

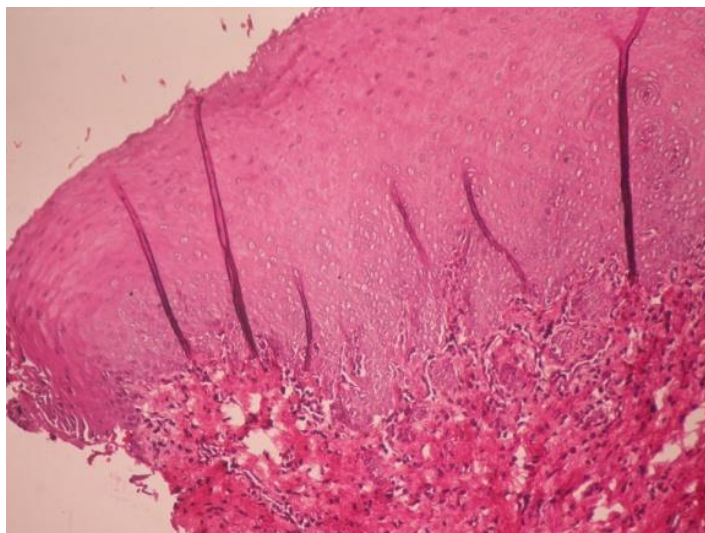
Uzorci tkiva klinički zdrave gingive na kojima nisu rađeni nikakvi zahvati (negativna kontrola) nisu pokazali znake inflamacije ni u jednom od predviđenih opservacionih perioda (slika 19).



Slika 19. Na preparatu je uočeno vezivno tkivo i pločasto slojevit epitel gingive.

Uzorci tkiva negativne kontrole imali su uobičajenu količinu kolagenih vlakana. HE×200.

Inflamacija je gotovo potpuno izostala i kod uzoraka tkiva nakon lažnog tretmana za sve opservacione periode, što je isključilo efekat mehaničkog oštećenja tkiva prilikom aplikacije retrakcionog konca (slika 20).

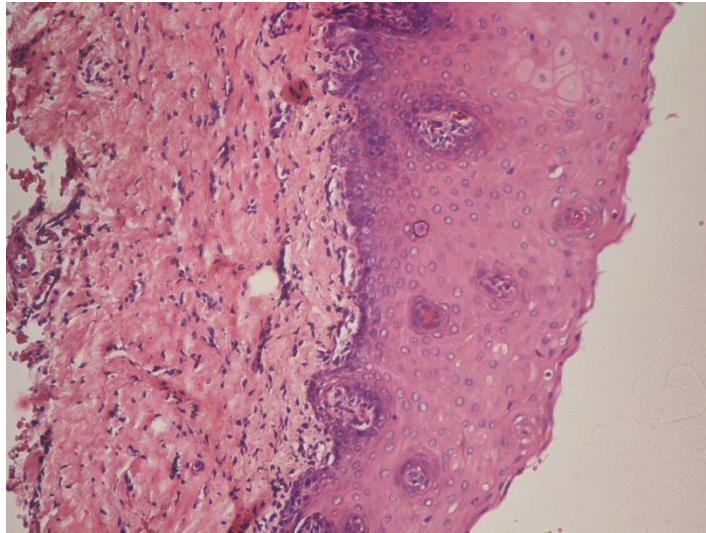


Slika 20. Preparati gingive sa lažnim tretmanom su nakon jednodnevne biopsije pokazali lake fokalne zapaljenske infiltrate, koji su nakon jedne nedelje zamenjeni zdravim vezivnim tkivom. HE $\times 200$.

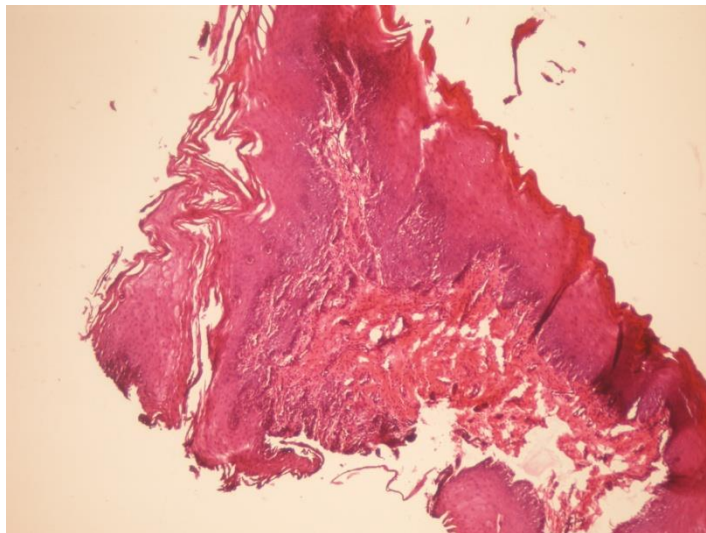
6.4.1. Patohistološki nalaz gingivalnog tkiva nakon opservacionog perioda od jednog časa

Jedan sat nakon uklanjanja retrakcionog konca, gingivalno tkivo levog sekutića je na makroskopskom nivou pokazalo neznatne inflamatorne promene.

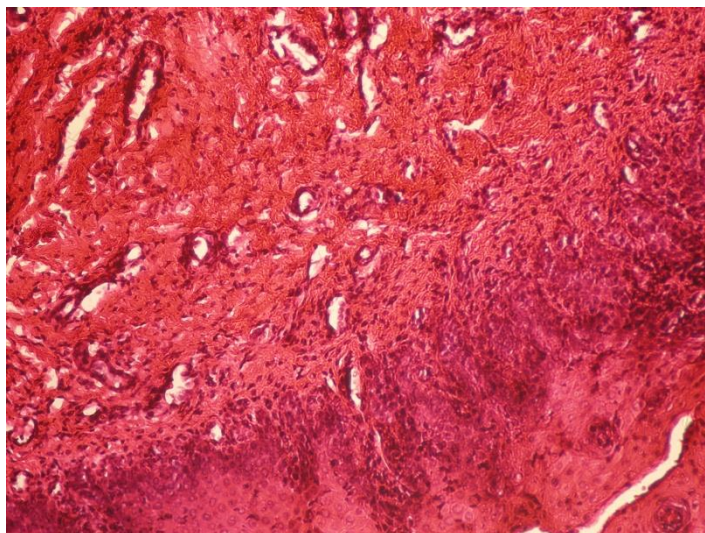
Sa druge strane, na patohistološkim preparatima tretiranog tkiva prikazan je različiti stepen zapaljenskih promena, koje su izostale na kontrolnom uzorku. Uočena je vazodilatacija krvnih sudova, pojava polimorfonuklearnog infiltrata u centru zapaljenja, kao i smanjena količina kolagenih vlakana. Nastale promene imale su karakteristike reaktivnog akutnog zapaljenja. Intenzitet zapaljenske reakcije zavisio je od vrste upotrebljenog RS, te je nakon aplikacije aluminijum hlorida i adrenalina reakcija nešto izraženija nego nakon korišćenja tetrahidrozolina (slika 21-23).



Slika 21. Patohistološki nalaz nakon jednočasovne biopsije tkiva koje je bilo u kontaktu sa *Retrargin*. Prisutna je vazodilatacija krvnih sudova i fokusi zapaljenskog infiltrata sa smanjenom količinom kolagenih vlakana. HE $\times 100$.



Slika 22. Tkivo gingive tretirano preparatom na bazi adrenalina pokazuje zapaljenske infiltrate i smanjene količine kolagenih vlakana. HE $\times 100$.

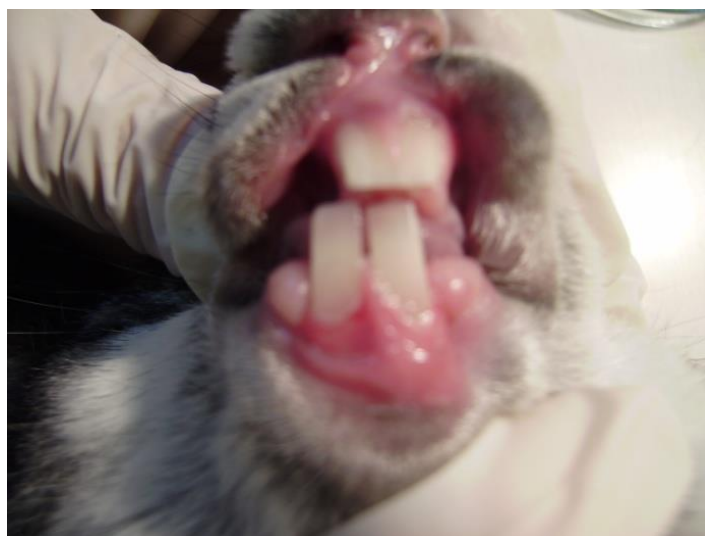


Slika 23. Patohistološki nalaz nakon jednočasovne biopsije tkiva tretiranog *Visine*. Prisutna je izražena vazodilatacija kapilara i bogat zapaljenski eksudat HE $\times 100$.

6.4.2. Patohistološki nalaz gingivalnog tkiva nakon opservacionog perioda od jednog dana

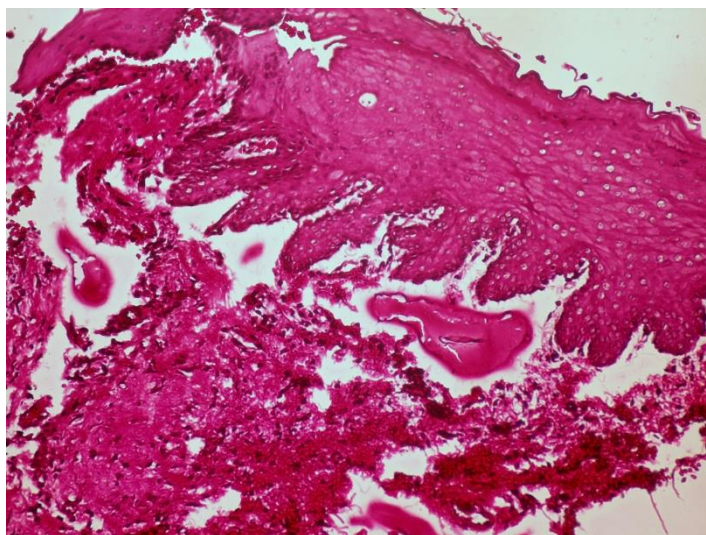
Nakon jednodnevnog opservacionog perioda primećene su akutne zapaljenske promene na gingivalnom tkivu sekutića kunića na makroskopskom i mikroskopskom nivou. Gingiva oko levih sekutića kunića bila je blago otečena i crvena nakon aplikacije *Surgident* i *Retrargin*. Gingiva nije pokazivala sklonost ka krvarenju (slika 24).

Jedan dan nakon mehaničke aplikacije *Visine* gingiva oko maksilarnog i mandibularnog levog sekutića kunića ostala je klinički nepromenjena.

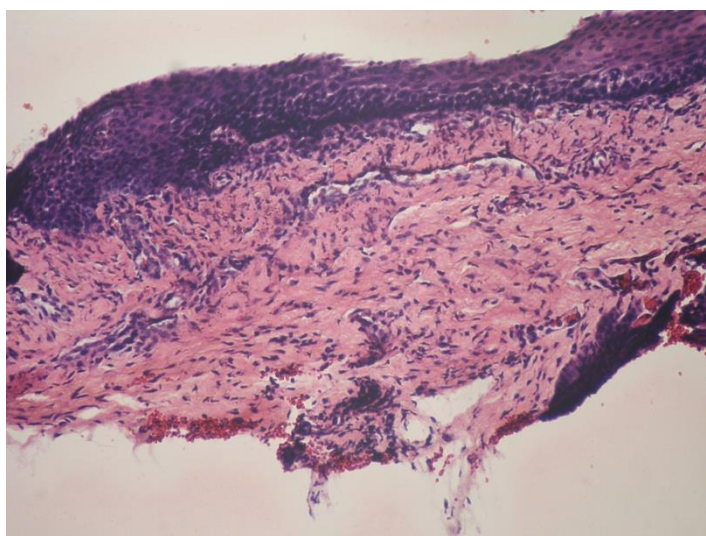


Slika 24. Otečena gingiva levih sekutića kunića jedan dan nakon aplikacije *Surgident*

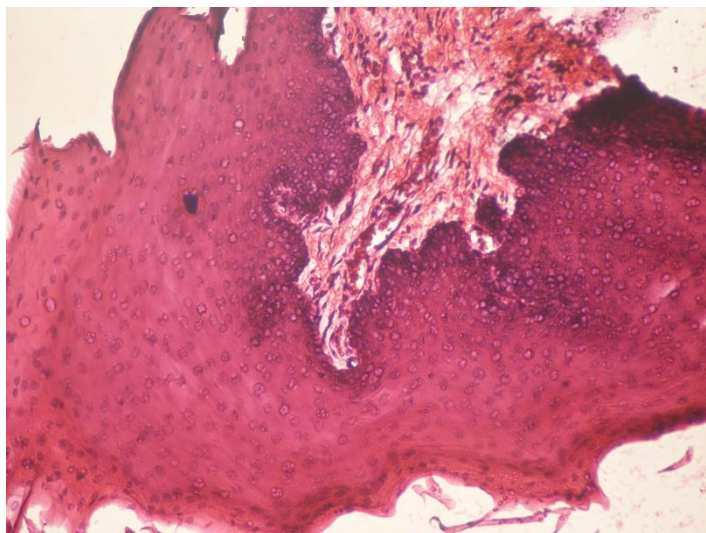
Biopsirano tretirano tkivo pokazalo je znake intenzivne inflamatorne reakcije (prisustvo obimne akumulacije polimorfonukleara, limfocita, plazmocita, makrofaga, džinovskih ćelija tipa i kapilara sa izraženom kongestijom) jedan dan nakon aplikacije retrakcionih konaca impregniranih aluminijum hloridom i adrenalinom. Jedan dan nakon uklanjanja retrakcionog konca, inflamatorna infiltracija bila je značajno izraženija u slučaju uzoraka tkiva tretiranih komercijlnim RS u odnosu na *Visine* (slika 25-27).



Slika 25. Nakon jednodnevne biopsije tkiva posle upotrebe *Retrargin* izražen je edem tkiva, sa fokalnim zapaljenskim infiltratom i kongestijom krvnih sudova. HE $\times 100$.



Slika 26. Jedan dan nakon aplikacije Surgident gingivalno tkivo je pokazalo jaku akutnu zapaljensku reakciju. HE $\times 100$.



