



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI

MEDICINSKI FAKULTET

**IRENA KUZMANOVIĆ RADMAN**

**UTICAJ OLOVA NA DISTRIBUCIJU MEDIJATORA  
ODONTOGENEZE U DIJABETESOM IZMIJENJENOJ PULPI  
ZUBA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

BANJA LUKA, 2017.



UNIVERSITY OF BANJA LUKA

FACULTY OF MEDICINE

**IRENA KUZMANOVIĆ RADMAN**

**THE IMPACT OF LEAD ON THE DISTRIBUTION OF  
MEDIATORS OF ODONTOGENESIS IN THE TEETH PULP  
AMENDED BY DIABETES**

DOCTORAL DISSERTATION

BANJA LUKA, 2017.

Mentor: profesor Slavoljub Živković, redovni profesor, Stomatološki fakultet Beograd;

## UTICAJ OLOVA NA DISTRIBUCIJU MEDIJATORA ODONTOGENEZE U DIJABETESOM IZMIJENJENOJ PULPI ZUBA

Rezime: Izloženost olovu u životnoj sredini se danas smatra glavnom zdravstvenom temom jer je to jedan od najštetnijih toksina, uključujući anemiju, hipertenziju, patologiju kostiju i zuba podrazumjevajući i karijes tvrdih zubnih tkiva. Čvrsta tkiva zuba se razlikuju po svojim ograničenim sposobnostima da oslobađaju akumulisane elemente u sistemske tečnosti, pa zato predstavljaju idealne strukture za procjenu dugoročnih efekata izlaganja toksičnim metalima. Cilj ovog rada je bio da se ispita koncentracija olova u tvrdim zubnim tkivima i uticaj olova na medijatore odontogeneze u pulpi eksperimentalnih životinja. Istraživanje je sprovedeno na 42 laboratorijska pacova Wistar soja (odnosno 682 molara i premolara). Radi proučavanja uticaja olova na distribuciju medijatora dentinogeneze u pulpi zuba pacova, vršena je intoksikacija adultnih pacova oovo-acetatom u koncentraciji od 1500 ppm putem vode *ad libitum* i takođe im je indukovana diabetes mellitus-Alloxan. Za izvođenje ovog dijela eksperimentalne studije korišteni su vivarium Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci. Dio uzoraka zuba pacova je odnesen u laboratoriju Zavoda za kliničku patologiju UKCRS na imunohistohemijsku analizu, a drugi dio uzoraka na skening elektronsku mikroskopiju (SEM) u Univerzitetskom centru za skenirajuću elektronsku mikroskopiju u Novom Sadu. Skenirajućom elektronskom mikroskopijom dobijene su fotomikrografije uzdužnih presjeka zuba, a SEM-EDS metodom je određen maseni udio olova i ostalih elemenata koji su detektovani u zubu. Imunohistohemijskom analizom je utvrđena ekspresija fibronektina, tenascina-c i TGF- $\beta$ 1. Takođe su uočene značajne morfološke promjene, učestalosti pulpitisa, krvarenja u pulpi, pseudoepitelne hiperplazije periodontitisa i gingivitisa između ispitivanih grupa.

Ključne riječi: oovo, dentinogeneza, medijatori odontogeneze, fibronektin, tenascin-C, fibronektin, TGF- $\beta$ 1

Naučna oblast: Bolesti zuba

Naučno polje: Stomatologija

Klasifikaciona oznaka prema Cerif šifrarniku za naučnu oblast B 730

Tip odabrane licence Kreativne zajednice: Autorstvo-nekomercijalno-bez prerada (CC BY-NC-ND)

Mentor: Professor Slavoljub Živković, full professor, Faculty of Dentistry, Belgrade

## THE IMPACT OF LEAD ON THE DISTRIBUTION OF MEDIATORS OF ODONTOGENESIS IN THE TEETH PULP AMENDED BY DIABETES

**Summary:** Exposure to lead in the physical and social environment is now considered to be the main medical topic because it is one of the most harmful toxins that may lead to anemia, hypertension, and bone and tooth pathology including the caries of hard dental tissues. Hard dental tissues are distinguished by their limited ability to release accumulated elements into the system liquids and therefore represent the ideal structure for assessing the long-term effects of the exposure to toxic metals. The aim of this study was to examine the levels of lead in hard dental tissues and the impact of lead on the mediators of odontogenesis in the pulp of experimental animals. The research was conducted on 42 laboratory rats – Wistar rats (respectively 682 molars and premolars). For the purpose of studying the impact of lead on the distribution of mediators in dentinogenesis of the dental pulp in rats, intoxication of adult rats was conducted by using lead-acetate (concentration of 1500 ppm) and water ad libitum. Alloxan was used to induce diabetes mellitus in rats. To perform this part of the experimental studies, a vivarium from the Faculty of Natural Sciences and Mathematics of the University of Banja Luka was used. Part of teeth samples of rats was taken to a laboratory of the Institute of Pathology of the UCCRS for immunohistochemical analysis and the other part of samples was taken to a scanning electron microscopy (SEM) in the University Centre for Scanning Electron Microscopy in Novi Sad. Microphotographs of longitudinal sections of teeth were obtained by using Scanning Electron Microscopy and the mass percentage of lead and other elements detected in the tooth were determined by using SEM/EDS method. Immunohistochemical analysis determined expression of fibronectin, tenascin-C and TGF- $\beta$ 1. Also, significant morphological changes, the frequency of pulpitis, pulp bleeding, pseudo epithelial hyperplasia, periodontitis and gingivitis were noticed among the examined groups.

**Keywords:** Lead, Dentinogenesis, Mediators of Odontogenesis, Fibronectin, Tenascin-C, TGF- $\beta$ 1

**Scientific field:** Dental diseases

**Research field:** Dentistry Classification CERIF mark: B001

**Type of Creative Commons license:** Authorship – noncommercial (CC BY-NC)

## **ZAHVALNICA**

Zahvaljujem se svom mentoru, prof. dr Slavoljubu Živkoviću na ukazanom povjerenju, izboru teme, nesebičnoj pomoći tokom rada i razumijevanju koji je svojom stručnošću, savjetima i znanjem pomogao realizaciji ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svom suprugu Srđanu, svojoj djeci Mateju i Iris, svojoj majci Vesni i ocu Zvonimiru, kao i mojim prijateljima koji su mi bili velika podrška prilikom izrade ove disertacije. Hvala što ste uvijek tu uz mene.

Irena Kuzmanović Radman

# SADRŽAJ

1.UVOD .....	1
1.1. PREGLED LITERATURE .....	2
1.1.1. ODONTOGENEZA-REPARATIVNA I REAKTIVNA DENTINOGENEZA .....	3
1.1.1.1. REPARATIVNA DENTINOGENEZA.....	5
1.1.1.2. REAKTIVNA DENTINOGENEZA .....	6
1.1.1.3. PULPODENTINSKI KOMPLEKS .....	7
1.1.1.4. MEDIJATORI DENTINOGENEZE .....	9
1.1.1.4.1. TRANSFORMIŠUĆI FAKTOR RASTA (TGF- $\beta$ 1) I NJEGOVA ULOGA U DENTINOGENEZI .....	10
1.1.1.4.2. FIBRONEKTIN I NJEGOVA ULOGA U DENTINOGENEZI.....	14
1.1.1.4.3. TENASCIN-C I NJEGOVA ULOGA U DENTINOGENEZI.....	18
1.1.2. UTICAJ DIJABETES MELLITUS-A (DM) NA STANJE USTA I ZUBA.....	21
1.1.3. UTICAJ NA DENTINOGENEZU.....	22
1.1.4. UTICAJ OLOVA NA LJUDSKI ORGANIZAM I NJEGOVA TOKSIČNOST .....	23
1.1.4.1. APSORPCIJA I DISTRIBUCIJA OLOVA U ORGANIZMU .....	25
1.1.4.2. OLOVO I ŽIVOTNA SREDINA .....	25
1.1.4.3. UTICAJ OLOVA NA KOSTI I ZUBE .....	26
1.1.4.3.1.UTICAJ OLOVA NA GLEĐ I DENTIN ZUBA .....	27
1.1.4.4. UTICAJ OLOVA NA PULPU ZUBA I NASTANAK KARIJESA .....	30
1.1.4.5. ZNAČAJ OLOVA KAO BIOMARKERA ZA STEPEN IZLOŽENOSTI ORGANIZMA OLOVU .....	33
2. HIPOTEZA .....	36
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	37
4. MATERIJAL I METOD RADA .....	38
4.1.Uzorak .....	38
4.1.1. Uzgoj i držanje eksperimentalnih jedinki .....	38
4.1.2. Eksperimentalne grupe.....	39