Slika 27. Preparat jednodnevne biopsije tkiva tretiranog *Visine* ukazao je na blagu zapaljensku reakciju, ali uočljivo manju u odnosu na tkivo nakon uklanjanja ostalih RS. HE $\times 100$.

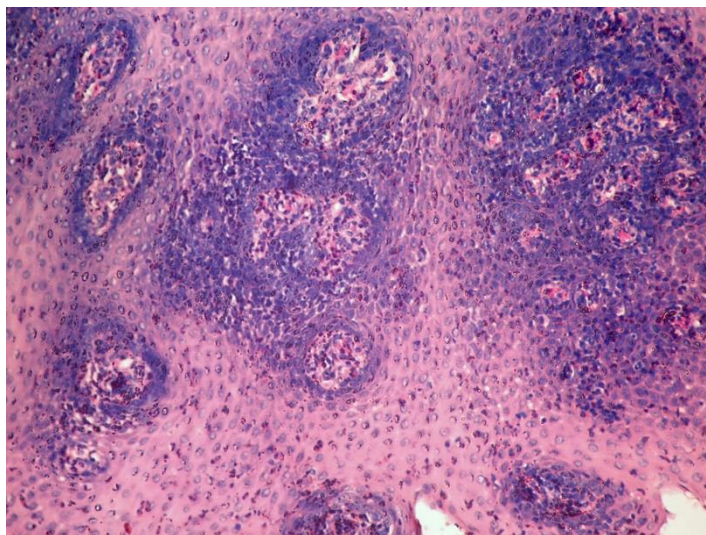
Na slici 28 prikazana je količina kolagenih vlakana u strukturi gingivalnog tkiva kunića pod polarizacionim mikroskopom. Manja količina kolagena znak je akutnog inflamatornog odgovora.



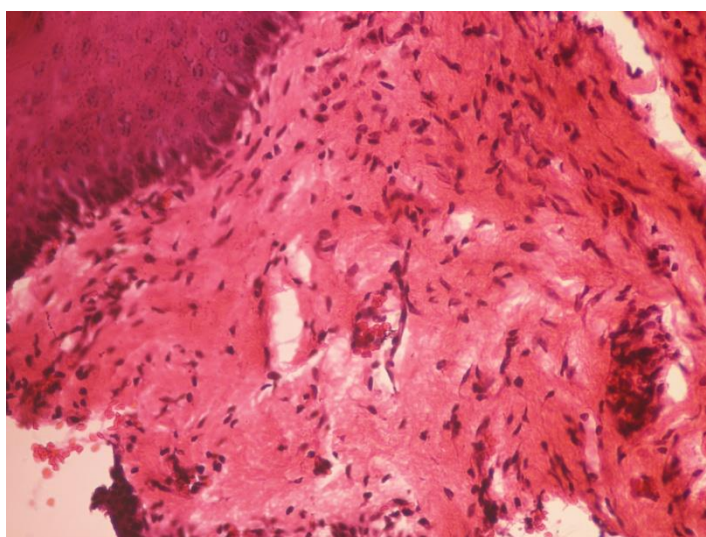
Slika 28. Malo kolagena u tkivnoj strukturi nakon dejstva preparata Gingival Liquid i nakon jednodnevnog opservacionog perioda. Uveličanje $\times 100$.

6.4.3. Patohistološki nalaz gingivalnog tkiva nakon opservacionog perioda od sedam dana

Nakon sedmodnevnog opservacionog perioda uzorci tkiva tretiranih RS na bazi aluminijum hlorida i adrenalina pokazivali su znake intenzivne zapaljenske reakcije, što govori u prilog njihovom prolongiranom toksičnom dejstvu na gingivalni sulkus kunića (slika 29 i 30).

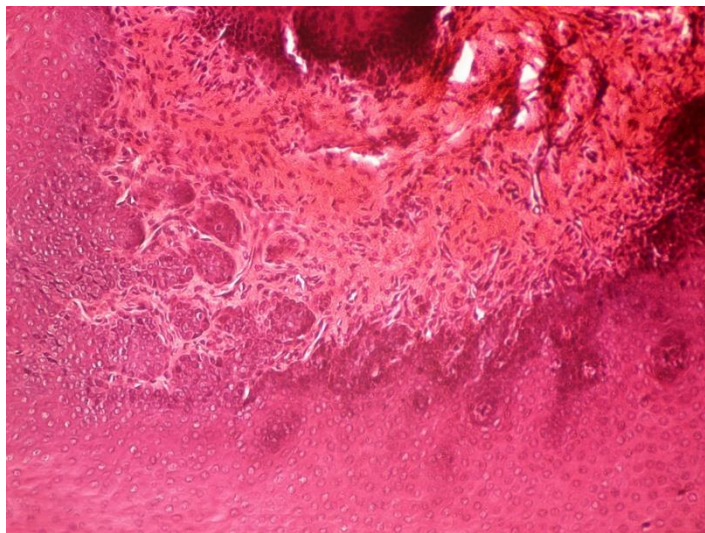


Slika 29. Sedam dana nakon tretmana sredstvima na bazi aluminijum hlorida uzorci tkiva pokazali su znake obimne zapaljenske reakcije (obiman ćelijski infiltrat polimorfonukleara i prisustvo džinovskih ćelija) HE $\times 100$.



Slika 30. Patohistološki nalaz nakon sedmodnevnog opservacionog perioda za preparat Surgident ukazuje na zapaljensku reakciju i smanjenje količine kolagenih vlakana u odnosu na kontrolu. HE $\times 100$.

Najmanji inflamatorni efekat, i u ovom slučaju, pokazao je tetrahidrozolin (slika 31). Patohistološkom analizom uočena je blaga inflamatorna reakcija tretiranog tkiva (formiranje fibrozne kapsule sa prisustvom makrofaga, polimorfonukleara, limfocita i plazmocita). Reakcija na dilataciju gingivalnog tkiva kunića dobija hronični tok što vodi ka njegovom ozdravljenju. Komparacija sa ostalim ispitivanim RS ukazuje na manju toksičnost tetrahidrozolina u odnosu na preparate aluminijum hlorida i adrenalina.

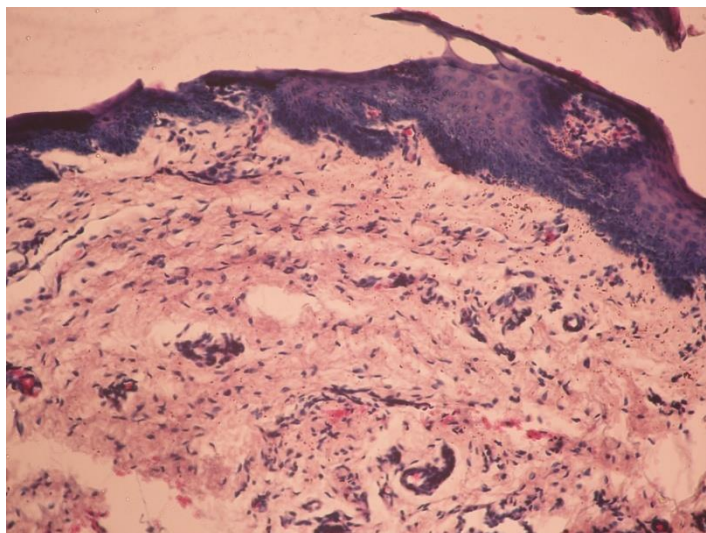


Slika 31. Nakon sedmodnevnog opservacionog perioda gingivalno tkivo tretirano *Visine* pokazalo je znake fibroze. HE $\times 100$.

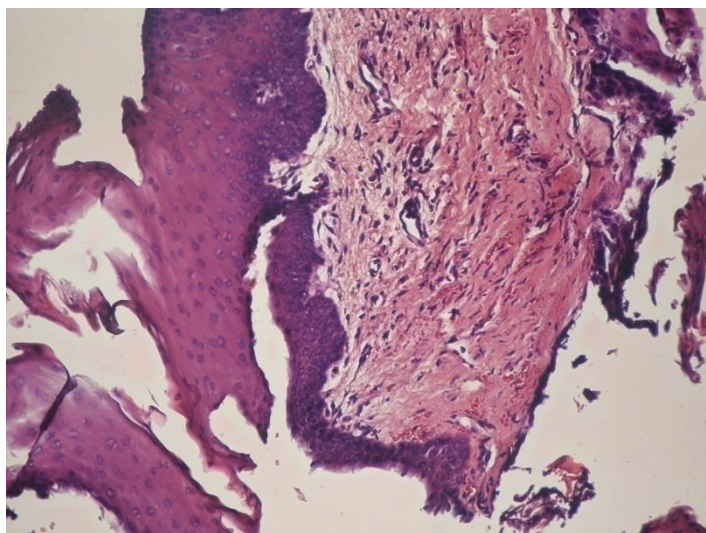
6.4.4. Patohistološki nalaz gingivalnog tkiva nakon opservacionog perioda od trideset dana

Sa porastom dužine opservacionog perioda došlo je fibroze tkiva čime je inflamacija poprimila hronični karakter. Novonastalo fibrozno tkivo znak je reparacije defekta u tretiranom tkivu.

Patohistološkom analizom preparata gingivalnog tkiva tretiranog RS na bazi aluminijum hlorida i adrenalina, opisana je blaga zapaljenska reakcija (prisustvo fibrozne kapsule sa manjim brojem limfocita i plazmocita) (slika 32 i 33).

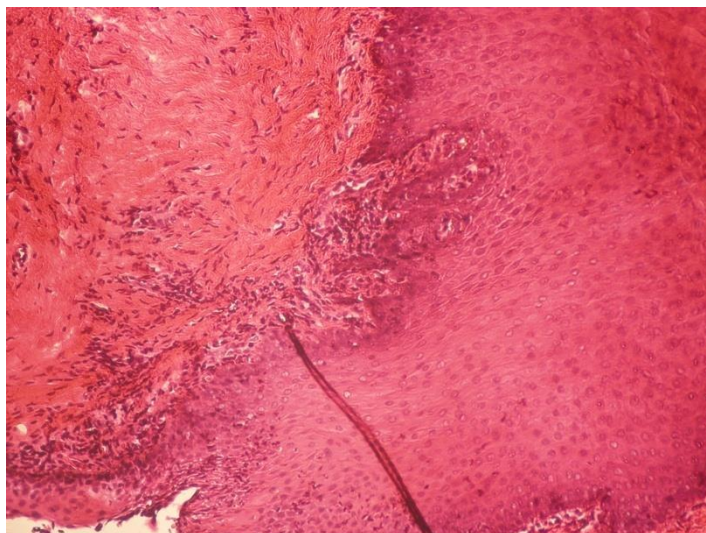


Slika 32. Patohistološki nalaz nakon jednomesečnog opservacionog perioda: preparati tkiva tretiranog *Retrarginom* pokazali su fibrozu tkiva i ređe fokalne zapaljenske infiltrate, HE $\times 100$.



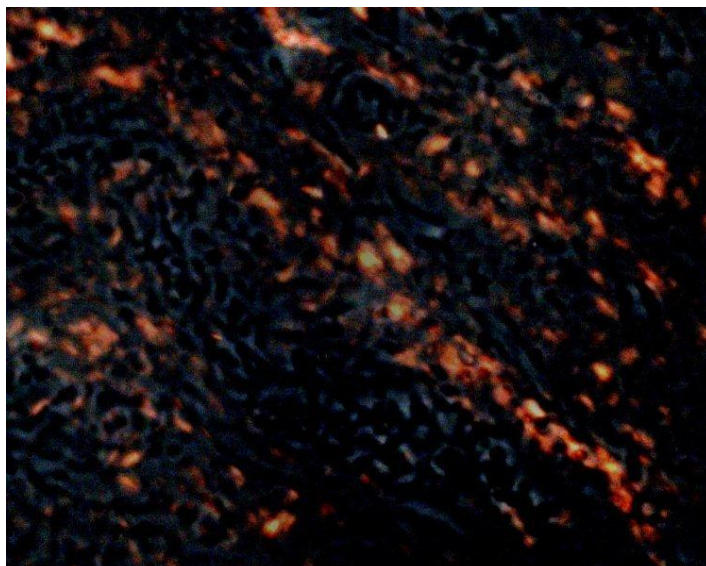
Slika 33. Neznatno smanjena količina kolagenih vlakana i retki zapaljenski infiltrati u gingivalnom tkivu mesec dana nakon aplikacije RS na bazi adrenalina. HE $\times 100$.

Posle jednomesečnog opservacionog perioda biopsirano gingivalno tkivo nakon tretmana tetrahidrozolinom nije pokazivalo znake inflamacije i nije se razlikovalo od opšte kontrole (slika 34).



Slika 34. Mesec dana nakon uklanjanja preparata na bazi tetrahidrozolina, došlo je do potpunog ozdravljenja gingivalnog tkiva. HE $\times 100$.

Analizom pod polarizacionim mikroskopom uočena je velika količina kolagenih vlakana, što je sigurni dokaz vraćanja inicijalne strukture vezivnom tkivu desni kunića (slika 35).



Slika 35. Veliki broj kolagenih vlakana ukazao je na reparaciju tkiva nakon uklanjanja *Visine* i opservacionog perioda od mesec dana. Uveličanje $\times 100$.

Kompletna reparacija veziva desni kunića dokaz je manje toksičnog dejstva tetrahidrozolina kao RS u dužem vremenskom periodu u odnosu na komercijalno dostupne preparate aluminijumovih soli i adrenalina.

7. DISKUSIJA

7.1. BIODOKOMPATIBILNOST SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE

Prilikom izrade stomatoprotetičkih radova neophodno je poštovati integritet struktura parodonta i osigurati maksimalno moguću preciznost na prelazu veštačke krune u biološko tkivo. Da bi područje granice preparacije, u slučaju kada je ona smeštena u nivou odnosno ispod ruba gingive, bilo dostupno otisnom materijalu, potrebno je reverzibilnim privremenim pomeranjem marginalne gingive u apikalnom smeru prikazati demarkacionu liniju i učiniti je dostupnom (Toches 2009, Tarighi 2014). RS se aplikuju u gingivalni sulkus brušenog zuba, dilatiraju ga i isušuju stvarajući optimalne uslove za uzimanje otiska za indirektno stomatološke restauracije. S obzirom da su RS u neposrednom kontaktu sa gingivalnim tkivom njihova biokompatibilnost je od primarnog značaja. Međutim, RS imaju jatrogeno dejstvo na tkiva gingive, posebno ukoliko je pacijent već oboleo od parodontalnog oboljenja ili ima sklonost ka njihovoj pojavi. Neželjeni efekat RS ogleda se kroz degeneraciju tkiva sa kojima su u kontaktu, kao i usporavanju zarastanja nastalih oštećenja. Idealno RS bi pored toga što ne utiče na regeneraciju oštećenog tkiva trebalo i da učestvuje u reorganizaciji oštećenih struktura (Liu 2004).