4.2. Primijenjeni protokol za eksperimentalno indukovani Diabetes mellitus-Alloxan: .....	39
4.3. Protokol za intoksikaciju olovom.....	40
4.4. Histološka analiza .....	40
4.5. Imunohistohemijska analiza.....	40
4.6. Procjena ekspresije fibronektina, tenascina-C i TGF-a.....	42
4.7. SEM-EDS analiza .....	44
4.8. Statistička obrada podataka .....	45
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA .....	46
5.1. Rezultati analize histoloških preparata pulpe zuba pacova.....	46
5.1.1. Rezultati imunohistohemijske analize zuba pacova sa dijabetesom koji su dobijali olovo-acetat 14 i 30 dana.....	46
5.1.2. Rezultati imunohistohemijske analize zuba pacova (kontrolna grupa)- prikazi histoloških preparata.....	59
5.2. Rezultati SEM/EDS analize .....	62
6. DISKUSIJA .....	73
6.1. Diskusija rezultata imunohistohemijske analize .....	73
6.1.1. Diskusija ekspresije fibronektina u procesu odontogeneze .....	74
6.1.2. Diskusija ekspresija TGF- $\beta$ 1 u procesu odontogeneze.....	77
6.1.3. Diskusija ekspresije tenascina-C u procesu odontogeneze .....	79
6.2. Diskusija rezultata SEM-EDS analize.....	82
7. ZAKLJUČAK .....	88
8. LITERATURA .....	89

## **1. UVOD**

Čvrsta zubna tkiva se sastoje od nekoliko različitih minerala koji sa kalcijumom predstavljaju glavni makro-mineral. Fiziološki važni minerali kao i neki toksični metali se tokom vremena mogu akumulirati u kalcifikovanim tkivima (zubu i kostima). Čvrsta tkiva zuba zbog ograničenih mogućnosti oslobađanja ovih akumulisanih elementa. Zato predstavljaju idealna tkiva za procjenu dugoročnih efekata izlaganja organizma toksičnim metalima. Jedan od takvih toksičnih teških metala je olovo, koje se vezuje za zub, ali i ostaje u dinamičnom balansu sa normalnim sastavom zubne supstance [1-3].

Izloženost olovu je danas značajan zdravstveni problem u mnogim zemljama, obzirom da je to jedan od najštetnijih toksina u životnoj sredini. Izlaganje olovu je povezano sa uticajem na opšte zdravlje (anemija, hipertenzija) odnosno na patologiju kostiju i zuba, uključujući prije svega karijes zuba [4-6].

Iako su nivoi olova u tvrdim zubnim tkivima korisni pokazatelji izloženosti olovu, informacije o njegovom vremenskom djelovanju i jedinjenjima olova u tkivima zuba su vrlo ograničena [7].

U nekim studijama se došlo do rezultata da uticaj olova na zube u razvoju (nicanju) ne mora biti povezan samo sa citotoksičnim djelovanjima olova na organizam već i na međusobnoj interakciji sa proteinima i enzimima ekstraćelijskog matriksa. U nekim istraživanjima sedamdesetih godina je potvrđen efekat olova na odloženo nicanje zuba u nekim oblastima zagađenim teškim metalima [8].

Detaljna karta raspodjele olova u tvrdim tkivima olakšava istraživanja o zastupljenosti olova i nivoa olova u zubu. Ispitivanja o distribuciji olova u zubima pacova ukazalo je na jasne razlike u koncentraciji olova u gleđi i dentinu jer su izmjerene znatno veće koncentracije olova na površini gleđi i dentinu nego u blizini pulpe. Potvrđeno je takođe da je intenzivan metabolizam pulpe značajno usporen u nekim metaboličkim oboljenjima (kao što je dijabetes) pa su zato neophodna dodatna istraživanja odlaganja olova u ovakvim uslovima [9].

## **1.1. PREGLED LITERATURE**

Tokom dugogodišnjih istraživanja, došlo se do zaključka da na diferencijaciju novih odontoblasta u pulpi utiču brojni faktori kao što su: koštani sijaloproteini, joni kalcijuma, ekstracelularni matriks, faktori rasta, fibronektin, tenascin, NGF-u iz pulpe, odnosno citokini koji preko faktora rasta utiču na početak formiranja patološkog dentina [10].

Dokazano je takođe da su molekuli fibronektina upleteni u različite ćelijske funkcije uključujući adheziju, migraciju i diferencijaciju. Fibronektin je ekstracelularni glikoprotein matriksa koji se distribuira u tkivo i u krv. Tokom razvoja zuba, diferencijacija odontoblasta je kontrolisana od strane specifične bazalne membrane koja posreduje u epitelijalno-mezenhimalnom razvoju. Neka istraživanja ukazuju na prisustvo i vezu fibronektina i ove bazalne membrane u diferencijaciji odontoblasta. Smatra se da fibronektin i bazalna membrana posreduju u izduživanju i polarizaciji odontoblasta, transmembranskom interakcijom. Ova saznanja ukazuju na moguću ulogu fibronektina u sekundarnoj inicijaciji diferencijacije odontoblastoidnih ćelija [11-13].

Transformišući faktor rasta  $\beta$  1 ili TGF- $\beta$ 1 je polipeptidni član porodice citokina. To je protein koji obavlja mnoge ćelijske funkcije, uključujući kontrolu rasta, razmnožavanje, diferencijaciju ćelija i apoptozu. Kod ljudi, TGF- $\beta$ 1 je kodiran pomoću TGF- $\beta$ 1 gena [14].

Signalni molekuli regulaciju ćelijskih aktivnosti ostvaruju aktivacijom specifičnih receptora u ćelijama gdje se stvaraju ili aktivacijom receptora na susjednim ćelijama. Povećana ekspresija hormona rasta je pronađena u ćelijama pulpe tokom tercijarne dentinogeneze i utvrđena je uloga ovog faktora rasta na diferencijaciju specifičnih ćelija pulpe neophodnih u reparatornom odgovoru. Istraživanja su pokazala da komponente dentinskog matriksa kao i sami tkivni faktori rasta mogu da izazovu transdentinsku stimulaciju odontoblasta u *in vivo* uslovima. TGF- $\beta$ 1 se nalazi u dentinskom matriksu i utiče na vaskularne reakcije neophodne u reaktivnoj dentinogenizi [15-17].

Tenascini su ekstraćelijski matrični glikoproteini i najviše ih ima u ekstracelularnom matriksu embriona. Većina funkcionalnih studija sa tenascinom-C je rađena na miševima. Rezultati istraživanja su ukazali da tenascin-C (kao i fibronektin i tkivni hormon rasta) ima važnu ulogu u signalizaciji ćelija i da može biti indukovani tokom trauma, upala, ili razvoja

tumora. Takođe, tenascin-C je važan tokom razmnožavanja ćelija i njihovog kretanja, pri zarastanju rana, utiče i na diferencijaciju specifičnih ćelija pulpe neophodnih tokom reparatornog odgovora. Brojne uloge tenascina-C u funkcionalisanju i signalizaciji ćelija čine tenascin-C interesantnim proteinom za proučavanje i razvoj novih terapijskih postupaka. U nekim studijama se tenascin-C opisuje kao ljepljivi protein koji koči spajanje sa fibronektinom [18].

Povezanost fibronektina, tenascina i tkivnog hormona rasta i njihove uloge u reparativnoj dentinogenezi su još uvijek predmet brojnih istraživanja jer njihove uloge u reparativnoj dentinogenezi nisu potpuno rasvijetljene [19].

Diabetes mellitus (DM) je stanje hronične hiperglikemije i poremećaj metabolizma ugljenih hidrata, masti i proteina koje nastaje kao posljedica apsolutnog ili relativnog nedostatka dejstva insulina. Narušava imuni sistem, izaziva oštećenja i disfunkcije oka, bubrega, nerava, srca i krvnih sudova. Takođe, je kroz mnoge studije dokazan uticaj dijabetesa na nastanak zubnog karijesa. Osobe koje boluju od dijabetesa mellitusa imaju redukovano lučenje pljuvačke što povećava rizik od hipomineralizacije gleđi i nastanka karijesa. Suvoća usta, gljivične infekcije, oboljenja desni (gingivitis i periodontitis) su oboljenja koja dijabetes može da izazove [20,21].

Mikrocirkulacija pulpe je takođe važan dinamičan sistem koji reguliše metaboličke procese zuba i dentinogenezu. Na krvne sudove pulpe utiču brojni neurogenetski faktori kao i fizičko-hemijski faktori koji mogu uticati na odbrambene reakcije pulpo-dentinskog kompleksa [22].

Uprkos brojnim istraživanjima kod dijabetičara ni danas nije potpuno razjašnen mehanizam pulpnog odgovora na nadražaje. Neka istraživanja ukazuju na usporenju tj. smanjenu odbrambenu reakciju pulpe i odontoblasta (proces dentinogeneze) na etiološke faktore kod dijabetičara [19,23].

#### 1.1.1. ODONTOGENEZA-REPARATIVNA I REAKTIVNA DENTINOGENEZA

Često je sinonim za tercijarni dentin, reaktivni i reparativni dentin, pri čemu se ovi termini koriste samo da označe novostvoreni dentin i odvoje ga od primarnog i sekundarnog dentina. Međutim, reaktivni i reparativni dentin imaju jednu suštinsku razliku: oni se stvaraju od

različitih ćelija pulpnog tkiva. Između procesa reaktivne i reparativne dentinogeneze treba postaviti razliku. Reaktivna dentinogenez je rezultat interakcije između postojećih odontoblasta i pogodnih molekulske stimulusa koji dovode do povećanja sintetičke i sekretorne aktivnosti odontoblastnih ćelija. Ovo je u znatnoj suprotnosti sa reparativnom dentinogenesom, gde prethodno dolazi do destrukcije primarnih odontoblasta, a zatim indukcije pogodnih ćelijskih prekursora i njihove diferencijacije u odontoblaste [24].

Reparativna dentinogenez podrazumijeva: ćelijsku diobu, hemotaksu, migraciju, adheziju i citodiferencijaciju, koji prethode sekreciji matriksa dok je reaktivna dentinogenez manje kompleksan biološki proces i može imati jednostavnije zahtjeve u smislu inicirajućih molekula. Dovoljna je samo interakcija između molekulske stimulusa i odontoblasta da bi se pokrenula sekrecija matriksa [25].

*Gašić* i sar. (2002) u svojoj studiji iznose da važan faktor u procesu patološke dentinogeneze predstavlja perzistirajući karijesni proces, koji se terapijski ne tretira, i koji predstavlja izvor infektivno-toksičnih, fizičkih i hemijskih iritacija koje dovode do sinteze reaktivnog (traumatskog, atubularnog) dentina. Reaktivni dentin predstavlja sekundarni dentin, koga sintetišu postmitotske odontoblastične ćelije-primarni odontoblasti, a koji sadrži manji broj dentinskih kanalića sa manjim ili većim stepenom iregularnosti [26].

*Vojinović* i sar. (2002) su na osnovu SEM ispitivanja patološke dentinogeneze zaključili da je struktura patološkog dentina vrlo slična strukturi pokrovног dentina, te da zavisi od jačine i dužine iritacije [3].

*Tziafasi* sar. (2002) su svojim istraživanjem detaljnije objasnili strukturu patološkog dentina. Oni su istakli da je prvi sloj patološkog dentina kristalna zona (u kojoj se nalaze ćelije koje se razlikuju od odontoblasta) a na koju se nadovezuju tkivo osteodentina i tubularni dentin i da se u okuženju pulpnog tkiva, nalaze specifični stimulatori - faktori rasta (FR) koji iniciraju i vode ovaj proces [27].

*Mjori* i sar. (1991) su pomoću transmisione elektronske mikroskopije analizirali odgovor pulpe majmuna na cement koji sadrži kalcijum hidroksid i uočili mjesta ćelijske organizacije već poslije deset do jedanaest dana. Kubične ćelije, koje produkuju novi fibrodentinski matriks, imaju identičnu citoplazmatsku organizaciju kao i odontoblastolike ćelije. Pored toga, raspored ćelija i pozicija citoplazmatskog nastavka koji su karakteristični za ćelije su slične

odontoblastima, te se mogu zapaziti četrnaest dana po plasiranju medikamenta. Slična ćelijska organizacija uočena je i u drugim studijama [28].

Dentinogeneza je genetski uslovjen proces u kome učestuje pulpo-dentinski kompleks u cjelini i još uvek predstavlja nerazjašnjen biološki fenomen. Iako su dentinogenetski procesi proučavani kroz mnoge studije, ćelijski i molekularni mehanizmi njegove regulacije nisu još uvek potpuno jasni. Poznato je da ove procese kontrolišu odontoblasti i ćelije slične odontoblastima [7].

Brojne studije, ukazuju da zubi pružaju korisnu i dugoročnu evidenciju o uticaju olova na čovjeka. No međutim, istraživanja povodom djelovanja olova na ćelije pulpnog tkiva koje učestvuju u dentinogenezi su rijetka [8].

#### 1.1.1.1.REPARATIVNA DENTINOGENEZA

Reparativna dentinogeneza je složen proces koji prije sekrecije dentina obuhvata čitav niz događaja tj. ćelijsku diobu progenitora, hemotaksu, ćelijsku migraciju, adheziju i diferencijaciju u ćelije slične odontoblastima. Osnovni uslovi za nastanak reparativne dentinogeneze su perivaskularne ćelije, nediferencirane mezenhimalne ili mezoektodermalne ćelije i fibroblasti [4,8].

Reparativna dentinogeneza podrazumijeva formiranje tercijarnog dentina kao odgovor na odgovarajuće patološke nadražaje (egzogene ili endogene). Producija dentina, koja je povećana tokom reparacije (tercijarna dentinogeneza) je karakteristična samo za pulpno tkivo. Novonastali dentin se taloži na pulpodentinskom spaju, u cilju zaštite pulpe od uticaja štetnih nadražaja [2,7].

Mnoge studije su se zasnivale na ispitivanju reparativne dentinogeneze pod uticajem različih faktora. Tako su Šubarić i saradnici su u svom eksperimentalnom istraživanju imali za cilj da skening elektronskom mikroskopijom i polarizacionom mikroskopijom analiziraju promene na celularnim i ekstracelularnim komponentama zubne pulpe posle direktnog i indirektnog prekrivanja alkalnim cementom (Dycal). Ispitivanje je urađeno na eksperimentalnim životinjama domaćih svinja i kod direktnog prekrivanja pulpe sa Dycal-om je uočena granica između novostvorenog reparativnog dentina i normalne dentinske strukture. Takođe su uočena jezgra kalcifikacije, mladi krvni sudovi i ćelije (fibrocyti, histiociti i fibroblasti). Kod indirektno aplikovanog preparata (Dycal-a) je uočena normalna dentinska struktura, jasno vidljivi dentinski

kanalići, atubulusna dentinska struktura odnosno hipercelularnost na granici stvaranja novog dentina i brojni krvni sudovi. Uočeno prisustvo amorfног kalcifikата dentinske strukture govori o početnom stvaranju barijere od čvrstog tkiva [29].

Neke studije su se bavile pitanjem ultrastrukture reparativnog dentina kao i faktora koji utiču na njegovo formiranje. Zbog toga su *Mitić* i saradnici imali za cilj da pomoću SEM-a ispitaju strukturu i tip mineralizacije reparativnog dentina nastalog pod dejstvom hroničnog karijesa. Utvrđeno je da se ovaj tercijarni dentin odlikuje smanjenim brojem dentinskih kanalića u odnosu na primarni dentin, a u uzorcima je pronađen kombinovani tip mineralizacije (globulatni i linearни) sa izraženijim globularnim tipom mineralizacije [30].

#### 1.1.1.2. REAKTIVNA DENTINOGENEZA

Reaktivna dentinogeneza nastaje kod blagih i umerenih nadražaja gdje odontoblasti mogu da prežive i pojačaju svoju sekretornu aktivnost formirajući nove slojeve tercijarnog dentina [3,7].

Taloženje reaktivnog dentina može se pojaviti na pulpo-dentinskoj granici i peritubularnim ili intratubularnim prostorima kao odgovor na određene stimulanse. Reaktivni dentin može biti podstaknut uslijed normalnih fizioloških procesa kao i tokom starenja, mada nije jasno u kojoj meri patološka oboljenja zuba, abrazije, atricije, dovode do stvaranja reakcionog dentina. Kiseline iz bakterija plaka podstичu diferencijaciju odontoblasta i nastanak reakcione dentinogeneze. Vrlo je vjerovatno da kiseline bakterija iz plaka razlažu faktore rasta (posebno TGF- $\beta$  1 koji ulazi u sastav dentina) koji ima stimulativno dejstvo na odontoblaste i pokretanje reaktivnog dentina [13].

Iako su reakcije pulpo-dentinskog kompleksa na nokse davno objašnjene, njihovi ćelijski i molekularni mehanizmi još nisu u potpunosti istraženi. Signalni molekuli ovih procesa su tkivni faktori rasta, tenascin-C, fibronektin i drugi faktori [22-25].

#### 1.1.1.3. PULPODENTINSKI KOMPLEKS

Pulpo-dentinski kompleks reaguje na povrede, štetne nadražaje i oštećenja zubnog tkiva, tako što stvara dentin i na taj način umanjuje uticaj štetnih nadražaja. Opšte prihvaćena podjela

dentinogeneze na primarnu, sekundarnu i tercijarnu napravljena je na osnovu vrste dentina koji se stvara kao odgovor na različite spoljne i unutrašnje stimulanse [14].

Različitost u sastavu peritubularnog i inertubularnog matriksa dentina, upućuju na to da se odontoblasti luče tamo gde se stvara predentin i na mjestu gde je povećan nivo peritubularnog dentina [15].

S obzirom da različita patološka stanja utiču na različit odgovor pulpe i ćelija koje vrše sekreciju dentinskog matriksa, prihvaćena je klasifikacija dentinogeneze u zrelog zubu (*Baume*) u kojoj se razlikuje sekundarna dentinogeneza, reparativna dentinogeneza i fibrodentinogeneza. Reparativna dentinogeneza često pokreće formiranje matriksa fibrodentina, koji je atubularne i nepravilne građe i čiju sekreciju vrše progenitorne, kuboidne ili vretenaste ćelije [2,24].