Najčešće korišćena RS su adstrigensi (Nowakowska 2006, Hansen 1999, Tarighi 2014). Dejstvo aluminijum hlorida bazira se na precipitaciji proteina i inhibiciji transkapilarnog kretanja proteina plazme, dok je permeabilnost ćelija za njegove molekule relativno niska (Donovan 1985). Dokazano je iritativno dejstvo aluminijum hlorida u umerenim i kaustično dejstvo u visokim koncentracijama (Donovan 1985). Adstrigensna sredstva dentaturacijom proteina isušuju gingivalni sulkus, ali istovremeno mogu i oštetiti površinske slojeve gingivalnog tkiva. Sem toga, adstrigensni efekat praćen je reaktivnom hiperemijom, pa neki autori prednost daju vazokonstriktornim sredstvima (Fazekas 2002). Nowakowska i sar. (2014) su potvrdili da komercijalno dostupni agensi izazivaju oštećenja citoskeleta i oksidativni stres primarnih humanih fibroblasta.

Albaker i sar. (2010) navode i moguće alergijsko dejstvo RS. Na tržištu su prisutni rastvori aluminijum hlorida različite koncentracije aktivne supstance. Dosadašnji literaturni podaci nisu dali dovoljno informacija o uticaju različitih koncentracija aluminijum hlorida na

eksperimentalnim *in vitro* i *in vivo* modelima, kao ni jasan predlog njima alternativnog vazokonstriktornog sredstva, koje može imati prednost zbog optimalne kontrole krvarenja uz odsustvo neželjenih lokalnih i sistemskih efekata.

Nakon aplikacije RS u gingivalni sulkus sasvim je izvesno da se potencijalno toksične materije oslobađaju iz materijala i deluju na okolno tkivo. U kliničkim uslovima oštećenje ćelija konsektivno vodi ka sekundarnom inflamatornom odgovoru, što je dokazano u *in vivo* studijama (Harrison 1961, Woychesin 1964, de Gennaro 1982, Reul 1980, Donaldson 2013).

Biokompatibilnost stomatoloških materijala definiše se kao njihov kvalitet da nakon primene u usnoj duplji obavljaju ciljanu funkciju i pri tome ne uzrokuju neželjene efekte. Ispitivanje biokompatibilnosti materijala u stomatologiji od neprocenjive je važnosti u zaštiti zdravlja pacijenta. Zadatak testova za ispitivanje biokompatibilnosti materijala jeste identifikovanje i merenje svakog sastojka koji bi mogao da dovede do eventualne povrede tkiva usne duplje ili oštećenja organizma uopšte, da bi se tako dokazani štetni sastojci odstranili, kao i se napravi odabir novih, modernijih koji bi odgovor tkiva učinili biološki prihvatljivijim. Savremeni aspekt istraživanja biokompatibilnosti materijala i medicinskih sredstava koja se koriste u stomatologiji podrazumeva tri nivoa istraživanja. Primarni stepen istraživanja odnosi se na laboratorijske uslove, kulture ćelija, tkiva i organa. Sekundarni nivo obuhvata testove na eksperimentalnim životinjama sa ciljem da se simuliraju uslovi u organizmu čoveka. Ipak, da bi se stomatološki materijal ili medicinsko sredstvo proglasili biokompatibilnim neophodni su pozitivni rezultati njihove kliničke upotrebe, što je završni, tercijarni nivo ispitivanja.

7.2. DEJSTVA SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE NA *IN VITRO* EKSPERIMENTALNIM MODELIMA

Najčešće korišćeni biološki sistemi za testiranje toksičnih efekata stomatoloških materijala jesu ćelije u kulturi. Testovi na ćelijskim kulturama od izuzetnog su značaja za ispitivanje biološkog ponašanja materijala i predstavljaju inicijalnu ili *screening* metodu u njihovom testiranju. Obzirom na ograničenost mogućnosti ispitivanja *in vitro* i neverodostojnost dobijenih rezultata, ispitivanje na ćelijskoj kulturi potrebno je upotpuniti testiranjem u *in vivo* uslovima.

U istraživanju eventualne toksičnosti sredstava za retrakciju gingive često se koristi MTT test. MTT test predstavlja kolorimetrijsku metodu za kvantifikaciju broja vijabilnih

ćelija. Njihovom upotrebom veći broj uzoraka ispituje se istovremeno, kvalitetno i brzo.

Sposobnost redukcije žute tetrazolijumove soli (MTT) poseduju jedino vijabilne ćelije. Eventualna toksičnost materijala smanjuje aktivnost mitohondrijalnih enzima, pa samim tim i redukciju MTT-a.

U našim istraživanju je ispitivano dejstvo različitih koncentracija sredstava za retrakciju gingive u trajanju od tri, šest i deset minuta na *MDCK* ćelijsku kulturu. Ovakva kratkotrajna ekspozicija ćelija delovanju RS je odabrana da bi se simulirala takođe kratkotrajna izloženost tkiva gingive pri kliničkoj aplikaciji RS. Različiti kratkotrajni periodi inkubacije sa RS su izabrani da bi se mogao sagledati vremenski efekat dejstva RS, odnosno da bi se ispitalo potrebno vreme za eventualni toksični učinak. Merenja intenziteta redukcije MTT-a vršena su u dva tipa eksperimenata. U jednom tipu eksperimenta merenje je vršeno neposredno nakon dejstava RS kako bi se odredila vijabilnost *MDCK* ćelija i na taj način eventualni njihov akutni citotoksični efekat. U drugom tipu eksperimenta je određivana vijabilnost ćelija nakon perioda jednodnevne kultivacije ćelija u standardnom hranjivom medijumu u cilju određivanja sposobnosti oporavka ćelija posle akutnog toksičnog delovanja.

MDCK ćelijska linija su epitelne ćelije, pa tako imaju morfološke i funkcionalne karakteristike epitela uopšte i po tome mogu biti dobar model za ispitivanja neposrednog dejstva RS na epitel gingive prilikom njihove aplikacije. To je bio glavni razlog za izbor *MDCK* ćelija za naša istraživanja kao analoga oralnog epitela, ali takođe i zbog mogućnosti njihovog uspešnog kultivisanja u laboratorijskim uslovima i lakog umnožavanja.

Inkubacija ćelija i sredstava za retrakciju gingive obavljena je na 37⁰C, kako bi se što vernije simulirali uslovi koji postoje u usnoj duplji. Kako se RS prilikom aplikacije rastvara u gingivalnom fluidu, a delimično i u pljuvački ili vodenom spreju, u ispitivanju su uzete u obzir njihove različite koncentracije (5%, 10%, 25% i 50%) (Edgar 1990, Nagler 2002). Krenulo se od pretpostavke da sa porastom koncentracije ispitivanog rastvora dolazi do opadanja broja vijabilnih ćelija. Dozna zavisnost preživljavanja ćelija dokaz je potencijalne citotoksičnosti ispitivanog materijala. 100% koncentracija rastvora nije uzeta u obzir iz razloga što direktno izlaganje ćelijske kulture RS, po navodima Liu i sar. (2004), dovodi do potpune inhibicije ćelijske proliferacije.

Nakon trominutnog i šestominutnog dejstva sredstvo na bazi tetrahidrozolina (*Visine*) nije pokazalo toksičan efekat na ćelijsku kulturu pri koncentracijama rastvora od 5%, 10% i 25%, dok je blaga citotoksičnost uočena za 50% koncentraciju rastvora (srednja vrednost intenziteta redukcije MTT-a : X= 80,74% kontrole). Nakon dejstva 50% rastvora *Visine* uočeno je statistički značajno smanjenje vijabilnosti ćelija u odnosu na niže koncentracije

ovog materijala. U slučaju RS na bazi aluminijum hlorida (*Retrargin* i *Gingival Liquid*) sa porastom koncentracije rastvora statistički se značajno povećava njihova citotoksičnost. 25% i 50% rastvor ovih RS pokazali su ozbiljan citotoksični efekat nakon trominutnog i šestominutnog dejstva, dok su se niže koncentracije pokazale netoksičnim. Posle desetominutne inkubacije sa ćelijskom kulturom, 5% rastvor *Visine* se dokazao kao netoksičan, dok su 10% i 25% rastvori imali blagi, a 50% rastvor umereni citotoksični efekat. Sa porastom koncentracije rastvora vijabilnost ćelija statistički značajno opada. Za preparate *Retrargin* i *Gingival Liquid* uočena je ozbiljna citotoksičnost za koncentracije rastvora od 25% i 50%. Vijabilnost ćelija bila je signifikantno manja u odnosu na dejstvo nižih koncentracija aluminijum hlorida. Postoji višestruki pad vijabilnosti nakon upotrebe 25% i 50% rastvora aluminijum hlorida u odnosu na koncentracije od 5% i 10%, što govori o značajno toksičnijem efektu ove vrste RS u odnosu na alternativni tetrahidrozolin.

Ispitivane dužine dejstva RS (tri, šest i deset minuta) u okviru su preporučenog trajanja retrakcionog postupka (Nowakowska 2006, Nementz 1984). U istraživanju se krenulo od pretpostavke da se sa smanjenjem trajanja retrakcione procedure ublažava rizik od nastanka oštećanja gingive.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da dužina dejstva utiče na vijabilnost ćelijske kulture *MDCK* za sva ispitivana RS. ANOVA analiza je utvrdila statističku zavisnost intenziteta redukcije MTT-a od perioda dejstva *Visine* na ćelijsku kulturu za koncentracije rastvora od 10% ($p < 0,05$), kao i 25% i 50% ($p < 0,001$). 5% i 10% rastvori *Visine* nisu pokazali citotoksičnost ni za jedan od opservacionih perioda, dok je za više koncentracije toksičnost rasla sa porastom trajanja dejstva na ćelijsku kulturu. Slični rezultati dobijeni su i nakon dejstva aluminijum hlorida. Sa porastom dužine dejstva materijala, vijabilnost u kulturi je signifikantno opadala. Analogno *Visine*, 5% i 10% rastvori aluminijum hlorida nisu pokazali toksičnost za ćelijsku kulturu ni za jedan od ispitivanih perioda dejstva. Sa druge strane, dejstvo 25% i 50% rastvora *Retrargin* i *Gingival Liquid* dovelo je do naglog pada vrednosti intenziteta redukcije MTT-a u svim ispitivanim periodima.

Koncentracije rastvora ispitivanih RS od 5% i 10% nisu pokazali toksično dejstvo ili je njihov uticaj na ćelijsku vijabilnost bio blag i blizak kontroli. Kod 25% rastvora RS ANOVA analiza je utvrdila statističku zavisnost vijabilnosti ćelija u kulturi u odnosu na primenjeni tip materijala za sve dužine dejstva. Sledstvena Post Hoc analiza je potvrdila značajno veću vijabilnost ćelija u kulturi pri dejstvu tetrahidrozolina u odnosu na preparate aluminijum hlorida ($p < 0,001$). Nakon trominutne inkubacije 25% rastvor *Visine* nije pokazao uticaj na ćelijsku kulturu ($X=96,02\%$ kontrole), dok su, sa druge strane *Retrargin* ($X=12,79\%$ kontrole) i

Gingival Liquid (X=20,87% kontrole) pokazali ozbiljan citotoksičan efekat. Posle šestominutnog dejstva rastvor *Visine* koncentracije 25% imao je blagi (X=82,87% kontrole), dok su *Gingival Liquid* (X=14,16% kontrole) i *Retrargin* (X= 11,40) pokazali ozbiljan citotoksični efekat. Nakon desetominutnog dejstva, toksični efekat 25% *Visine* na kulturu ćelija ostao je blag (X=79,50% kontrole), a *Gingival Liquid* (X=12,86% kontrole) i *Retrargin* (X=11,77% kontrole) ozbiljan.

Pri koncentraciji rastvora od 50% nađena je maksimalna statistička značajnost smanjenja intenziteta redukcije MTT-a za sve periode dejstva na ćelijsku kulturu ($p < 0,001$). Utvrđena je višestruko viša i signifikantno veća vijabilnost na dejstvo *Visine* u odnosu na *Retrargin* i *Gingival Liquid*. Nakon trominutnog i šestominutnog dejstva 50% rastvor *Visine* imao je umereni toksični efekat na kulturu ćelija, dok su *Retrargin* i *Gingival Liquid* pokazali ozbiljno citotoksično dejstvo. Nakon desetominutnog dejstva, efekat najviše koncentracije *Visine* na ćelijsku kulturu bio je umereno toksičan (X=44,62% kontrole), dok su *Retrargin* (X=11,47% kontrole) i *Gingival Liquid* (X=12,14% kontrole) bili ozbiljno toksični.

Oštećenje mitohondrijalne funkcije *MDCK* ćelija znak je citotoksičnog efekta sredstava za retrakciju gingive. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju u saglasnosti su sa nalazima Nowakowske i sar. (2010) da se sa porastom koncentracije i dužine dejstva RS smanjuje vijabilnost ćelija. Pored toga, ista grupa autora dokazala je i da se tetrahidrozolin u *in vitro* uslovima pokazao biokompatibilnijim u odnosu na ostala RS (Nowakowska 2012), što je dokazano i u ovom istraživanju.

Efekti komercijalno dostupnih sredstava na bazi aluminijum hlorida u uslovima *in vitro* publikovani su od strane nekoliko grupa autora (Kopač 2002, Liu 2004, Nowakowska 2012). Phatale i sar. (2010) navode da su oštećenja tkiva nastala upotrebom ove vrste RS blaga do umerena i da je aluminijum hlorid, samim tim, biokompatibilan. Nasuprot tome, rezultati dobijeni u ovoj studiji pokazuju ozbiljan uticaj viših koncentracija *Retrargin* i *Gingival Liquid* na vijabilnost *MDCK* ćelija i u saglasnosti su sa zaključcima Kopač i sar. (2002) i Lodetti i sar. (2004) koji su pokazali toksični efekat adstrigenasa na keratocitama. Niže numeričke vrednosti intenziteta redukcije MTT-a za *Retrargin* u poređenju sa *Gingival Liquid* mogu se objasniti različitom koncentracijom aktivne supstance u ova dva preparata. Naime *Gingival Liquid* je 10% aluminijum hlorid, dok je *Retrargin* 25% aluminijum hlorid, tako da veća inicijalna koncentracija aktivne supstance više smanjuje vijabilnost ćelija u kulturi. Felpel i sar. (1997) su pokazali da u koncentracijama većim od 10% izaziva oštećenje tkiva kidanjem intercelularnih veza u epitelu gingive.