Iz stem/progenitorske ćelijske populacije u pulpodentinskom kompleksu, diferenciraće se odontoblastima slične ćelije, koje će vršiti sekrecije dentina umjesto primarnih odontoblasta [31].

Pulpa preko dentina komunicira s okolinom i od njegove propustljivosti zavisi njen integritet. Propustljivost dentina je sa jedne strane regulisana odbrambenim sposobnostima pulpo-dentinskog kompleksa, a s druge strane jačinom i brzinom širenja nadražaja. Osim ovih glavnih faktora, propustljivost dentina zavisi i od dimenzije dentinskih tubula, od starosti i vitaliteta odontoblasta, zatim od kvaliteta peritubularnog dentina ali i prisutnih elemenata za formiranje dentinskog mosta [22].

#### 1.1.1.3.1. PULPA

Pulpa i dentin su jedinstven tkivni kompleks koji je embriološki, anatomske i funkcionalno povezan i čiji se histološki izgled mijenja sa godinama i pod uticajem vanjskih faktora [1,10].

Zubna pulpa je meko tkivo smješteno u sredini zuba, okruženo tvrdim tkivom (dentinom). Opisuje se kao areolarno, vlaknasto, rastresito, vezivno tkivo građeno od ćelija i ekstraćelijskih komponenata, opskrbljeno krvnim sudovima i nervima [32].

Jedna od primarnih funkcija pulpe je induktivna gdje ona utiče na inicijaciju i stvaranje dentina koji podstiče nastanak gleđi [33].

Zubna pulpa posjeduje prirodni potencijal (sposobnost) za reparaciju tkiva pulpe, što dovodi do formiranja reparativnog dentina. Tokom reparativne dentinogeneze, odontoblasti se

zamjenjuju novo diferenciranim odontoblastima koji migriraju na oštećeno mjesto gdje kasnije dolazi do njihove proliferacije i diferencijacije u ćelije slične odontoblastima [34].

Kroz mnoga istraživanja jasno je naglašeno da je dentin produkt sekrecije odontoblasta, čija izgradnja počinje još u embrionalnom periodu i traje do formiranja i maturacije zuba [35].

#### 1.1.1.3.2. DENTIN

Dentin je zubno tkivo, koje se prema *Pashley*-u, može smatrati poroznim tkivom, tubularne građe sačinjenim od kristala hidroksiapatita utopljenih u kolageni matriks. Kanalikularna struktura dentina izraz je njegove anatomske povezanosti sa pulpom. Producenci odontoblasta pružaju se u dubinu od 0,1 do 1 mm u dentinske tubule [36].

Odontoblasti formiraju dentin kao odgovor na nadražaj ili ozljedu. Mikroskopski, takav dentin drugaćiji je od sekundarnog a označava se kao reparatori, iregularni, tercijarni osteodentin [34].

Formiranje dentina uključuje sekreciju proteina matriksa tj.odontoblasta prije ugrađivanja u kristale hidroksiapatita. Fizičke i hemijske osobine dentin-kolagenaze (slične onima iz proteina matriksa) omogućavaju formiranje mreže (osnove) za ugrađivanje minerala. Sijaloprotein dentina je posebno izgrađen od odontoblasta koji se mogu naći u porodici proteina kostiju. Nekoliko proteina izolovanih iz kostiju se mogu naći u dentinu kao ekspresija odontoblasta [33].

#### 1.1.1.3.3. ODONTOBLASTI

Odontoblasti na iritacije reaguju individualno i po genetski uslovljenom biomehanizmu pri čemu svaki odontoblast nosi u sebi genetsku informaciju kako će djelovati u određenim patološkim okolnostima [2,9].

Porijeklo ćelija, koje se postavljaju u odontoblastni niz sa ciljem da zamjene uništene, još uvijek je nerazjašnjeno [11].

Na osnovu prepostavke da događaji koji dominiraju u primarnoj dentinogenezi, učestvuju i u samom procesu reparativne dentinogeneze, *D'Souza* i saradnici su provjeravali da li su ćelije koje učestvuju u stvaranju reparativnog dentina slične odontoblastima. Na prvim molarima pacova su urađene preparacije pete klase u cilju produkcije reparativnog dentina s tim

da su životinje žrtvovane u različitim vremenskim intervalima. Na uzorcima dentina ovih zuba je rađena hibridizacija sa genom specifičnim za tipove kolagenih I i III. Poliklonalna antitijela za dentin sialoprotein (DSP) i dentin specifičan protein (fenotip odontoblasta) su korišteni u imunohistohemijskim eksperimentima. Rezultati prethodnih analiza ukazuju da ćelije formiraju reparatori dentin, sintetišući kolagen tipa I, ali ne i kolagen tipa III i da su ove ćelije imunopozitivne za dentin sijaloprotein (DSP). Rezultati ove studije su ukazali da ćelije koje formiraju reparativni dentin su ćelije slične odontoblastima [37].

*Gašić* i saradnici su pokušali, da objasne molekularne osnove obe generacije odontoblasta i ulogu ovih ćelija u primarnoj, reaktivnoj i reparativnoj dentinogenezi. Utvrđili su da reaktivni dentin leži ispod preživjelih postmitotičkih, pravih odontoblastičnih ćelija, dok reparativni dentin predstavlja sekretorni proizvod nove generacije [26].

Odontoblasti produkuju veći dio komponenti ECM koje se nalaze u dentinu i koje učestvuju u mineralizaciji dentina. Kod slabijih nadražaja (površinski i srednji karijes) ćelije iz pododontoblasnog sloja (Hellsov sloj) učestvuju u formiranju reakcionog dentina a duboki karijes utiče na stvaranje reparativnog dentina [36].

Postoji hipoteza da epigenetski faktori (molekuli ekstracelularnog matriksa i faktori rasta) pokreću i kontrolišu diferencijaciju odontoblasta [38].

Interakcija između epitelnog i mezenhimalnog tkiva zahtijeva niz procesa koji se odvijaju na različitim komplementarnim nivoima. Ovi procesi podrazumijevaju imobilizaciju, potencijaciju i prostornu regulaciju rastvorljivih signala koji potiču iz epitela aktiviranjem latentnih prekursora faktora rasta i specifične reakcije između ćelija i ECM-a. Na ovaj način se pokreće niz metabolitičkih događaja reorganizacija citoskeleta, apikalna sekrecija matriksa, pri čemu se stabilizuje i pojačava polarizacija odontoblasta [39].

*Goldberg* i saradnici su (2004) koristili modele životinja kako bi testirali kapacitet potencijalnih bioaktivnih molekula za reparaciju pulpe. Pratili su njihovo ugrađivanje u pulpu i zaključili da neki molekuli koji se nalaze u ekstracelularnom matriksu dentina mogu imati ulogu u terapiji pulpe kao bioaktivni agensi ili u inženjeringu tkiva. Odontoblasti proizvode većinu sastojaka ekstracelularnog matriksa koji se nalaze u dentinu i učestvuju u mineralizaciji dentina [40].

#### 1.1.1.4. MEDIJATORI DENTINOGENEZE

Povezanost fibronektina, tenascina, i tkivnog hormona rasta i reparativne dentinogeneze su još uvijek predmet brojnih istraživanja kao što je i njihova normalna distribucija u dentinogenezi nepoznata [19].

Ne postoje radovi o normalnoj distribuciji medijatora bez stimulacije pulpe. Takođe je i porijeklo ćelija, koje se ugrađuju u odontoblastni niz sa ciljem da zamjene uništene, još uvijek nerazjašnjeno [40].

Savremena literatura iznosi podatke da su signalni molekuli uključeni u transdukcione mehanizme ovog procesa i da oni imaju izrazitu bioaktivnost u vrlo malim koncentracijama [41].

Matriksni molekuli, među njima i fibronektin, faktori rasta i progenitorne ćelije pulpe i njihova u interakcija (međudjelovanju) često podstiče dentinogenezu [42].

Povezanost fibronektina, tenascina, i tkivnog hormona rasta i reparativne dentinogeneze su još uvijek predmet brojnih istraživanja kao što je i njihova normalna distribucija u dentinogenezi nepoznata [43].

#### 1.1.1.4.1. TRANSFORMIŠUĆI FAKTOR RASTA (TGF- $\beta$ 1) I NJEGOVA ULOGA U DENTINOGENEZI

Ljudski organizam predstavlja kompleks ćelija koje su u stanju da regulišu svoje ponašanje preko ćelijsko-ćelijskih interakcija, interakcija između ćelija i ECM-a i sekrecije različitih proteinskih molekula. Rast i diferencijacija ćelija odvijaju se pod uticajem bar dve grupe signala: rastvorljivih i nerastvorljivih. Rastvorljivi molekuli su uglavnom faktori rasta i inhibitori rasta proteinske prirode. *Kilian* i sar. (2004) su na osnovu dobijenih rezultata potvrdili da primjena pojedinih faktora rasta posebno TGF- $\beta$ , stimuliše diferencijaciju odontoblasta i dovodi do oslobođanja endogenih faktora rasta sadržanim u organskom matriksu dentina, što dodatno stimuliše dentinogenezu [44].

*Tzifas* je u svojoj studiji (2004) zaključio da je veća prednost faktora rasta u odnosu na kalcijum hidroksid, zato što oni stimulišu formiranje reparativnog dentina, koji je uglavnom iznad pulpnog tkiva, dok su efekti kalcijum hidroksida često zavisni od reakcije pulpnog tkiva [27].

Furey i sar. (2010) su u svom istraživanju zaključili da faktori rasta mogu uticati na osjetljivost pulpnih ćelija prema raznim medikamentima koji se koriste prilikom terapije. BMP-7, EGF, TGF- $\beta$ , i IGF-I su pokazali nabolji efekat na pulpne ćelije zahvaljujući povećanoj otpornosti prema citotoksičnim efektima medikamenata [23].

Imunohistohemijska ispitivanja i in situ hibridizacija, pokazuju da se za vrijeme procesa diferencijacije odontoblasta pojavljuju: FGF-i, TGF- $\beta$  1-3, BM proteini, IGF-i kao i hormoni rasta. TGF- $\beta$  i srodnii faktori rasta - TGF- $\beta$  pripadaju familiji homologih polipeptida koja sadrži tri izoforme (TGF- $\beta$  1-3) i faktore sa širokim spektrom funkcija, kao što su BMP-i. Sintetišu ga mnoge ćelije, ali su glavni izvori ovog faktora rasta: trombociti, makrofagi, monociti i koštane ćelije [22].

Podaci iz literature ukazuju da TGF- $\beta$ 1 reguliše ekspresiju dva ključna dentinska proteina (DMP-1 i DSPP) koji učestvuju u mineralizaciji dentinskog matriksa. Povećana ekspresija hormona rasta je pronađena u ćelijama pulpe tokom tercijarne dentinogeneze a utvrđena je i uloga ovog faktora rasta na diferencijaciju specifičnih ćelija pulpe tokom reparatornog odgovora. Studije su pokazale da komponente dentinskog matriksa, kao i sami tkivni faktori rasta mogu da izazovu transdentinsku stimulaciju odontoblasta u uslovima *in vivo*. TGF- $\beta$ 1 se nalazi u dentinskom matriksu i utiče na vaskularne reakcije neophodne u reaktivnoj dentinogenezi [18].

Faktori rasta su signalni molekuli koji pokazuju snažnu bioaktivnost u jako malim koncentracijama, često na nivou pikograma, a aktivnosti u tkivima ostvaruju aktivacijom specifičnih receptora na ćelijama u kojima se i stvaraju ili na susednim ćelijama. Receptori za faktore rasta (TGF- $\beta$ 1) pripadaju receptorima koji su odgovorni za ekspresiju gena koji učestvuju u stvaranju ćelijske reakcije [17].

Prepostavlja se da molekuli koji se vezuju za TGF- $\beta$  (heparin i fibronektin) mogu preuzeti ulogu bazalne membrane kod zubnih klica u razvoju u *in vitro* uslovima. Ovi proteini umanjuju difuziju TGF- $\beta$  kroz dentalnu papilu i ubrzavaju interakciju faktora rasta sa kompetentnim preodontoblastima. TGF- $\beta$  može dijelovati kao autokrini faktor u odontoblastnim ćelijama, pošto je u stanju da reguliše i sopstvenu sintetsku aktivnost i sintezu dentina. Prepostavlja se da je osnovna funkcija ovog faktora rasta izražena u regulaciji sinteze kolagena tipa [30].

Funkcionalna istraživanja podržavaju hipotezu da TGF- $\beta$ 1 igra važnu ulogu u stimulaciji metabolizma odontoblasta. U *in vitro* uslovima on prolazi kroz dentalnu papilu i povećava

sekreciju kolagena tipa I i fibronektina. Smatra se da ne utiče na polarizaciju perifernih ćelija zubne papile. Međutim, ukoliko se TGF- $\beta$  1 kombinuje sa heparinom (koji sam po sebi nema uticaja na diferencijaciju odontoblasta), pojavljuju se polarizovane ćelije koje su u stanju da sintetišu veliku količinu ECM-a sa kolagenom tipa I [14].

Heparin, koji se vezuje za TGF- $\beta$ 1, ima osobinu da umanji difuziju ovog faktora rasta kroz kulturu ćelija dentalne papile. Slično tome, induktivni uticaj TGF- $\beta$ 1 je prisutan i u eksperimentima kada se heparin zameni fibronektinom, fiziološkim konstituentom bazalne membrane, koji takođe ima afiniteta za TGF- $\beta$ 1. Faktori rasta i TGF- $\beta$ 1 su signalne molekule koje su po svojoj hemijskoj strukturi polipeptidi ili mali proteini. Faktori rasta su ćelijski specifični, što znači da svaki faktor djeluje na određenu vrstu ćelija [15].

Reaktivna dentinogeneza nastaje kao rezultat interakcije postojećih odontoblasta koji pokazuju ekspresiju i sintezu brojnih faktora rasta u embrionalnom razvoju i tokom svog životnog ciklusa, od kojih poseban značaj imaju pripadnici familije faktora rasta-TGF- $\beta$ 1 [16].

Lučenje patološkog dentina nije do danas konačno definisan. Najveći broj autora smatra da se odvija kao i proces regularne dentinogeneze, u vidu lučenje matriksa a potom njegove mineralizacije. Međutim, *Smith* i saradnici i *Magloira* i saradnici, pridaju značaj faktorima rasta u patološkoj dentinogenezi (posebno TGF- $\beta$ 1) izolovanom iz dentinskog matriksa tokom povrede zuba, pod dejstvom karijesa, tokom preparacije kavite ili dejstvom štetnih nadražaja. Njegova regulatorna uloga se ostvaruje vezivanjem i aktivacijom specifičnih transmembranskih receptora i pomoću njih se vežu za istu ćeliji ili se veže za receptore susjedne ćeliji [25,45].

Brojne eksperimentalne studije ukazuju da najvažniju ulogu za regulaciju procesa reparacije dentina imaju TGF- $\beta$ 1 iz familije faktora rasta [8].

Sintetisani i oslobođeni faktori rasta se ugrađuju u dentinski matriks i tu ostaju inaktivni sve do njegovog rastvaranja ili demineralizacije. Induktivni uticaj TGF- $\beta$ 1 je uočen i u studijama gdje heparin zamijenjen fibronektinom, koji takođe ima afinitet za TGF- $\beta$ 1 [31].

U svojoj eksperimentalnoj studiji, *Vahtokaria* i saradnici smatraju da TGF- $\beta$ 1 u odontoblastima deluje kao autokrini faktor koji sintetiše i formira dentinski matriks i indukuje ekspresiju kolagena tipa-1[46].

*Finkelman* i saradnici su postavili hipotezu da se faktori rasta (TGF- $\beta$ 1) oslobođaju iz dentina u toku njegove demineralizacije bakterijskim kiselinama što može pokrenuti odontoblaste da stvaraju reaktivni dentin [47].

Eksperimentalna indukcija reparativne dentinogeneze implantacijom demineralizovanog dentina ili dentinskog matriksa može biti pokrenuta faktorima rasta (TGF- $\beta$  1) koji se nalaze u ovom materijalu. U toku reparativne dentinogeneze (direktno prekrivane pulpe) faktori rasta mogu da potiču iz cirkumpulparnog dentina i iz matriksa fibrodentina [11].

*Tabatabaei* i saradnici su se u svojoj studiji bavili proučavanjem proliferacije zubne pulpe matičnih ćelija u prisustvu matriksa dentina dobivenog iz nekolagenih proteina, faktora rasta iz trombocita i transformišućeg faktora rasta (TGF- $\beta$ 1). Rezultati su pokazali da kombinacija faktora rasta i prečišćenog matriksa bez ne-kolagenih proteina (naročito pri 10 mg/ml koncentracije) ima mitotsko djelovanje na matične ćelije pulpe [48].

*Liu J* je sa saradnicima (2007) imao za cilj ispitivanje indukcije matičnih ćelija pulpe zuba u dentinu, nakon stimulacije izdvojenih komponenti matriksa dentina, što je uticalo na fiziološku reparaciju tkiva pulpe nakon oboljenja i povrede zuba. Uzorke su sačinjavali uzdužni presijeci zuba iz kojih je dentin još dvadeset jedan dan kultivisan na 10% fetusnom goveđem serumu. Ekspresija izolovanih gena utvrđena je PCR metodom a uočeno je da je ekstracelularni matriksa (ECM), povezan sa genima, dvije vrste kolagena gena fibulin-1, tenascina C i same TGF- $\beta$ 1. Ova studija je identifikovala matriks i TGF- $\beta$ 1, vezane za genske fragmente tokom mineralizacije matičnih ćelija, čime je TGF- $\beta$ 1 doveden u vezu sa reparativnom dentinogenезom tj.indukovanom reparacijom pulpnog tkiva [49].