Citotoksični efekat adstrigensnih RS koji se nalaze na tržištu može se objasniti i njihovim niskim pH vrednostima (pH=0,8-3), koja se smanjuje sa povećanjem njihove koncentracije (Woody 1993, Kopač 2002). Naime, RS su kiseli rastvori potencijalno toksični za tkiva parodonta i dentin zuba (Polat 2007). Ayo-Yusuf i sar. (2005) su *scanning* elektronskom mikroskopijom pokazali morfološke alteracije na prepariranom dentinu nakon tretmana konvencionalnim adstrigensima. Sa druge strane, tetrahidrozolin ima pH vrednost sličnu fiziološkoj (pH=5,6), pa se njegovo dejstvo na tkivo gingive, ali i dentina može smatrati neutralnim (Woody 1993, Kopač 2002).

Rezultati studije pokazali su najmanji citotoksični efekat alternativnog sredstva za retrakciju gingive na bazi tetrahidrozolina, što je u saglasnosti sa rezultatima još nekih autora (Kopač 2002, Nowakowska 2012). Kopač i sar. (2002) su *scanning* i transmissionom elektronskom mikroskopskom analizom dokazali veću biokompatibilnost tetrahidrozolina u odnosu na 25% aluminijum hlorid. Efekat *Visine* na ćelijsku kulturu je izostao pri dejstvu nižih koncentracija rastvora, ili je bio veoma blag, što ne bi trebalo da ima klinički značaj. Rastvor *Visine* je pokazao umereno toksično dejstvo na ćelijsku kulturu pri maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji za najduži, desetominutni opservacioni period. U svakodnevnoj stomatološkoj praksi teži se skraćivanju retrakcionog postupka, pa se dobrim izvođenjem kliničke procedure ona može svesti na period znatno kraći od deset minuta. Pored toga, RS, pa i *Visine* se u sulkusu razblažuju gingivalnim fluidom, tako da im je koncentracija prilikom upotrebe daleko manja od inicijalne.

Dosadašnji rezultati *in vitro* istraživanja dostupni u literaturi nisu obuhvatili produženo dejstvo RS na ćelijsku kulturu kao i eventualnu reverzibilnost nastalih promena. Nedostatak testiranja materijala na ćelijskim kulturama svakako je i nemogućnost da se promene sagledaju u dužem vremenskom intervalu. Ozdravljenje ćelija epitela gingive u kliničkim uslovima, prema podacima u dosada objavljenim podacima, očekuje se nakon 3 do 21 dana (Loe 1963, Ruel 1980, Ingaham 1981, Azzu 1983). Istraživanja Reiman i sar. (1976) pokazala su da sredstva na bazi aluminijum hlorida ne izazivaju permanentna oštećenja gingive ukoliko se on iz gingivalnog sulkusa ukloni u roku od 15 minuta. Uzimajući u obzir sva ograničenja koja imaju *in vitro* studije, ispitivan je i uticaj RS na oporavak ćelija u kulturi, a dobijeni rezultati potvrđeni su testiranjem na laboratorijskim životinjama.

U cilju ispitivanja prolongiranog dejstva sredstava za retrakciju gingive na ćelijsku kulturu, *MDCK* ćelije su nakon tretiranja različitim koncentracijama ispitivanih materijala dodatno inkubirane u hranjivom medijumu u trajanju od 24 časa. Nakon perioda naknadne inkubacije, procenjivan je stepen ćelijskog oporavka merenjem intenziteta redukcije tetrazo-

lijumove soli. U istraživanju se pretpostavilo da oporavak ćelijske kulture zavisi od koncentracije ispitivanih rastvora, dužine njihovog dejstva (tri, šest i deset minuta), kao i od tipa primenjenog RS.

Utvrđena je statistička zavisnost intenziteta redukcije MTT-a (vijabilnosti ćelija) u odnosu na koncentraciju rastvora kod svih ispitivanih materijala, tako da je mogućnost oporavka opadala sa porastom koncentracije rastvora. Nakon trominutnog dejstva na ćelijsku kulturu posle koga su ćelije inkubirane u standardnom medijumu, rastvori *Visine* koncentracija 5%, 10% i 25% pokazali su se kao netoksični dok je 50% rastvor imao blag inhibitoryni efekat na vijabilnost ćelija. Nakon šestominutnog i desetominutnog dejstva, 25% rastvor tetrahidrozolina imao je blag, a 50% umereni citotoksični efekat.

U eksperimentima sa oporavkom ćelija 5% i 10% rastvori aluminijum hlorida nisu pokazali efekat na ćelijsku vijabilnost, ali je porast koncentracije na 25% i 50% doveo do višestrukog pada vijabilnosti. Nakon dejstva na kulturu ćelija u trajanju od deset minuta sa kasnijim oporavkom uočeno je četverostruko smanjenje vijabilnosti ćelija pri dejstvu 10% ($X=97,41\%$ kontrole) u odnosu na 5% rastvor *Retrargin* ($X=21,18\%$ kontrole).

Rezultati istraživanja su potvrdili hipotezu da dužina dejstva RS utiče na smanjenje mogućnosti oporavka ćelija u standardnom medijumu. Signifikantno viša vrednost vijabilnosti ćelija utvrđena je nakon trominutnog dejstva *Visine* u odnosu na desetominutni opservacioni period. 50% rastvor tetrahidrozolina pokazao je blag citotoksični efekat nakon trominutnog, a umereni nakon desetominutnog dejstva. Kod preparata na bazi aluminijum hlorida uočena je statistička zavisnost oporavka ćelija u odnosu na dužinu dejstva rastvora i to $p<0,05$ pri koncentraciji od 5% i 25% i $p<0,001$ za 10% i 50% rastvor. 10% rastvor *Retrargin* nakon tri minuta dejstva na ćelije nije pokazao produženi toksični efekat na njihovu vijabilnost, nakon šest minuta bio je blago, a nakon deset minuta ozbiljno citotoksičan. Visoke koncentracije preparata na bazi aluminijum hlorida nakon desetominutnog dejstva pokazale su ozbiljan megativan efekat na 24-časovno preživljavanje ćelija u kulturi.

Efekat na oporavak ćelija u kulturi zavisio je od tipa ispitivanog materijala. Pri koncentraciji od 5% rastvori svih ispitivanih materijala pokazali su se necitotoksični. Za 10% koncentraciju uočena je statistička zavisnost redukcije oporavka ćelija u odnosu na tip materijala kod trominutnog ($p<0,01$) i šestominutnog dejstva ($p<0,001$). Nakon desetominutnog dejstva 25% rastvor *Visine* nije imao bitan efekat na oporavak u ćelijskoj kulturi ($X=89,62\%$ kontrole), *Gingival Liquid* je pokazao umerenu ($X=58,32\%$ kontrole), a *Retrargin* ozbiljnu citotoksičnost ($X=21,18\%$ kontrole). Za 50% rastvore ANOVA analiza je utvrdila maksimalnu statističku zavisnost redukcije oporavka ćelija u odnosu na tip materijala za sve periode dej-

stva na ćelijsku kulturu ($p < 0,001$). Post Hoc analiza potvrdila je višestruko višu i statistički značajno veću redukciju MTT od strane ćelija nakon dejstva rastvora *Visine* u poređenju sa materijalima *Retrargin* i *Gingival Liquid*. Nakon trominutne inkubacije i jednodnevnog oporavka ćelija u kulturi, *Visine* je pokazao blago ($X=64,19\%$ kontrole), dok su *Gingival Liquid* ($X=8,1\%$ kontrole) i *Retrargin* ($X=7,68\%$ kontrole) imali ozbiljno citotoksično dejstvo. Sa produženjem vremena dejstva sa tri na šest minuta, efekat 50% rastvora *Visine* na ćelijsku vijabilnost bio je umeren ($X=48,75\%$ kontrole). Umerena citotoksičnost *Visine* zabeležena je i nakon desetominutne inkubacije 50% rastvora sa ćelijama ($X=38,37\%$ kontrole), dok su numeričke vrednosti intenziteta redukcije MTT-a kod preparata *Gingival Liquid* ($X=6,67\%$ kontrole) i *Retrargin* ($X=6,29\%$ kontrole) progresivno opadale. Slične numeričke vrednosti dobijene za oba tipa materijala na bazi aluminijum hlorida ukazuju da je njihova 50% koncentracija pokazala alarmantnu produženu toksičnost na ćelijske kulture, bez obzira na inicijalnu koncentraciju aktivne supstance u preparatu.

Dejstvo 5%, 10% i 25% rastvora tetrahidrozolina nije imalo bitnih efekta na oporavak u kulturi, a 50% rastvor *Visine* pokazao je blagi do umereni citotoksični efekat. Tetrahidrozolin se i u ovom aspektu istraživanja pokazao daleko biokompatibilnijim u komparaciji sa RS na bazi aluminijum hlorida.

Našim ispitivanjima smo utvrdili da se ćelije u kulturi mogu pod određenim uslovima oporaviti nakon uklanjanja RS iz hranjivog medijuma u kome su odgajane, što je u saglasnosti sa nalazima drugih autora na drugim kulturama i pri delovanju drugih agenasa (Greenberg 1985, Moghadasali 2013). Xie i sar. (2013) dokazuju oporavak *HeLa* ćelija oštećenih dejstvom etanola nakon ponovne inkubacije sa svežim medijumom, a njihova povećana vijabilnost dokazana je MTT testom. Bohm (2006) ukazuje na toksično delovanje Pentoxilline u medijumu na G2 ćelijsku kulturu i mogućnost oporavka iste nakon njihovog uklanjanja i naknadne inkubacije ćelija u standardnom medijumu.

U ovoj studiji, period ponovne inkubacije ćelija u hranjivom medijumu iznosio je 24 časa, te nije sagledan potencijalni produženi toksični efekata na ćelijski rast. Za kompletnije sagledavanje mogućnosti oporavka od toksičnog efekta na ćelijske kulture Moghadasali i sar. (2013) predlažu naknadni inkubacioni period od pet do sedam dana.

U cilju poboljšanja efekta oporavka, hranjivom medijumu se mogu dodati supstance koje pozitivno utiču na vijabilnost i rast ispitivane ćelijske kulture. Greenberg i sar. (1985) ukazuju na pozitivno dejstvo jona cinka na oporavak ćelija oštećenih *C. trachomatis*. Ovakve studije su korisne za pronalaženje potencijalnih protektivnih i terapijskih sredstava kod kliničke primene citotoksičnih agenasa, kao što su RS. Studije o oporavku ćelijske kulture

jako su bitne u pronalaženju lekova za maligne tumore pomoću njihovog paralelnog testiranja na tumorskim i zdravim ćelijama ispitivanjem njihove vijabilnosti i proliferacije (Stallcup 1984, Shillitoe i Pellenz 2005).

Komparativna analiza vijabilnosti ćelija pokazala je statistički značajno više vrednosti intenziteta redukcije MTT-a neposredno nakon dejstava RS u odnosu na rezultate dobijene nakon oporavka ćelija. Uzevši u obzir nizak citotoksični efekat tetrahidrozolina i posle perioda oporavka, može se tvrditi da je njihov uticaj na ćelijsku vijabilnost zanemarljiv. Nasuprot tome, signifikantno više vrednosti ćelijske vijabilnosti neposredno posle dejstava RS u odnosu na vrednosti nakon dodatne inkubacije ćelija govore o prolongiranom štetnom uticaju preparata aluminijum hlorida, što može biti mehanizma za pokretanje sekundarnog inflamatornog odgovora.

Manje vrednosti intenziteta redukcije MTT-a nakon dodatne inkubacije ćelija dokazale su prolongirano dejstvo rastvora RS, koji negativno utiču na oporavak i vijabilnost ćelijske kulture jedan dan nakon aplikacije. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa zaključcima Liu i sar. (2009) koji su dokazali da komercijalno dostupna RS dovode do inhibicije proliferacije i ćelijskog oštećenja, koje raste srazmerno sa povećanjem koncentracije i dužine dejstva ispitivanog materijala.

Rastvori preparata aluminijum hlorida u koncentracijama 25% i 50% imali su ozbiljan citotoksični efekat već pri trominutnom dejstvu. Manje koncentracije rastvora imale su više-struko slabiji produžen citotoksični efekat na ćelije u kulturi. Na osnovu naših ispitivanja može se dati preporuka da je u cilju prevencije oštećenja epitelnih ćelija gingive neophodno smanjenje koncentracije upotrebljenog RS ispiranjem gingivalnog sulkusa vodenim sprejom ili fiziološkim rastvorom, smanjenje opservacionog perioda ispod šest minuta, kao i kontrolisano brušenje zuba sa što manjim oštećenjem gingivalnog tkiva kako bi se resorpcija RS svela na minimum. Takođe, ako se primenjuje preparat na bazi tetrahidrozolina kao sredstva za retrakciju gingive, skraćanjem perioda njegove aplikacije ispod 10 minuta smanjuje se svaki rizik od oštećenja okolnog tkiva.

Ukoliko je fiksni protetički rad obimniji i podrazumeva brušenje većeg boja zuba, dejstvo RS nije vremenski ravnomerno što sa jedne strane može rezultovati nejednakim retrakcionim efektom, a sa druge oštećenjem gingive sulkusa u kome je retrakcioni konac najranije aplikovan. Pojedini autori preporučuju aplikaciju retrakcionog konca u gingivalni sulkus i naknadnu aplikaciju RS, što može dodatno oštetiti okolno tkivo. Zato retrakcioni postupak mora biti strogo kontrolisan i vešto izveden od strane stomatologa kako bi se željeni efekat postigao bez štetnog dejstva primenjenog materijala.

7.3. DEJSTVA SREDSTAVA ZA RETRAKCIJU GINGIVE NA *IN VIVO* EKSPERIMENTALNIM MODELIMA

Eksperimenti na laboratorijskim životinjama predstavljaju verodostojnu bazu za dobijanje podataka o ispitivanom materijalu pre njegove kliničke aplikacije. Eksperimentalne životinje su gajene u identičnim životnim uslovima, istog su pola i uzrasta, tako da predstavljaju homogenu grupu. Validnost testova na animalnim modelima veća je u odnosu na *in vitro* istraživanja, s obzirom na sličnost sa uslovima koji postoje u ljudskom organizmu. Međutim, postoje izvesne razlike u morfološkim i funkcionalnim osobinama tkiva i organa ljudi i životinja, te stoga u translaciji dobijenih rezultata treba uzimati u obzir ove razlike. Sa druge strane, humane longitudinalne studije čija je svrha etiopatogeneza oboljenja parodonta nisu lako primenjive zbog različitog stepena aktivnosti bolesti, rizika od njenog napredovanja, kao i relevantnosti dobijenih podataka usled individualnih razlika ispitanika i postojanja sistemskih oboljenja (Weinberg 1999). Sem toga, ispitivanja na ljudima su ograničena etičkom pitanjima. *In vivo* istraživanje prihvatljivosti ispitivanog materijala zahteva upotrebu određenog kriterijuma za utvrđivanje prihvatljivosti reakcije tkiva, a u zavisnosti od namene samog materijala. Zato, svako ovakvo *in vivo* istraživanje mora da obezbedi radnu definiciju biokompatibilnosti.