*Bostrom* i saradnici su ispitivali dejstvo silikatnog cementa (Biodentine<sup>TM</sup>) i njegov uticaj na nastanak reparativnog dentina, na modelovanje i sekreciju TGF- $\beta$ 1 ćelija pulpe, direktnim prekrivanjem pulpe na humanim zubima. Imunohistohemijskom analizom su ispitivali djelovanje materijala na pojedinim dijelovima pulpe pri čemu je zapaženo da je Biodentin<sup>TM</sup> aplikovan direktno na pulpu izazvao rani oblik sinteze (nastanka) reparativnog dentina vjerovatno zbog modulacije lučenja TGF- $\beta$ 1 sekreta ćelija pulpe [50].

U novijoj objavljenoj studiji, *Laurent* i saradnici (2012) su Biodentine<sup>TM</sup> aplicirali direktno na kulturu ćelija pulpe humanih zuba gdje su se ćelije promatrале u više vremenskih perioda. Uticaj Biodentine<sup>TM</sup> na lučenje (ekspresiju) TGF- $\beta$ 1 je poređeno sa kalcijum hidroksidom, a njegova ekspresija je kvantifikovana pomoću ELISA-e. Rezultati su pokazali da Biodentine<sup>TM</sup> utiče na proces mineralizacije odmah nakon njegove aplikacije na ćelije pulpe, ustvari podstiče lučenje osteodentina i osteoblasta i povećava ekspresiju TGF- $\beta$ 1 vjerovatno

zbog uticaja ćelija pulpe na sekreciju TGF- $\beta$ 1. Ustvari, kada se Biodentine™ aplicira direktno na pulpu podstiče se indukcija reparativne dentinogeneze [6].

Graham i saradnici su to zaključili u svojoj studiji jos 2006. godine u kojoj je uočena porasta faktora rasta (TGF- $\beta$ 1) i njegova uloga u angiogenezi, regrutovanju starih ćelija, odvajajući ćelije i u mineralizaciji u određenim dijelovima pulpe ispod biomaterijala. Tompson i saradnici (2008) u svojoj studiji uočili da kalcijum hidroksid solubilizuje bioaktivne molekule TGF- $\beta$ 1 u pulpi zuba, kako bi podstakao reparativnu dentinogenezu [51,52].

U eksperimentalnoj in vivo studiji, Tziaras i saradnici su ispitivali uticaj TGF- $\beta$ 1, kao aktivne komponente matriksa dentina tokom indukcije reparativne dentinogeneze, na uzorcima pulpe zuba molara i očnjaka pasa, imunohistohemijskom analizom pomoću antitijela TGF- $\beta$ 1. Rezultati su pokazali da ćelije pulpe mogu da izraze (pokazuju ekspresiju) svog dentinogenetskog potencijala, kao odgovor na egzogeni TGF- $\beta$ 1 i da se dentinogenetska aktivnost dentina matriksa može bar delimično pripisati TGF- $\beta$ 1 molekulama [53].

Efekti rekombinovanog fibroblasta (bFGF), insulinu sličan faktor rasta (IGF)-II i transformišući faktor rasta (TGF- $\beta$ 1) su ispitivani svjetlosnim i transmisionim elektronskim mikroskopom u ćelijama pulpe nakon aplikacije na otvorenu pulpu očnjaka i molara, zuba pasa. U periodu od jedne i tri nedelje ova studija je pokazala da TGF- $\beta$ 1 u kratkom vremenskom periodu utiče na diferencijaciju ćelija-sličnim odontoblastima i stimuliše nastanak primarnih odontoblasta [51].

U nekim eksperimentalnim studijama npr. Smith-a i saradnika, implantacijom izolovanih komponenti ekstracelularnog matriksa dentina u kavitet zuba je došlo do stimulacije osnovnih odontoblasta i reakcionarne dentinogeneze. Hromatografska metoda i test za faktore rasta su pokazali da ovi uzorci sadrže značajne količine TGF-B1, a faktor rasta utiče na diferencijacije i sekreciju odontoblasta [45].

#### 1.1.1.4.2. FIBRONEKTIN I NJEGOVA ULOGA U DENTINOGENEZI

Fibronektini su veliki glikoproteini koji učestvuju u mnogim ćelijskim procesima, posebno u interakciji ćelija sa ekstracelularnim materijalom kao što su fibroblasti, osteoblasti itd. Tokom poslednjih godina u mnogim studijama je analizirana ekspresija, funkcija i struktura

fibronektina i otkriveno da fibronektin ima kompleksnu molekularnu strukturu, koja se sastoji od više specifičnih mesta za vezivanje [42].

Dokazano je, da su molekuli fibronektina upleteni u različite ćelijske funkcije uključujući adheziju, migraciju i diferencijaciju [8].

Fibronektin je ekstracelularni glikoprotein matriksa koji se distribuira u tkivo i u krv. Tokom razvoja zuba, diferencijacija odontoblasta je kontrolisana od strane specifične bazalne membrane koja posreduje u epitelijalno-mezenhimalnom razvoju. Neka istraživanja ukazuju na prisustvo i vezu fibronektina i ove bazalne membrane u diferencijaciji odontoblasta. Smatra se da fibronektin i bazalna membrana posreduju u izduživanju i polarizaciji odontoblasta, transmembranskom interakcijom. Ova saznanja ukazuju na moguću ulogu fibronektina u sekundarnoj inicijaciji diferencijacije odontblastoidnih ćelija [6].

Fibronektin, koji pripada klasi glikoproteina sa velikom molekulskom težinom, ima važnu ulogu u regulaciji ćelijske adhezije, migracije i diferencijacije u toku razvojnih i reparativnih procesa. Fibronektin okružuje ektomezenhimne ćelije i akumulira se na apikalnom polu ćelija. One se istovremeno izvlače iz ćelijskog ciklusa, polarizuju i sekretuju pokrovni predentin [54].

Implantacija biološki aktivnih molekula ili biomatriksa unutar pulpne komore zuba, eksperimentalnih životinja (pasa) je poslužio kao uzorak, koji je objasnio molekularnu osnovu indukcije stvaranja reparativnog dentina. Ovom metodom se poslužila eksperimentalna studija u kojoj je pulpno tkivo životinja implantirano sa milpor-filterom, natopljenim fibronektinom, koji je uticao na stvaranje dentinskog matriksa oko implantata uz pojavu odontblastolikih ćelija [55].

Weiss je takođe u svojoj studiji potvrdio da pulpne ćelije implantirane (prekrivene) fibronektinom, mogu biti diferencirane u odontblastolike ćelije i da faktor rasta može uticati na dentinogenezu indukovani fibronektinom koji veže faktore rasta, a posebno TGF- $\beta$ 1[56].

Fibronektin i tenascin-C su dva najveća glikoproteina ECM koja su sastavljena od velikih disulfidno-vezanih podjedinica, a one od višestrukih strukturnih oblasti (domena). Više od polovine svake molekule sadrži takozvana ponavljanja fibronektina tipa III, međutim druge oblasti (domeni) se razlikuju. Fibronektin je dimer, a tenascin-C je heksamer. Fibronektin i tenascin-C najčešće zajedno ulaze u sastav tkiva, ali je zastupljenost tenascina-c znatno manja u odnosu na fibronektin [51].

Fibronektin pripada porodici (rodu) velikih, ljepljivih glikoproteina koji se javljaju ili u rastvorljivom ili nerastvorljivom obliku i neutralne je PH vrijednosti. Rastvorljivi FN je prisutan u tjelesnim tečnostima, uključujući plazmu, cerebrospinalnu tečnost i amnionsku tečnost. Nerastvorljivi fibronektin je prisutan u mnogim organima i tkivima odraslih, uključujući slezinu, zidove krvnih sudova, jetru, bubreg, kožu, mozak i periferne nerve. Fibronektin se veže za površine ćelija i za različite biološke supstance, uključujući kolagen. FN i kolagen su često glavni proteini vezivnog tkiva i njihovo međusobno djelovanje bi moglo biti važno u obrazovanju i održavanju strukture tkiva. FN takođe igra ulogu u embrionskom razvoju, organogenezi, morfogenezi i diferencijaciji [52].

Neka istraživanja su istakla da distribucija fibronektina nije bila jednaka u okviru mekih vezivnih tkiva ili među različitim vezivnim tkivima, te je ova studija proučavala raspodjelu fibronektina u dentalnim i periodontalnim tkivima, molara i sjekutića odraslih pacova koristeći imunofluorescentnu tehniku. Ekspresija fibronektina je uočena u svim mineralizovanim tkivima sem u cementu sjekutića, i u većini mekih tkiva izuzev u pulpi molara i sjekutića. Rezultati su takođe pokazali da je FN lokalizovan prvenstveno u ćelijama i ćelijskim procesima, zidovima osteocita, i cemenocitnim prazninama i kanalima i dentinalnim tubulama. Trake FN, prisutne u osteoblastima ukazuju na aktivnosti i skupljanje FN u toku formiranja i reparacije kosti [50].

*Yoshiba* i saradnici su ispitivali distribuciju fibronektina u pulpi zuba u razvoju i razvijenim Zubima pomoću indirektne imunofluorescencije, konfokalnim laserskim skenirajućim (pretražnim) mikroskopom. U apikalnoj regiji zuba u razvoju, intenzivnom fluorescencijom fibronektin je pronađen uz bazalnu membranu i prvom formiranom sloju predentina. Slična zastupljenost fibronektina kod razvijenih zuba uočena je u odontoblastnom sloju. Rezultati ove studije pokazuju da je fibronektin bio prisutan u sloju odontoblasta tokom svih faza dentinogeneze. Pozitivne fibrozne strukture između odontoblasta vjerovatno odgovaraju von Korffovim vlaknima te su povezani (učestvuju) u diferencijaciji odontoblasta i dentinogenezi [57].

*Mizuno* i saradnici su (2008) ispitivali efekat jona kalcijuma na ćelije zubne pulpe i mehanizam nastanka dentinskog mosta pod uticajem kalcijum-hidroksida tako što su humane ćelije pulpe tretirane sa visokom koncentracijom jona kalcijuma ili magnezijuma u 24 časa pri čemu je mjerena ekspresija gena fibronektina pomoću PCR metode potom su ćelije pulpe kultivisane (zasijane) na fibronektinskoj podlozi. Rezultati ove studije su pokazali da je

ekspresija fibronektin-gena stumulisana pomoću kalcijumovih jona, zavisno od koncentracije, a magnezijum nije uticao na stimulaciju gena fibronektina. Nadalje, ćelije pulpe kultivisane na podlogama sa fibronektinom, su pokazale povećanu ekspresiju fenotipova mineralizovanih tkiva, formiranih (zrelih) ćelija. Ovim istraživanjem se došlo do zaključka da joni kalcijuma koji se otpuštaju iz kalcijum-hidroksida stimulišu sintezu fibronektina u ćelijama pulpe, a fibronektin može izazvati diferencijaciju ćelija zubne pulpe u mineralizovanim tkivima, formiranjem ćelija koje su najvažnije za nastanak dentinskog mosta, do kontakta sa ćelijama. Ekspresija tenascina-c nije primjećena u epitelu oralne sluznice, odontoblasima i ameloblastima. Fibronektin je na sličan način distribuiran na spoju epitelne membrane i preodontoblasta, gdje je kolagen tipa I i III bio odsutan, a fibronektin prisutan [58].

*Leites* i saradnici su se bavili (2011) procjenom histološkog odgovora i ekspresijom tenascina-c i fibronektina u pulpi poslije direktnog prekrivanja pulpe sa kalcijum hidroksidom i MTA. Ispitivanje je sprovedeno na 40 stalnih zuba svinja, koji su nakon određenog vremena ekstrahovani i analizirani imunohistohemijskom metodom. Rezultati su pokazali da je znatno veći inflamatorni odgovor pulpe bio poslije sedam dana u grupi sa direktnim prekrivanjem kalcijum hidroksidom, a nesto kasnije sa MTA. Ekspresija tenascina-c i fibronektina je u obe grupe (i kod kalcijuma i MTA) bila približno sličnog intenziteta. Fibronektin i tenascin-C su uočeni tokom reparativne dentinogeneze, nezavisno od korištenog materijala za direktno prekrivanje pulpe [59].

*Linde* i saradnici su u različitim fazama dentinogeneze ispitivali ekspresiju fibronektina pomoću indirektne fluorescencije. Fibronektin i njegova ekspresija (izražavanje) su utvrđeni u bazalnoj membrane između unutrašnjeg gleđnog epitela i osnovnog mezenhima zuba i u sloju predentina, ali nije bio zastupljen u predentinu tokom dalnjeg, cirkumpulpalnog formiranja dentina, što ukazuje da molekule fibronektina nisu direktno uključene u mineralizaciju. Fibronektin je lokalizovan u sloju odontoblasta [60].

Fibronektin se nalazi u tjelesnim tečnostima i (više u plazmi, a znatno manje u drugim tečnostima) i mekom vezivnom tkivu. Fibronektin se sintetiše iz velikog broja ćelija *in vitro*. Fibroblasti i endotelne ćelije su glavni prozvođači fibronektina uključujući i mnoge druge ćelije, npr. epitelne koje sintetišu fibronektin na nižim nivoima. Postoje dvije vrste fibronektina i to fibronektin plazme i celularni fibronektin [56].

U jednoj od studija, *Zarrabi* i saradnici (2011) su imunohistohemijskom analizom ispitivali ekspresiju tenascina-c i fibronektina poslije prekrivanja humanih zuba sa MTA i novim endodontskim cementom gdje su 32 premolara poslije određenog vremena ekstrahovani i pripremljeni za imunohistohemijsku analizu. Rezultati su pokazali da je ekspresija fibronektina i tenascina-c uočena u obje grupe zuba tj. njihova ekspresija je uočena u matriksu dentinskog mosta već poslije dvije sedmice sa malo većim intenzitetom kod grupe sa MTA. Ekspresija oba antitijela se smanjivala poslije osam nedjelja. U stvari ova studija je istakla značaj fibronektina i tenascina-c, kao glavne dvije komponente matriksa jednog reparativnog dentinskog mosta [61].

*Etges* i saradnici su proučavali ekspresiju ekstracelularnog glikoproteינה tenascina-C i fibronektina u pulpi molara kod ljudi (humanih zuba) nakon njenog direktnog prekrivanja sa kalcijum hidroksidom, a prije direktnog prekrivanja kaviteti su isprani sa rastvorom natrujum hipohlorida i hlorheksidin glukonata. Poslije određenog vremenskog perioda zubi su ekstrahovani i pripremljeni za imunohistohemijsku analizu koja je u ovoj studiji pokazala da natrijum-hipohlorid i hlorheksidin-glukonat nisu uticali na ekspresiju ova dva glikoproteina i oba su uočena u reparaciji dentina [62].

#### 1.1.1.4.3. TENASCIN-C I NJEGOVA ULOGA U DENTINOGENEZI

Tenascin-C je ekstraćelijski, protein matriksa. Najraniji izraz tenascina-C je posmatran u toku gastrulacije i u nervnim ćelijama tokom migracije. Zatim je primjećen u hrskavici i kostima u razvoju, u mezenhimu različitih organa, uključujući i zube. U studijama, koje su najčešće rađene na pacovima i miševima, vidljiva je privremena zastupljenost tenascina u epitelu pupoljka zuba, a kasnije i pulpi. Uočena je smanjena vrijednost tenascina-C u odontoblastima. Istraživanje na miševima takođe je pokazalo da je tenascin-C izražen u ćelijama pulpe dentina *in vitro* i da se njegovo dejstvo znatno povećalo pod uticajem TGF- $\beta$ 16, HGF i RA u mRNA i proteinima. Dokazano je da tenascin-C koči (usporava) spajanje ćelija pomoću fibronektina kako bi se smanjilo spajanje u toku razvoja zuba [22].

Dok je gen tenascina-C obilato izražen u embrionskim tkivima, u većini tkiva je smanjen, a najzastupljeniji u mozgu i drugim nervnim tkivima. Povećan je u toku zarastanja rana i mehanički stres dovodi do pojave tenascin-C u osteoblastima i u fibroblastima i hondroцитima.

Tenascin-C je značajno povećan kod stroma mnogih tumora kao što su karcinomi grudi i pluća [23].

Morfogeneza i diferencijacija zuba u razvoju je regulisana međusobnim djelovanjem epitela i mezenhima. Biološke funkcije tenascina-C su još uvijek nedovoljno razumljive. Bliže analize, su pokazale da miševi, kojima je nedostajao tenascin imaju neurološke smetnje koje dovode do nenormalnog ponašanja kao i do smanjenog zarastanja rana na rožnjači [11].

Tenascini su ekstraćelijski matrični glikoproteini. Oni su obilni u ekstracelularnom matriksu embriona. Većina funkcionalnih studija sa tenascinom-c je rađena na miševima. Tokom istraživanja rezultati su ukazali da tenascin-C kao i fibronektin i tkivni hormon rasta, imaju važnu ulogu u signalizaciji ćelija što potvrđuje njegova sposobnost da bude izazvan (indukovan) u toku trauma, upala ili razvoja tumora. Takođe, tenascin-C je važan u regulisanju razmnožavanja ćelija i njihovog kretanja, posebno u toku zarastanja rana i utiče na diferencijaciju specifičnih ćelija pulpe neophodnih u reparatornom odgovoru. Brojne uloge tenascina-C u funkcionisanju i signalizaciji ćelija čine tenascin-C popularnim proteinom za proučavanje u razvoju novih terapija i otkrivanju novih metoda. U nekim studijama se tenascin-C klasificuje kao ljepljivi protein jer onemogućava (koči) spajanje sa fibronektinom [18].