Promene na parodontalnom tkivu tokom retrakcione procedure mogu biti posledica mehaničkog oštećenja pripojnog epitela tokom aplikacije konca, ali su češće vezane za dejstvo primenjenog RS. Dosadašnja ispitivanja na eksperimentalnim modelima *in vivo* nisu pružila informacije o komparaciji dejstava različitih retrakcionih tehnika i komercijalno dostupnih i alternativnih RS na gingivalno tkivo, u različitim opservacionim periodima. Studije su bile ograničene na jednu od dve grupe RS, kao i na opservacioni period do dve nedelje, pa nije ispitivan dugoročni efekat ispitivanih materijala na gingivu eksperimentalnih životinja (Shaw 1980, Ruel 1980, Kopač 2002). Svrha rezultata ovog istraživanja bila je uporedna analiza efekata adstrigensnih i vazokonstriktornih RS na gingivalno tkivo eksperimentalnih životinja nakon postupka retrakcije gingive analognog kliničkim uslovima.

Kunići predstavljaju preporučeni animalni model za *in vivo* proučavanje razvoja parodontalnih oboljenja i regeneracije tkiva parodonta nakon hirurških procedura zbog anatomohistološke i funkcionalne sličnosti njihovog gingivalnog tkiva sa tkivom čoveka (Oortgiesen 2010, Oz 2011). Kunić ima četiri sekutića, po dva u svakoj vilici sa jasno izraženom pripojnom gingivom i sulkusom dubine slične čovekovom.

Ekperimentalni dizajn je predvideo aplikaciju retrakcionog konca impregniranog RS na bazi aluminijum hlorida i adrenalina, kao i alternativnog tetrahidrozolina u gingivalni sulkus levih maksilarnih i mandibularnih sekutića kunića. Intaktna gingiva gornjih desnih sekutića svake od korišćenih životinja služila je kao negativna kontrola. U sulkus donjih desnih sekutića eksperimentalnih životinja aplikovan je retrakcioni konac bez RS (lažan tretman). Precizna dijagnoza i poznavanje histoloških promene koje nastaju kod gingivitisa bila je od krucijalnog značaja u sagledavanju efekata RS na desni.

Intaktnost gingivalnog tkiva imperativ je za dobijanje verodostojnih podataka i analizu razvoja parodontalnih oboljenja. Postoji značajna razlika u apsorpciji RS u zavisnosti od toga da li je epitel gingive zdrav ili oštećen sa znacima gingivita (Polat 2007). Gingivalno tkivo životinja korišćenih u eksperimentu bilo je zdravo, što je potvrđeno kliničkim pregledom, kao i patohistološkom analizom tkiva negativne kontrole, na kojem nije izvođena intervencija.

U ovom istraživanju RS aplikovana su u gingivalne sulkuse intaktnih sekutića, bez prethodne preparacije zuba, kako ne bismo oštetili tkivo tokom brušenja i time ugrozili objektivnost dobijenih rezultata (Kopač 2002). Mehanička trauma može da povredi gingivu i dovede do njenog povlačenja, ali i da pospeši inflamatorne efekte RS, tako da dobijeni rezultati ne bi bili relevantni (Hatch 1984, Boweles 1991, Felpel 1997). Promene nastale u *in vivo* studiji su, samim tim, isključivo rezultat lokalne apsorpcije RS.

Dužina retrakcionog dejstva materijala iznosila je sedam minuta, što predstavlja srednju vrednost preporučenog vremena pripreme gingivalnog sulkusa. U istraživanjima drugih autora ekspozicija gingive impregniranom retrakcionom koncu iznosila je tri (Akca i sar. 2006), pet (Ruel i sar. 1980) ili deset minuta (Shaw i sar. 1980, Kopač i sar. 2002).

Nakon opservacionih perioda od jednog sata, jednog, sedam i trideset dana izvršena je biopsija gingivalnog tkiva sekutića kunića po utvrđenom planu eksperimenta i isečak gingivalnog tkiva je analiziran patohistološki. Odsustvo infekcije govori o sterilnosti uslova pod kojima su opisane intervencije sprovedene. Sistemske reakcije organizma kunića su izostale.

Uzorci tkiva klinički zdrave gingive, na kojima nisu rađeni nikakvi zahvati (negativna kontrola) nisu pokazali znake inflamacije ni u jednom od predviđenih opservacionih perioda. U vezivu zdrave gingive preovladavali su fibroblasti sa neznatnim zapaljenskim infiltratom.

Inflamacija na patohistološkom nivou je gotovo u potpunosti izostala i kod uzoraka tkiva nakon lažne operacije za sve predviđene opservacione periode, što je isključilo efekat mehaničkog oštećenja tkiva prilikom aplikacije retrakcionog konca. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Ayna i sar. (2005). Minimalne promene u strukturi tkiva ne utiču na rezultate istraživanja i mogu se zanemariti obzirom da su prisutne prilikom aplikacije svih

ispitivanih sredstava. Gingivalno tkivo poseduje regenerativne sposobnosti, pa se nekoliko dana nakon mehaničke traume može u najvećoj meri oporaviti (Bosshardt 2004). Istraživanjem na eksperimentalnim životinjama Taylor i Cambell (1972) su pokazali da se posle potpunog odvajanja epitela od površine zuba, novi pripoj pojavio nakon pet dana. Bez obzira što se na taj način izbegava njihovo potencijalno štetno dejstvo na gingivu, korišćenje retrakcionih konca bez RS pokazuje manji terapijski efekat, tako da se mehanička retrakcija gingive retko kada koristi u pripremi brušenih zuba za otiskivanje (Benson 1986, Beler 2009).

Jedan sat nakon uklanjanja retrakcionog konca, gingivalno tkivo levih sekutića je na makroskopskom nivou pokazalo neznatne inflamatorne promene u odnosu na kontrolnu stranu. Promene u vidu blagog otoka mogu biti i posledica mehaničke traume prilikom aplikacije retrakcionog konca. Naime, svako oštećenje vezivnog tkiva dovodi do reaktivne hiperemije koja je praćena vazodilatacijom sitnih krvnih sudova, povećanjem permeabilnosti endotela i eksudacije njihovog sadržaja. Klinički je hiperemija praćena lokalnim crvenilom tkiva i blagim otokom. Lokalni i sistemski odbrambeni mehanizmi sprečavaju dalja oštećenja tkiva, tako da su nastale promene reverzibilnog karaktera.

Kako je retrakcini konac aplikovan u leve gingivalne sulkuse impregniran ispitivanim RS, promene nastale u gingivalnom tkivu kunića nisu čisto mehaničke prirode, te reparabilni mehanizmi teže dovode do potpunog ozdravljenja tkiva. Stepem nastalih promena zavisio je od vrste upotrebljenog RS.

Jedan sat nakon aplikacije RS na patohistološkim preparatima je prikazan različiti stepen zapaljenskih promena, koje su izostale na kontrolnom uzorku. Uočena je vazodilatacija krvnih sudova, pojava polimorfonuklearnog infiltrata u centru zapaljenja, kao i smanjena količina kolagenih vlakana. Nastale promene imaju karakteristike reaktivnog akutnog zapaljenja (Klinge 1983, Gillett 1990). Intenzitet zapaljenske reakcije zavisio je od vrste RS, te je nakon aplikacije aluminijum hlorida i adrenalina reakcija bila nešto izraženija nego nakon korišćenja tetrahidrozolina.

Nakon jednodnevnog opservacionog perioda primećene su akutne zapaljenske promene na gingivalnom tkivu levih sekutića kunića kako na makroskopskom tako i na mikroskopskom nivou. Gingiva oko levih sekutića kunića bila je blago otečena i crvena nakon aplikacije preparata na bazi aluminijum hlorida i adrenalina. Sklonost ka krvarenju je izostala. Suprotno tome, jedan dan nakon aplikacije tetrahidrozolina gingiva oko maksilarnog i mandibularnog levog sekutića kunića ostala je klinički nepromenjena.

I na mikroskopskom nivou, inflamatorna infiltracija bila je značajno izraženija u slučaju uzoraka tkiva tretiranih komercijlnim RS u odnosu na tetrahidrozin. Jedan dan nakon

impregnacije retrakcionih konaca aluminijum hloridom i adrenalinom biopsirano tkivo pokazalo je znake intenzivne inflamatorne reakcije (prisustvo obimne akumulacije polimorfonukleara, limfocita, plazmocita, makrofaga, džinovskih ćelija tipa stranog tela i kapilara sa izraženom kongestijom). Reakcija tkiva bila je, takođe, prisutna i jedan dan nakon aplikacije tetrahidrozolina, ali je bila slabijeg intenziteta i sa manjom destrukcijom posmatranog tkiva.

Nakon sedmodnevnog opservacionog perioda uzorci tkiva tretiranih RS na bazi aluminijum hlorida i adrenalina pokazivali su znake intenzivne zapaljenske reakcije, što govori u prilog njihovom prolongiranom toksičnom dejstvu na gingivalni sulkus kunića.

Najmanji inflamatorni efekat na makroskopskom i mikroskopskom nivou, i u ovom slučaju, pokazao je tetrahidrozolin. Patohistološkom analizom uočena je blaga inflamatorna reakcija tretiranog tkiva (formiranje fibrozne kapsule sa prisustvom makrofaga, polimorfonukleara, limfocita i plazmocita). Reakcija na retrakciju gingivalnog tkiva kunića poprimila je hronični karakter i vodila ka njegovom ozdravljenju.

Sa porastom dužine opservacionog perioda došlo je fibroze tkiva čime je inflamacija dobila hronični karakter. Novonastalo fibrozno tkivo znak je reparacije defekta u tretiranom tkivu. Patohistološkom analizom preparata gingivalnog tkiva tretiranog RS na bazi aluminijum hlorida i adrenalina, opisana je blaga zapaljenska reakcija (prisustvo fibrozne kapsule sa manjim brojem limfocita i plazmocita).

Posle jednomesečnog opservacionog perioda biopsirano gingivalno tkivo tretirano tetrahidrozolinom nije pokazivalo znake inflamacije i nije se razlikovalo od opšte kontrole. Kompletna reparacija veziva desni kunića dokaz je manje toksičnog dejstva tetrahidrozolina kao RS u dužem vremenskom periodu u odnosu na komercijalno dostupne preparate aluminijumovih soli i adrenalina.

Rezultati istraživanja ukazali su na reverzibilno oštećenje gingivalnog tkiva posle lokalne aplikacije RS na bazi aluminijum hlorida i adrenalina. Značajnijih promena u strukturi tkiva jedan sat nakon uklanjanja nije bilo. Međutim, njihova upotreba dovela je do akutnog inflamatornog odgovora kod opservacionog perioda od jednog i sedam dana. Posle trideset dana uočena je reparacija oštećenog tkiva. Komparacija sa ostalim ispitivanim RS ukazuje na manju toksičnost tetrahidrozolina u odnosu na preparate aluminijum hlorida i adrenalina.

Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa nalazima drugih autora koji su sagledavali uticaj RS na gingivalno tkivo različitih animalnih modela u predviđenim vremenskim intervalima. Harrison i sar. su u *in vivo* studiji komparirali efekat različitih sredstava za retrakciju na gingivalno tkivo pasa u toku opservacionog perioda od tri nedelje (Harrison 1961). Dobijeni

rezultati su u pozitivnoj korelaciji sa rezultatima ove studije i ukazuju na oštećenje gingivalnog tkiva reverzibilnog karaktera kod upotrebe preparata na bazi adrenalina i aluminijumove soli (alum). Ozdravljenje tkiva usledilo je nakon sedam odnosno deset dana, u zavisnosti od vrste upotrebljenog RS. Upotreba preparata na bazi cink hlorida dovela je do ozbiljnijih promena u gingivalnom tkivu pasa, što ih je vremenom diskvalifikovalo iz uobičajene upotrebe (Harrison 1961, Loe 1963). Reverzibilni zapaljenski odgovor nakon aplikacije RS na bazi aluminijum hlorida i adrenalina potvrđen je i od strane Woycheshin i sar. (1964) i Shaw i sar. (1980). Ayna i sar. (2005) su zaključili da upotreba RS dovodi do destrukcije sulkusnog i pripojnog epitela, kao i do smanjenja vlakana u vezivu. Ova grupa autora dokazala je minimalnu recesiju gingive nakon retrakcione procedure. Ahmadzadeh i sar. (2014) su ispitivali inflamatorni potencijal 15,5% ferisulfata na gingivalno tkivo pasa. Ozdravljenje tkiva uočeno je nakon sedmodnevnog opservacionog perioda bez obzira na dužinu dejstva preparata (tri i deset minuta).

Rezultati Loe i sar. (1963) pokazali su da upotreba adrenalina u svrhu retrakcije gingive dovodi do površinske nekroze i ćelijske degeneracije vezivnog tkiva gingive pasa, koje su, takođe, reverzibilnog karaktera. Ruel i sar. (1980) su u svojoj *in vivo* studiji zaključili da je petominutna ekspozitura gingive koncu impregniranom adrenalinom dovela do inflamatorne reakcije tkiva koja vremenom opada i približava se kontroli nakon osam dana. Ayna i sar. (2005) su našli da je konac impregniran adrenalinom doveo je do reverzibilne inflamacije sa ozdravljenjem tkiva nakon desetodnevnog opservacionog perioda.

Studija Akca i sar. (2006) je dokazala je ozdravljenje gingivalnog tkiva pasa nakon primene aluminijum hlorida kao RS. Phatale i sar. (2010) navode blagu do umerenu inflamaciju izazvanu upotrebom ovog RS, bez degeneracije i nekroze tkiva.

U svom vazoaktivnom dejstvu na gingivalno tkivo preparati na bazi aluminijum hlorida i adrenalina pokazuju različiti mehanizam. Dejstvo sredstava na bazi adstrigenasa vodi ka lokalnom površinskom oštećenju i reaktivnoj hiperemiji tkiva, dok su molekuli vazokonstriktora deluju direktno na krvne sudove i rezultuju prolongiranom ishemijom tkiva (Albaker 2010). U ovom istraživanju nije uočena značajna razlika u inflamatorno odgovoru gingivalnog tkiva kunića na dejstvo 10% i 25% aluminijum hlorida i 8% adrenalina, što je u pozitivnoj korelaciji sa nalazima de Gennaro i sar. (1982).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je upotreba RS i tetrahidrozolina dovela do tranzitorne inflamacije gingive koja počinje da se sanira nedelju dana nakon aplikacije ispitanog materijala. Teško se može precizno definisati optimalni period ozdravljenja povređenog tkiva gingive. Prema Shaw i sar. (1980) period zarastanja iznosi dve, dok se prema

rezultatima Tupac i Neacy (1981) on prolongira na tri nedelje nakon retrakcione procedure. Ispitivanja drugih autora pokazala su da se oštećenje koje je nastalo u gingivalnom sulkusu polako sanira nakon jedne do dve nedelje, ali je regeneracija tkiva još uvek nepotpuna (Harrison 1961, Wozcheshin 1964, Xhonga 1971, Ruel 1980, de Gennaro 1982). Ozdravljenje gingive nakon sedmodnevnog opservacionog perioda bilo je nepotpuno za ispitivana sredstva na bazi aluminijum hlorida i adrenalin. Dobijeni rezultati ovog istraživanja istovetni su sa nalazom Jokstad i sar. (1999), gde se reparacija gingivalnog tkiva nakon aplikacije RS jasno uočava na histopatološkim preparatima nakon jednomesečnog opservacionog perioda. Sa druge strane, razlike u histološkoj strukturi tkiva tretiranog tetrahidrozolinom i opšte kontrole su nakon sedmodnevnog opservacionog perioda bile neznatne.

Inflamatorne promene nastale aplikacijom tetrahidrozolina bile su značajno slabijeg intenziteta u odnosu na RS na bazi aluminijum hlorida i adrenalina i rezultovale su uznapređovanim ozdravljenjem nakon sedmodnevnog i potpunom reparacijom tkiva nakon tridesetodnevnog opservacionog perioda. Tetrahidrozolin se pokazao biološki prihvatljivijim u odnosu na ispitivana retrakciona sredstva. Rezultati Kopača i sar. (2002) odnosili su se na poređenje dejstava RS na bazi aluminijumovih soli i tetrahidrozolina na gingivalno tkivo pasa. Nastale inflamatorne promene u vezivu gingive bile su signifikantno manje na tkivu tretiranom tetrahidrozolinom za sva tri opservaciona perioda (jedan sat, jedan i sedam dana). Nakon sedam dana, histološki preparati tkiva tretiranog tetrahidrozolinom bili su najsličniji kontroli, dok su se na tretiranom aluminijum hloridom videli znaci zapaljenja hroničnog karaktera (Kopač 2002).

Rezultati ovog istraživanja mogu biti od velike pomoći u iznalaženju klinički najprihvatljivijeg RS.

Upotreba adrenalina u kliničkoj praksi veoma je rasprostranjena (Pescatore 2007, Csillag 2007). Sa druge strane, postoji širok dijapazon neželjenih sistemskih reakcija na apsorpciju adrenalina, što značajno smanjuje njegovo indikaciono područje. Terapijski efekat adrenalina jeste vazokonstrikcija krvnih sudova, što vodi povećanju krvnog pritiska i srčanog ritma. Dostupni literaturni podaci su pokazali da adrenalin može dovesti do niza neželjenih efekata koji najčešće obuhvataju tahikardiju, ubrzano disanje, uznemirenost i slabost u ekstremitetima (Pelzner 1978, Bowels 1991, Brand 1996, Bader 2002, Al Hamad 2008). U kliničkoj praksi opisana su i dejstva adrenalina sa težim posledicama ili fatalnim ishodom (Hilley 1984). Rizik se povećava ukoliko se adrenalin u RS kombinuje sa lokalnim anestetikom, endogenom sekrecijom istog u stresnoj situaciji ili pri većom oštećenju gingivalnog tkiva tokom preparacije zuba (Brand 1996). Stoga je neophodna stroga kontrola kod svih

pacijenata kod kojih se adrenalin primenjuje (Glick 1988, Goulet 1992, Muzyka 1997). Nekoliko studija govori o tome kako adrenalin negativno utiče i na pacijente sa normalnom tenzijom (Munoz 1970, Pelzner 1978, Hatch 1984). Kellam i sar. su utvrdili da se iz retrakcionog konca 64-94% adrenalina apsorbuje u gingivalno tkivo (Kellam 1992). Opasnost je, naravno, veća ukoliko je broj aplikovanih impregniranih konaca veći i ukoliko tretman duže traje (Harris 1978). Sem sistemskog adrenalina, takođe, može dovesti i do lokalnog oštećenja tkiva (Ruel 1980, Pescatore 2002).

Mišljenja autora o opravdanosti korišćenja adrenalina kao sredstva za retrakciju gingive veoma su podeljena. Kellam i sar. (1992), kao i Yagiela i sar. (1999) preporučuju izbacivanje upotrebe adrenalina u svakodnevnoj stomatološkoj praksi. Jokstad i sar. (1999) ne ukazuju ni na jednu od prednosti adrenalina u odnosu na adstringentna sredstva. Nasuprot tome, Bowels i sar. (1991) Fazekas i sar. (2002) su dokazali bolju kontrolu krvarenja gingive upotrebom sredstava na bazi adrenalina u odnosu na adstringense. Rezultati istraživanja Polat i sar. (2007) pokazali su da nema značajne razlike u kontroli protoka krvi nakon retrakcije gingivalnog tkiva adrenalinom ili aluminijum hloridom. Ova grupa autora preporučuje upotrebu adrenalina kod zdravih pacijenata sa intaktnom gingivom, pod uslovom da se za vreme aplikacije ne traumatizira gingivalno tkivo i izbegne stres kod pacijenata.

S obzirom da je Kopač i sar. (2002) pokazali da 10% aluminijum hlorid u uslovima *in vitro* ima manji toksični efekat u odnosu na 25%, nameće se zaključak da bi i manjan koncentracija adrenalina imala slabiji toksični efekat u odnosu na komercijalno dostupni 8%. Istraživanja Fazekas i sar. (2002) i Csillag i sar. (2007) pokazala su da upotreba adrenalina manjih koncentracija (0,01% i 0,1%) ne daje sistemske efekte. Rezultati eksperimenta Nowakowske i sar. (2012) ukazali su predložene koncentracije adrenalina nemaju neželjene efekte u *in vitro* uslovima. Prednost adrenalina nad adstringensima jeste vazokonstriktorni efekat. Ipak, nameće se pitanje da li će ova, veoma mala koncentracija adrenalina dati željeni klinički efekat. Sa druge strane, pojedine pilot studije dokazale su da je retrakcioni efekat 0,05% tetrahidrozolina kao agonista α receptora vrlo sličan dostupnim retrakcionim preparatima (Bowels 1991). Tetrahidrozolin se samim tim nametnuo kao vazokonstriktor koji će bez eventualnih neželjenih efekata uspostaviti optimalnu kontrolu krvarenja desni.

Tetrahidrozolin spada u grupu simpatomimetskih vazokonstriktora, odnosno α agonista i komercijalno je dostupan u vidu nazalnih i olfaktornih dekongestiva. Sistemske reakcije na upotrebu ovih proizvoda jako su retke, a s obzirom da su maksimalne preporučene doze značajno veće od potrebnih za efikasnu retrakciju gingive (Bowles 1991). Ispitivanja Bowles i sar. pokazala su zadovoljavajući klinički efekat tetrahidrozolina, jak lokalni vazokonstriktorni

efekat i odsustvo sistemskih reakcija. Klinička studija Tardy i sar. (1990) dokazala je veću retrakcionu efikasnost tetrahidrozolina u odnosu na adrenalin, uz odsustvo neželjenih efekata. Feng i sar. (2011) su kliničkoj studiji utvrdili sličan retrakcioni efekat komercijalno dostupnih RS i tetrahidrozolina .

Promene nastale na gingivi nakon retrakcione procedure klinički su dokazane porastom nivoa citokina u gingivalnoj tenosti, kao i kroz indikatore parodontalnih bolesti (gingivalni indeks) (Benjamin 1970, Azzi 1983, Feng 2006). Kliničkim ispitivanjima dokazan je porast vrednosti gingivalnog indeksa jedan do dva nakon plasmana retrakcionog konca. Uz kontrolisanu oralnu higijenu i uz upotrebu privremenih kruna sa optimalnim rubnim zatvaranjem, uočeno je ozdravljenje gingivalnog tkiva dve nedelje nakon tretmana. Nalazi Cimasoni i sar. (1983) pokazali su porast zapremine gingivalne tečnosti srazmerno povećanju vrednosti gingivalnog indeksa. Feng i sar. (2006) su dokazali da vrednosti citokina kao indikatora inflamacije ostaju povećane četiri nedelja nakon retrakcione procedure, što govori u prilog činjenici da je oštećenje tkiva možda i veće no što se u literaturi navodi. Sun i sar. (2008) su našli da je stepen inflamacije gingivalnog tkiva najveći nakon retrakcije adrenalinom merenjem nivoa aspartat aminotransferaze u gingivalnoj tečnosti. S obzirom da je porast proinformatornih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF- α) povezan sa razvojem parodontalnih oboljenja, komparativna analiza kliničkog dejstva različitih RS i alternativnog tetrahidrozolina mogla bi biti tema budućih istraživanja u cilju iznalaženja optimalnog materijala i retrakcione procedure (Gamonal 2002).

Ispitivanja efekata tetrahidrozolona na *in vitro* i *in vivo* eksperimentalnim modelima mogu poslužiti kao fundament budućih kliničkih istraživanja koja će simpatomimetičke vazokonstriktore predložiti kao optimalno sredstvo za retrakciju gingive.

8. ZAKLJUČCI

1. Citotoksičnost sredstva za retrakciju gingive zavisi od njihove koncentracije i trajanja dejstva.
2. Rastvori sredstava za retrakciju gingive na bazi aluminijum hlorida u koncentraciji od 25% i 50% su pokazali statistički značajan citotoksičan efekat već pri trominutnom dejstvu.
3. Sredstva za retrakciju gingive na bazi aluminijum hlorida imaju prolongirano dejstvo i negativno utiču na jednodnevni oporavak ćelijske kulture.
4. U *in vitro* uslovima rastvori tetrahidrozolina pokazali su se netoksičnim u nižim, odnosno blago do umereno toksičnim u višim koncentracijama, a samim tim i biološki prihvatljivijim od komercijalno dostupnih retrakcionih sredstava.
5. Aplikacija retrakcionih sredstava na bazi aluminijum hlorida i adrenalina u gingivalni sulkus kunića dovodi do akutne inflamatorne reakcije čiji se intenzitet vremenom smanjuje. Oporavak tkiva uočen je nakon tidesetodnevnog opservacionog perioda.
6. Upotreba tetrahidrozolina izaziva blago reverzibilno oštećenje gingivalnog tkiva kunića, sa potpunim ozdravljenjem nakon sedam dana od aplikacije.
7. Preparat na bazi tetrahidrozolina pokazao je veći stepen biokompatibilnosti u uslovima *in vitro* i *in vivo*, što ga preporučuje za upotrebu u svakodnevnoj stomatološkoj praksi.
8. U cilju prevencije oštećenja gingivalnog tkiva neophodno je smanjenje koncentracije upotrebljenog sredstva za retrakciju gingive ispiranjem gingivalnog sulkusa, smanjenje trajanja retrakcione procedure ispod šest minuta, kao i kontrolisano brušenje zuba sa što manjim oštećenjem tkiva.

9. LITERATURA

1. Abadzjev M. Comparative research of the subgingival impression quality by fixed prosthesis using one and double cord retraction technique. *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers) 2009*, book 2: 18-20.
2. Abdoli A, Soleimanjahi H, Tavassoti Kheiri M, Jamali A, Jamaati A. Determining influenza virus shedding at different time points in madin-darby canine kidney cell line. *Cell J 2013*; 15(2): 130-135.
3. Ackerman MB. The full coverage restoration in relation to the gingival sulcus. *Compend Contin Educ Dent 1997*; 18: 1131-1138.
4. Ahmadzadeh A, Majd NE, Chasteen J, Kaviani A, Kavooosi MA. Inflammatory response of canine gingiva to a chemical retraction agent placed at different time intervals. *Dent Res J (Isfahan)*. 2014; 11(1): 81-86.
5. Akca EA, Yildirim E, Dalkiz M, Yavuzylmaz H, Beydemir B. Effects of different retraction medicaments on gingival tissue. *Quintessence Int 2006*; 37: 53-59.
6. Al Hamad KQ, Azar WZ, Alwaeli HA, Said KN. A clinical study on the effects of cordless and conventional retraction techniques on the gingival and periodontal health. *J Clin Periodontol 2008*; 35: 1053-1058.
7. Al-Ani A, Bennani V, Chandler NP, Lyons KM, Thomson WM. New Zealand dentists' use of gingival retraction techniques for fixed prosthodontics and implants. *N Z Dent J 2010*; 106: 92-96.
8. Albaker AM. Gingival retraction - techniques and materials: a review. *Pak Oral Dental J 2010*; 30: 545-551.
9. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol 1999*; 4(1):1-6.
10. Ayna E, Mese A, Beydemir K, Akkus M, Uysal E. Comparative histopathologic study of gingival retraction methods. *Balk J Stom 2005*; 9: 107-111.
11. Ayo-Yusuf OA, Driessen DH, Botha AJ. SEM-EDX Study of prepared human dentine surfaces exposed to gingival retraction fluids. *J Dent 2005*; 33: 731-739.