Neke studije su istakle da je tenascin-C potencijalni biomarker za brojna oboljenja kao sto su miokarditis i različiti oblici tumora. S obzirom da učestvuje u funkcionisanju i signalizaciji ćelija, ove uloge čine tenascin-C popularnim proteinom za proučavanje i razvoj novih terapija i metoda liječenja. U novijim objavljenim studijama je otkriveno da tenascin-C usporava infekciju HiV-om u imunim ćelijama vezujući se za stranu "chemokine coreceptor" (tipovi molekula na površini ćelija) na proteinskom omotaču HIV-1, blokirajući tako prodiranje virusa u ćelije domaćina. Tenascin-C i fibronektin su dva najveća vanćelijska matrična glikoproteina. Prepoznatljiv i visoko regulisan izraz tenascina je izazvao interes u cilju da se identifikuju moguće funkcije tenascina-C u spajanju ćelija sa ćelijama ili ćelijama sa supstratom, migraciji ćelija, rastu i raslojavanju ćelija u toku morfogeneze [19].

Najraniji izraz tenascin-C je posmatran u toku gestacije i u nervnim ćelijama, hrskavici i kostima u razvoju i u mezenhimu različitih organa uključujući i Zub. Dok je gen tenascina-C obilato izražen u embrionskim tkivima, u većini odraslih tkiva pojavljuje se u malim koncentracijama. Kod odraslih je ekspresija tenascina-C otkriveno u mozgu i drugim nervnim tkivima. Izražavanje tenascina-C je značajno povećano kod stroma mnogih tumora kao što su

karcinomi grudi i pluća. Nekoliko faktora rasta utiče na ekspresiju tenascina-C u kulturama ćelija tj. transformišuci faktor rasta  $\beta$ (TGF $\beta$ 1) i fibroblastni faktor rasta (FGF)-2, (bFGF) uticali su na produkciju tenascina-C u kulturama fibroblasta. U novijoj objavljenoj studiji, *Sato* i saradnici su (2016) ispitivali imunohistohemijsku lokalizaciju tenascina-C u periodontalnim ligamentima pacova, starih 8 nedjelja. Aktivnost tenascina-C (njegova ekspresija) je detektovana u cementu i alveolarnoj kosti, a intenzivnija ekspresija na resorpcionoj površini alveolarne kosti. Uočen je i u interfibroznom prostoru parodontnih ligamenata, što ukazuje da on djeluje kao adhezijske molekule između kosti i vlakana parodontnih ligamenata. Takođe je uočeno da tenascin-C značajno utiče na resorpciju alveolarne kosti, a ekspresija fibronektina u periodontalnim ligamentima tokom eksperimenta ili bolje rečeno imunoaktivnost tenascina-C i fibronektina zapažena je u mnogim područjima, ali se međusobno isključuju [63].

U novijoj objavljenoj studiji iz ljeta 2015.godine, *Moradi* sa saradnicima je imao za cilj da procijeni ekspresiju fibronektina i tenascina, nakon direktnog prekrivanja pulpe u zubima pacov sa MTA, propolisom ili sa uzorcima plazme bogate trombocitima pomoću imunohistohemijske metode koja je obuhvatala 48 molara i premolara od 4 psa. Životinje su žrtvovane poslije 7 i 30 dana i izvađeni su zubi. Rezultati studije su uočili da je ekspresija tenascina znatno veća kod zuba koji su izvađeni poslije 30 dana nego kod onih koji su izvađeni poslije 7 dana. U zaključku se navodi da je MTA bolji izbor za direktno prekrivanje pulpe i da se tenascin aktivira u reparatornoj dentinogenezi [31].

Još ranije je dokazano da je tenascin molekula ekstracelularnog matriksa (ECM) i da ulazi u sastav mezenhima samog embriona, koji okružuje popoljak epitela u raznim organizma uključujući i Zub. *Thesleff* je sa saradnicima u ovoj studiji ispitivao (pomoću imunohistohemijske analize zuba) gdje je tenascin-C lokalizovan tokom razvoja zuba kod miša i štakora korištenjem pilećeg antitijela tenascina-C. Rezultati pokazuju da je tenascin-C bio prisutan u bazalnoj membrani zuba u vrijeme diferencijacije odontoblasta, dok je u ćelijama dentalne papile isčezao. Na osnovu rezultata ove studije se moglo zaključiti da je ekspresija tenascina-C u mezenhimskim ćelijama tkiva zuba u poređenju sa drugim ćelijama vezivnih tkiva povezana s njihovom sposobnošću diferencijacije u toku formiranju ćelija tvrdog tkiva [64,65].

*Leite* i saradnici su se bavili procjenom histološkog odgovora i ekspresijom tenascina-c i fibronektina u pulpi poslije direktnog prekrivanja pulpe kalcijum hidroksidom i MTA, na 40 stalnih zuba kod svinja, koji su nakon određenog vremena ekstrahovani i analizirani

imunohistohemijskom metodom. Rezultati su pokazali da je znatan inflamatorni odgovor pulpe uočen poslije sedam dana u grupi gdje bilo direktno prekrivanje pulpe sa kalcijum hidroksidom, a nešto kasnije sa MTA. Ekspresija tenascina-c i fibronektina je u obe grupe (i kod kalcijuma i MTA) je bila približno sličnog intenziteta i takođe su fibronektin i tenascin-C uočeni u toku reparativne dentinogeneze, nezavisno od korištenog materijala za direktno prekrivanje pulpe [66].

*Sahlberg* i saradnici su (2011) u studiji proučavali ekspresiju tenascina-C i njegovu mRNA tokom razvoja zuba pacova gdje su uočeni neki fragmenti mRNA ovog antitijela tokom razvoja zuba pacova i da TGF-β1 može djelovati kao epiteln signalni molekul koji utiče na indukciju ekspresije tenascina-C u mezenhimu zuba [67].

#### 1.1.2. UTICAJ DIABETES MELLITUS-a (DM) NA STANJE USTA I ZUBA

Diabetes mellitus (DM) je stanje hronične hiperglikemije i poremećaj metabolizma ugljenih hidrata, masti i proteina koje nastaje kao posljedica apsolutnog ili relativnog nedostatka dejstva insulina. DM je predisponirajući faktor karijesu, gingivitisu, periodontitisu, oralnoj kandidijazi, kserostomiji i mnogim drugim oboljenjima usne duplje [3].

Ubrzani katabolički a smanjeni anabolitički procesi dovode do promjena u svim ćelijama i tkivima organizma, što dovodi do oralnih promjena kod bolesnika s hroničnim dijabetesom. Glukoza koja se nalazi kod dijabetičara u međućelijskom tkivu, tkivnim tečnostima i u pljuvački dovodo do nastanka oportunističke oralne flore i stvaranja uslova za njenu patogenost. *Obradović* je sa saradicima ispitivala promjene oralnih struktura sa diabetes mellitus-om, gdje je u ispitivanje bilo uključeno 47 dijabetičara, starosne dobi od 55 godina i prosječna vrijednost ŠUK-a 12,6 mmol/L. Rezultati kliničkih ispitivanja su ukazali na oralne promijene među kojima su dominirale kserostomija, glosopiroza, stomatopiroza, upale oralne sluznice, sa pojavom hiperkeratoze i eksfolijacije na jeziku i usnama [68].

Hipoplazija gleđi je važan klinički problem kod novorođenčadi od majki sa dijabetesom. To je podstaklo *Silvu* i njene saradnike (2003) da ispitaju da li postoje hipoplazije gleđi u zubima pacova (mladunaca) Vistar soja, gdje su ženke dovedene u dijabetes tokom trudnoće.

Makroskopski su uočeni bjeličasti defekti u gleđi (hipoplazije), što je potvrđeno i SEM-om , gdje su zabilježene hipoplazije gleđi skoro u svim zubima eksperimentalne grupe [69].

Posebno treba istaći da diabetes mellitus tipa I ima štetan uticaj na razvoj fetusa i na povećan rizik za nastanak urođenih mana. Iako su redovne kontrole šećera u krvi kod trudnica sa dijabetesom redukovale perinatalni morbiditet i urođene mane, ipak je to još uvijek glavni uzrok smrtnosti novorođenčadi od majki sa dijabetesom [67].

Mnoge epidemiološke studije su ukazale da su osobe oboljele od dijabetesa podložnije oralnim infekcijam i periapikalnim procesima zbog promjene u njihovom imunom sistemu i kvalitativnim i kvantitativnim promjenama flore u ustima, što je takođe *Mesgarani* sa saradnicima (2014) potvrdio u svojoj studiji. Cilj njihove studije je bio da se procijeni kolika je učestalost (zastupljenost) periradikularnih lezija kod pacijenata Babole, iz sjevernog dijela Irana na osnovu kliničkog pregleda i retroalveolarnog snimka (rendgeneološki) gdje su rezultati pokazali da su periradikularne lezije zabilježene kod 94.4% od ukupnog broja pacijenata. Takođe je i kod pacova dovednih u dijabetes pronađeno vise periapikalnih lezija nego na zubima zdravih pacova [70].

#### 1.1.3. UTICAJ NA DENTINOGENEZU

Mikrocirkulacija pulpe je takođe važan dinamičan sistem koji reguliše metaboličke procese zuba i dentinogenezu. Na krvne sudove pulpe utiču brojni neurogenetski