12. Azzi R, Tsao TF, Carranza FA et al. Comparative study of gingival retraction methods. *J Prosthet Dent* 1983; 50: 561-565.
13. Baab DA, Oberg PA, Holloway GA. Gingival blood flow measured with laser Doppler flowmeter. *J Periodontal Res* 1986; 21: 73-85.
14. Bader JD, Bonito AJ, Shugars DA. A systemic review of cardiovascular effects of epinephrine on hypertensive dental patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93: 647-653.
15. Baharav H, Laufer B-Z, Langer Y, Cradash HS. The effect of displacement time on gingival crevice width. *Int J Prosthodont* 1997; 10: 248-253.
16. Bakopoulou A, Mourelatos D, Tsifsoglou AS, Giassin NP, Mioglou E, Garefis P. Genotoxic and cytotoxic effects of different types of dental cement on normal cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 2009; 672: 103-112.
17. Beier US, Krnewitter R, Dumfahrt H. Quality of impressions after use of the Magic FoamCord gingival retraction system--a clinical study of 269 abutment teeth. *Int J Prosthodont* 2009; 22: 143-147.
18. Benjamin SD, Colman SJ. Periodontal considerations in gingival retraction procedures. *J South Calif Dent Assoc* 1970; 38: 823-826.
19. Bennani V, Schwass D, Chandler N. Gingival retraction techniques for implants versus teeth: current status. *J Am Dent Assoc* 2008; 139: 1354-1363.
20. Benson BW, Bomberg TJ, Hutch RA, Hoffman W. Tissue displacement methods in fixed prosthodontics. *J Prosthet Dent* 1986; 55: 175-181.
21. Bohm L. Inhibition of homologous recombination repair with Pentoxifylline targets G2 cells generated by radiotherapy and induces major enhancements of the toxicity of cisplatin and melphalan given after irradiation. *Radiation Oncology* 2006, 1:12. <http://www.ro-journal.com/content/1/1/12>.
22. Borea G, Montebugnoli L, Braiato A. The effects of patients anxiety on cardiovascular stress of dentists. *Quintessence Int* 1989; 20: 853-857.
23. Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res* 2005; 84: 9-20.

24. Bowels WH, Tardy SJ, Vahadi A. Evaluation of new gingival retraction agents. *J Dent Res* 1991; 70: 1447-1449.
25. Bowley JF, Payne JB, Stockhill JW. Management of the gingival sulcus in fixed prosthodontics: a literature review and treatment protocol. *Compend Contin Educ Dent* 1998; 19: 154-162.
26. Brand HS, Abraham-Inpijn L. Cardiovascular responses induced by dental treatment. *Eur J Oral Sci* 1996; 104: 245-252.
27. Browne RM. Animal tests for biocompatibility of dental materials--relevance, advantages and limitations. *J Dent*. 1994; 22 Suppl 2:S21-24.
28. Chandra S, Chandra S, Chandra S. *Textbook of Dental and Oral Anatomy, Physiology and Occlusion*. Jaypee, New Delhi, 2007.
29. Chempesz F, Vag J, Fazekas A. In vitro kinetic study of absorbancy of retraction cords. *J Prosthet Dent* 2003; 89: 45-49.
30. Cimpan MR, Cressey LI, Skaung N, Halstensen A, Lie SA, Gjeertsen BT, Matre R. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 59-69.
31. Clarke NC, Shephard BC, Hirsch RS. The effects of intra-arterial epinephrine and nicotine on gingival circulation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981; 52: 577-582.
32. Concard HJ, Halten JR. Internalized discoloration of dentin under porcelain crowns: A clinical report. *J Prosthet Dent* 2009; 101: 153-157.
33. Cowan FF. *Dental pharmacology*. 2nd ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1992: 272-273.
34. Csillag M, Nyiri G, Vag J, Fazekas A. Dose-related effects of epinephrine on human gingival blood flow and cervicular fluid production used as a soaking solution for chemo-mechanical tissue retraction. *J Prosthet Dent* 2007; 97: 6-11.
35. Cuimasoni G. Cervicular fluid updated. *Monogr Oral Sci* 1983; 12: 1-152.
36. Čolić M. Testovi za ispitivanje biokompatibilnosti stomatoloških materijala. U: Stamenković D i sar. *Gradivni stomatološki materijali (dostignuća i perspektive)*: Stomatološki fakultet Beograd. 2007; 37-62.
37. Dahl JE, Frangou-Ployzois MJ, Ployzois GL. In vitro biocompatibility of denture relining materials. *Gerodontology* 2006; 23(1): 17-22

38. Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontol 2000* 2002; 30: 70-78.
39. de Gennaro GG, Landesman HM, Calhoun JE, Martinoff JT. A comparison of gingival inflammation to retraction cords. *J Prosthet Dent* 1982; 47: 384-386.
40. Dee KC, Puleo DA, Bizios R. Biocompatibility. U: An introduction to tissue-biomaterial interactions. Wiley-Liss 2002; 173-183
41. Donaldson M, Goodchild JH. Local and systemic effects of mechanical-chemical retraction. *Compend Contin Educ Dent* 2013; 34(Spec No)6:1-7.
42. Donovan TE, Chee WW. Current concepts in gingival displacement. *Dent Clin North Am* 2004; 48: 433-444.
43. Donovan TE, Gandara BK, Nemetz H. Review and survey of medicaments used with gingival retraction cords. *J Prosthet Dent* 1985; 53: 525-531.
44. Edgar WM. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: Report of a consensus meeting. *Br Dent J* 1990; 169: 96-98.
45. Fazekas A, Csempesz F, Csabai Z, Vag J. Effects of pre-soaked retraction cords on the microcirculation of the human gingival margin. *Oper Dent* 2002; 27(4): 343-348.
46. Felpel LP. A review of pharmacotherapeutics for prosthetic dentistry: Part I. *J Prosthet Dent* 1997; 77: 285-292.
47. Fenesy KE. Periodontal disease: an overview for physicians. *Mt Sinai J Med* 1998; 362-369.
48. Feng J, Aboyousssef H, Weiner S, Singh S, Jandinski J. The effect of gingival retraction procedures on periodontal indices and cervicular fluid cytokine levels: A pilot study. *J Prosthodont* 2006; 15: 108-112.
49. Feng YZ, Zeng XH. The retractive effects of different gingival retraction agents. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2011; 29: 53 (Abstract).
50. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, et al. Levels of interleukin 1-beta, 8 and 10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol* 2000; 71: 1535-1545.
51. Gargiulo AW, Wentz FM, Orban B. Dimensions and relations of dentogingival junction in humans. *J Periodontol* 1961; 32: 262-267.

52. Gillett IR, Johnson NW, Curtis MA, Griffiths GS, Sterne JAC, Carman RJ, Bampton JLM, Wilton JMA. The role of histopathology in the diagnosis and prognosis of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 673-684.
53. Glick M. New guidelines for prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure. *J Am Dent Assoc* 1998; 129: 1588-1594.
54. Goldberg PV, Higginbottom FL, Wilson TG. Periodontal considerations in restorative and implant therapy. *Periodontology* 2000 2001; 25: 100-109.
55. Gough JE, Downes S. Osteoblast cell death on methacrylate polymers involves apoptosis. *Int J Biomed Mater Res* 2001; 57: 497-505
56. Goulet JP, Perusse R, Turcotte JY. Contraindications to vasoconstrictors in dentistry: Patr III. Pharmacologic interactions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 74: 692-697.
57. Greenberg SB, Harris D, Giles P, Martin RR, Wallace RJ. Inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth in McCoy, HeLa, and Human Prostate Cells by Zinc. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 953-957.
58. Hamalian TA, Nasr E, Chidaic JJ. Impression materials in fixed prosthodontics: Influence of choice in clinical procedure. *J Prosthodont* 2011; 20:153-160.
59. Hanks CT, Watacha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: A review. *Dent Mater* 1996; 12: 186-193.
60. Hansen PA, Tira DA, Barlow J. Current methods of finish-line exposure by practicing prosthodontist. *J Prosthodont* 1999; 8: 163-170.
61. Harris R. Gingival retraction. *Aust Dent J* 1978; 24: 359-360.
62. Harrison JD. Effect of retraction materials on the gingival sulcus epithelium. *J Prosthet Dent* 1961; 11: 514-521.
63. Hatch CL, Chernow B, Terezhalmay GT, Ness MV, Hall-Boyer K, Lake R. Plasma catecholamine and hemodynamic responses to the placement of epinephrine-impregnated gingival retraction cord. *Oral Surg* 1984; 58: 540-544.
64. Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust Dent J*. 2009; 54 (Suppl 1): S11-26.

65. Hilley MD, Milam SB, Giescke AH Jr, Giovanniti JA. Fatality associated with the combined use of halotane and gingival retraction cord. *Anesthesiology* 1984; 60: 587-588.
66. Huang FM, Tai KW, Hu CC, Chang YC. Citotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro. *Int J Prosthodont* 2001; 14: 439-443.
67. Igraham R, Saghat P, Hansing FJ. Rotary gingival curettage-A technique for tooth preparation and management of the gingival sulcus for impression taking. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1981; 1: 9-33.
68. International Standards Organization (1994) ISO 10993. Biological evaluation of medical devices, Geneva, Switzerland.
69. International Standards Organization (1994) ISO/DIS 7405. Dentistry: preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry: test methods (revision of ISO/TR 7405), Geneva, Switzerland.
70. Jokstad A. Clinical trial of gingival retraction cords. *J Prosthet Dent* 1999; 81: 258-261.
71. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ: Citotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont* 2004; 17: 340-344.
72. Jurisic V, Bumbasirevic V, In vitro assays for cell determination. *Acta Oncol* 2008; 16: 49-54.
73. Kaufman E. The new classification system of periodontal diseases and conditions. *Dent Today* 2001; 20(9): 102-105.
74. Kavar N, Gajendrareddy PK, Hart TC, Nouneh R, Maniar N, Alrayyes S. Periodontal disease for the primary care physician. *Dis Mon* 2011; 57(4): 174-183.
75. Kellam SA, Smith JR, Scheffel SJ. Epinephrine absorption from commercial gingival retraction cords in clinical patients. *J Prosthet Dent* 1992; 68: 761-765.
76. Kesić L, Petrović D, Obradović R, Gasić J, Todorović K. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Med Pregl* 2009; 62(11-12): 534-538.
77. Klinge B, Matsson L, Attstrom R. Histopathology of initial gingivitis in humans. *J Clin Periodontol* 1983; 10: 364-369.

78. Kopač I, Batista U, Cvetko E, Marion L. Viability of fibroblasts in cell culture after treatment with different chemical retraction agents. *J Oral Rehabilitation* 2002; 29: 98-104.
79. Kopač I, Cvetko E, Marion L. Gingival inflammatory response induced by chemical retraction agents in beagle dogs. *Int J Prosthodont* 2002; 15: 14-19.
80. Kopač I, Cvetko E, Pavlica Z, Marion L. Gingival tissue inflammatory response following treatment with chemical retraction agents in beagle dogs. *Pflugers Arch* 2001; 442: R 145-146.
81. Kopač I, Strele M, Marion Lj. Electron microscopic analysis of the effects of chemical retraction agents on cultured rat keratinocytes. *J Prosthet Dent* 2002; 51-56.
82. Kostić I, Najman S, Kostić M, Stojanović S. Comparative review of gingival retraction agents. *Acta Medica Medianae* 2012; 51(1): 81-84.
83. Kostić M, Krunić N, Najman S. Savremeni aspekti ispitivanja biokompatibilnosti materijala u stomatologiji. *Acta Stomatol Naissi* 2010; 26 (62): 1007-1016.
84. Kostić M, Najman S, Najdanović J, Krunić N, Kostić I. Application of direct contact test in evaluation of cytotoxicity of acrylic denture base resins. *Acta Medica Medianae* 2012; 51(1): 66-72.
85. Kuburović G, Danilović V. *Histologija i embriologija usne duplje*. Stomatološki fakultet Beograd, 2003.
86. Kumbuloglu O, User A, Toksavul S, Boyacioglu H. Clinical evaluation of different gingival retraction cords. *Quintessence Int* 2007; 38: 92-98.
87. Lačković V, Nikolić I, Todorović V. *Osnovna i oralna histologija i embriologija*. Data Status, Beograd, 2012.
88. Lamster IB. Current concepts and future trends for periodontal disease and periodontal therapy, Part 2: Classification, diagnosis, and nonsurgical and surgical therapy. *Dent Today* 2001; 20(3): 86-91.
89. Land MF, Rosenstiel SF, Sandrik JL. Disturbance of dentinal smear layer by acidic hemostatic agents. *J Prosthet Dent* 1994; 72: 4-7.
90. Laufer BZ, Baharav H, Langer Y, Cardash HS. The closure of the gingival crevice following gingival retraction for impression making. *J Oral Rehab* 1997; 24: 629-635.

91. Lefebvre CA, Schuster GS. Biocompatibility of visible light-cured resin systems in prosthodontics. *J Prosthet Dent* 1994; 71: 178-185.
92. Lev R, Clark FR. Visine overdose: Case report of an adult with hemodynamic compromise. *J Emer Med* 1995; 13: 649-652.
93. CM, Huang FM, Yang LC, Chou LSS, Chou MY. Cytotoxic effects of gingival retraction cords on human gingival fibroblasts in vitro. *J Oral Rehabilitation* 2004; 31: 368-372.
94. Liu J, Zhang XM, Hao PJ, Hui M, Yu Hy. Comparison of cytotoxicity between chemical retraction agents on human gingival fibroblasts in vitro. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2009; 27: 202 (Abstract)
95. Lodetti G, D'Abrosca F, Fontana P. Set up of in vitro methods to detect the safety of astringent liquids. *Minerva Stomatol* 2004; 53: 361-367.
96. Loe H, Silness J. Tissue reactions to string packs used in fixed restorations. *J Prosthet Dent* 1963; 13: 318-322.
97. Lygre H. Prosthodontic biomaterials and adverse reactions: a critical review of the clinical and research literature. *Acta Odontol Scand* 2002; 60: 1-9.
98. Madrid C, Courtois B, Vinneau M. Recommendations to use vasoconstrictors in dentistry and oral surgery. *Med Bucc Chir Bucc* 2003; 9: 1-30.
99. Manolakis A, Bartsch N, Hahn P. Clinical comparison of a gingival retraction paste and impregnated cords. *J Dent Res* 2004; 83 (Special Issue)
100. Marković D. Ispitivanje biokompatibilnosti glas-jonomer cementa-test citotoksičnosti. *Stom Slas S* 2002; 49: 75-80.
101. Marković D. Ispitivanje biokompatibilnosti svetlosno polimerizujućih glas-jonomer cemenata. Doktorska disertacija. Beograd 1998.
102. Matheny JL, Abrams H, Johnson DT, Roth GI. Microcirculatory dynamics in experimental human gingivitis. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 578-583.
103. Moghadasali R, Mutsaers HAM, Azarnia M, Aghdami N, Baharvand H, Torensma R, Wilmer MJG, Masereeuw R. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates regeneration of human renal proximal tubule epithelial cells after gentamicin toxicity. *Exp Toxicol Pathol* 2013; 65: 595– 600.

104. Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R. Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials* 2009; 2: 514-548.
105. Mosmann T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
106. Munoz RJ. The cardiovascular effects of anxiety and R-epinephrine retraction cord in routine fixed prosthodontic procedures. *J Calif Dent Assoc* 1970; 46: 10-13.
107. Murray PE, Godoy CG, Godoy FG. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Cir Bucal* 2007; 12: 258-266.
108. Muzyka BC, Glick M. The hypertensive dental patient. *J Am Dent Assoc* 1997; 128: 1109-1120.
109. Nagler RM, Klein I, Zarzhewsky N, Drigues N, Reznick A. Characterization of the different antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 268-277.
110. Nakamura M., Kawahara H. Long-term biocompatibility test of denture base resins in vitro. *J Prosthet Dent* 1984; 52: 694-698.
111. Nemetz EH, Seibly W. The use of chemical agents in gingival retraction. *Gen Dent* 1990; 38: 104-108.
112. Nemetz H, Donovan T, Landesman H. Exposing the gingival margin: A systematic approach for the control of hemorrhage. *J Prosthet Dent* 1984; 51: 647-651.
113. Nowakowska D, Panek H, Nowakowska M, Nowakowska A. Gingival retraction-survey results of Polish dentists. Part 1. Method, materials and chemical retraction preferences. *Protet Stomatol* 2006; 56: 352-360.
114. Nowakowska D, Panek H, Nowakowska M, Nowakowska A. Gingival retraction-survey results of Polish dentists. Part 2. Clinical habits related to retraction procedures. *Protet Stomatol* 2006; 56: 361-366.
115. Nowakowska D, Panek H. Classification of retraction materials in the aspect of biocompatibility with gingival sulcus environment. *Pol J Environ Stud* 2007; 16: 204-208.
116. Nowakowska D, Saczko J, Kulbacka J, Choromanska A. Dynamic oxidoreductive potential of astringent retraction agents. *Folia Biol (Praha)* 2010; 56: 263-268.

117. Nowakowska D, Saczko J, Kulbacka J, Choromanska A, Raszewski Z. Cytotoxic potential of vasoconstrictor experimental gingival retraction agents-in vitro study on primary human gingival fibroblasts. *Folia Biologica (Praha)* 2012; 58: 37-43.
118. Nowakowska D, Saczko J, Biezuńska-Kusiak K, Choromańska A, Dubińska-Magiera M, Ziętek M, Kulbacka J. The influence of retraction agents on cytoskeleton reorganization and oxidative stress in primary human gingival fibroblasts (HGFs). *Arch Oral Biol* 2014; 59: 341-348.
119. Obradović-Đuričić K, Kotić Lj, Martinović Ž. Gingivalni i dentalni parametric u proceni estetskih obeležja fiksnih nadoknada (I deo). *Srp Arh Celok Lek* 2005; 133: 180-187.
120. Oortgiesen DAW, Meijer GJ, Bronckers ALJJ, Walboomers XF, Jansen JA. Fenestration defects in the rabbit jaw: an inadequate model for studying periodontal regeneration. *Tissue Engineering C* 2010;16: 133–140.
121. Orlov S, Kojović D, Mirković B, Kesić Lj, Petrović D, Pešić Z. *Oralna medicina, dopunjeno izdanje*. Europrint, 2007.
122. Oz HS, Puelo DA. Animals models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:754857. doi: 10.1155/2011/754857. Epub 2011 Feb 10.
123. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology* 2000 1997; 14: 216-248.
124. Page RC, Schoeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease: A summary of current work. *Lab Invest* 1976; 34: 235-243.
125. Page RC. Gingivitis. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 345-355.
126. Patino-Marin N, Martinez F, Loyola-Rodriguez JP, Tenorio-Govea E, Brito-Orta MD. A novel procedure evaluating gingival perfusion status using laser- Doppler flowmeter. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 231-237.
127. Pelzner RB, Kempler D, Stark MM, Lum LB, Nicholson RJ, Soelberg KB. Human blood pressure and pulse rate response to racemic epinephrine retraction cord. *J Prosthet Dent* 1978; 39(3): 287-292.

128. Pergola SG, Raskin RB. Gingival retraction procedures. *NY State Dent J* 1983; 49: 662-667.
129. Pescatore C. A predictable gingival retraction system. *Compend Contin Educ Dent* 2002; 23(1 Suppl): 7-12.
130. Phatale S, Marawar PP, Byakod G, Lagdive SB, Kalburge JV. Effect of retraction materials on gingival health: A histopathological study. *J Indian Soc Periodontol.* 2010; 14: 35-39.
131. Polat NT, Ozdemir AK, Turgut M. Effects of gingival retraction materials on gingival blood flow. *Int J Prosthodont* 2007; 20: 57-62.
132. Polyzois GL. In vitro evaluation of dental materials. *Clin Mater* 1994; 16: 21-60.
133. Poss S. An innovative tissue - retraction material. *Compend Contin Educ Dent* 2002; 23: 13-17.
134. Prasad KD, Hegde C, Agrawal G, Shetty M. Gingival displacement in prosthodontics: A critical review of existing methods. *J Interdiscip Dentistry* 2011; 1: 80-86.
135. Prasanna GS, Reddy K, Kumar RK, Shivaprakash S. Evaluation of efficacy of different gingival displacement materials on gingival sulcus width. *J Contemp Dent Pract* 2013; 14(2): 217-221.
136. Radlović-Pantelić S. Stomatološka protetika fiksne nadoknade II deo. Beograd. Zavod za grafičku tehniku Tehnološko-metalurškog fakulteta, 1998.
137. Raković D, Uskoković D i sar. Biomaterijali. Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti, Beograd 2010.
138. Ranney RR. Classification of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 1993; 2: 13-25.
139. Reiman MB. Exposure of subgingival margins by nonsurgical gingival displacement. *J Prosthet Dent* 1976; 36: 649-654.
140. Robinson PJ. Gingivitis: a prelude to periodontitis? *J Clin Dent* 1995; 6: 41-45.
141. Rubel BS. Impression materials: a comparative review of impression materials most commonly used in restorative dentistry. *Dent Clin North Am* 2007; 51: 629-646.
142. Ruel J, Schuessleb PJ, Malament et al. Effect of retraction procedures on periodontium in humans. *J Prosthet Dent* 1980; 44: 508-515.

143. Sanders AE, Slade GD, Fitzsimmons TR, Bartold PM. Physical activity, inflammatory biomarkers in gingival crevicular fluid and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009; 36(5): 388-395.
144. Schmaiz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials- advantages and limitations. *J Dent Suppl* 1994; 22: S6-S11.
145. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Invest* 1997; 1: 154-162.
146. Schou S, Holmstrup P, Kornman KS. Non-human primates used in studies of periodontal disease pathogenesis: a review of the literature. *J Periodontol* 1993; 497-508.
147. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000* 1997; 13: 91-120.
148. Scweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci* 1996; 104: 292-299.
149. Seitz C, Frensing T, Höper D, Kochs G, Reichl U. High yields of influenza A virus in Madin-Darby canine kidney cells are promoted by an insufficient interferon-induced antiviral state. *J Gen Virol* 2010; 91: 1754-1763.
150. Seneviratne CJ, Zhang CF, Samaranayake LP. Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res* 2011; 14(2): 87-94.
151. Shannon A. Expanded clinical uses of a novel tissue-retraction material. *Compend Contin Educ Dent* 2002; 23(1 Suppl): 3-6.
152. Shaw DH, Krejci RF, Cohan DM. Retraction cords with aluminium chloride: effect on the gingival. *Oper Dent* 1980; 5: 138-141.
153. Shillitoe EJ, Pellenz C. Factors That Limit the Effectiveness of Herpes Simplex Virus Type 1 for Treatment of Oral Cancer in Mice *Clin Cancer Res* 2005; 11(8) : 3109-3116.
154. St John KR. Biocompatibility of dental materials. *Dent Clin North Am* 2007; 51(3): 747-760.
155. Stallcup K, Dawson A, Mescher M. Growth-inhibitory activity of lymphoid cells plasma membranes. I. Inhibition of lymphocyte and limfoid tumor cell growth. *J Cell Biol* 1984; 99: 1221-1226.

156. Sun XW, Sun GL, Xiao LJ. Evaluation of gingival inflammation related to different retraction agents. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2008; 26: 53. (Abstract)
157. Tang ATH, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Citotoxicity tests of in situ polymerized resins: Methodological comparisons and introduction of tissue culture insert as a testing device. *Int Biomed Mater Res* 1999; 45: 214-222
158. Tardy SJ, Bowles WH, Chambless IA. Clinical evaluation of visine as gingival retraction agent. *J Dent Res* 1990; 69: 250-254.
159. Tarighi P, Khoroushi M. A review on common chemical hemostatic agents in restorative dentistry. *Dent Res J (Isfahan)* 2014; 11(4): 423-428.
160. Taylor AC, Campbell MM. Reattachment of gingival epithelium to the tooth. *J Periodontal* 1972; 43: 281-293.
161. Thomas MS, Joseph RM, Parolia A. Nonsurgical gingival displacement in restorative dentistry. *Compend Contin Educ Dent* 2011; 32(5): 26-34.
162. Tosches NA, Salvi GE. Gingival retraction methods. A literature review. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2009; 119: 121-138.
163. Trifunović D, Vujošević Lj. *Stomatološka protetika fiksne nadoknade*. Beograd, Evropski centar za mir i razvoj, 1998.
164. Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N: Leaching and citotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resins denture base materials. *J Prosthet Dent* 1994; 71: 618-624.
165. Tupac RG, Neacy K. A comparison of cord gingival displacement with gingival technique. *J Prosthet Dent* 1981; 46: 509.
166. Uhač I. Prikazivanje granice preparacije pastom za gingivalnu retrakciju. *Medix* 2004; 53: 139-140.
167. Uitto VJ. Gingival crevice fluid-an introduction. *Periodontol* 2003; 31: 9-11.
168. Vega-Avila E, Puqsley MK. An overview of colorimetric assay used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol.* 2011; 54: 10-14.
169. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000; 243: 167-190.

170. Wassell RW, Barker D, Walls AW. Crowns and other extracoronal restorations: impression materials and technique. *Br Dent J* 2002; 192: 679-684, 687-690.
171. Watacha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent* 2001; 86: 203-209.
172. Wataha JC, Lockwood PE, Bouillaguet S, Noda M. In vitro biological response to core and flow able dental restorative materials. *Dent Mater* 2003; 19(1): 25-31.
173. Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 335-340.
174. Weinmann SB, Geron PR. A chronological classification of periodontal disease: a review. *J Int Acad Periodontol*. 2011; 13(2): 31-39.
175. Weir DJ, Williams BH. Clinical effectiveness of mechanical-chemical tissue displacement methods. *J Prosthet Dent* 1984; 51: 326-329.
176. Williams DF. *Definitions in biomaterials*. Elsevier: Oxford, UK, 1987.
177. Woody RD, Miller A, Staffanou RS. Review of the pH of haemostatic agents use in tissue displacement. *J Prosthet Dent* 1993; 70: 191-192.
178. Wostmann B, Haderlein D, Balkehhol M, Ferger P. Influence of different retraction technique on sulcus exudates flow. *J Dent Res* 2004; 83 (Special Issue)
179. Wostmann B, Rehmann P, Balkenhol M. Influence of different retraction techniques on cervicular fluid flow. *Int J Prosthodont* 2008; 21: 215-216.
180. Wostmann B, Rehmann P, Trost D, Balkenhol M. Effect of different retraction and impression technique on the marginal fit of crowns. *J Dent* 2008; 36: 508-512.
181. Woycheshin FF. An evaluation of the drugs used for gingival retraction. *J Prosthet Dent* 1964; 14: 769-776.
182. Xhonga FA. Gingival retraction techniques and their healing effect on the gingival. *J Prosthet Dent* 1971; 26: 640-648.
183. Xie X, Wang SS, Wong TCW Fung MC. Genistein promotes cell death of ethanol-stressed HeLa cells through the continuation of apoptosis or secondary necrosis. *Cancer Cell International* 2013, 13:63. <http://www.cancerci.com/content/13/1/63>.

184. Yagiela JA. Adverse drug interactions in dental practice: interactions associated with vasoconstrictors. Part V of a series. *J Am Dent Assoc* 1999; 130: 701-709.
185. Zappa U. Histology of periodontal lesion: implications for diagnosis. *Periodontology* 2000 1995; 7: 22-38.
186. Zelić O. Parodontologija. Dečje novine, Beograd, 2006.
187. Živković S, Konjević G, Ivanović V, Spužić I. Ispitivanje citotoksičnosti dentin-adhezivnih sistema in vitro. 1997; 44: 67-71.
188. Živković S. Biokompatibilnost i fizičko-hemijske karakteristike dentin adhezivnih sistema. Doktorska disertacija. Beograd, 1995.
189. Zmener O. Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: Preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod* 2004; 30: 348-351.

BIOGRAFIJA

Ivan Kostić je rođen 30.10.1975. godine u Nišu. Osnovnu i srednju školu završio je u Nišu sa odličnim uspehom. Na Medicinskom fakultetu u Nišu, odsek stomatologija, diplomirao je 18.07.2001. sa prosečnom ocenom 8,95. Tokom studija učestvovao je sa radovima na kongresima studenata medicine i stomatologije. Obavio je obavezan lekarski staž na Klinici za stomatologiju u Nišu i položio stručni ispit. Trenutno je zapošljen u farmaceutskoj kompaniji Merck d.o.o. Beograd, na mestu rukovodioca stručnih saradnika.

Akadske doktorske studije iz oblasti bazična stomatologija upisao je školske 2008/2009 godine na Medicinskom fakultetu u Nišu. Uspešno je savladao nastavni plan i program i položio je sve predviđene ispite. Aktivno je učestvovao u izradi većeg broja naučno istraživačkih radova štampanih u vodećim nacionalnim i inostranim časopisima i saopštenih na stručnim i naučnim skupovima.



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

ЕФЕКТИ ПРИМЕНЕ СРЕДСТАВА ЗА РЕТРАКЦИЈУ ГИНГИВЕ

НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни 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, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 23. 01. 2015.

Аутор дисертације: Иван М. Костић

Потпис докторанда:



Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: Иван М. Костић
Студијски програм: ДАС – Базична стоматологија
Наслов рада: ЕФЕКТИ ПРИМЕНЕ СРЕДСТАВА ЗА РЕТРАКЦИЈУ ГИНГИВЕ
НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА
Ментор: проф. др Стево Најман

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 23. 01. 2015.

Аутор дисертације: Иван М. Костић

Потпис докторанда:



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ЕФЕКТИ ПРИМЕНЕ СРЕДСТАВА ЗА РЕТРАКЦИЈУ ГИНГИВЕ

НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити 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 подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 23. 01. 2015.

Аутор дисертације: Иван М. Костић

Потпис докторанда:
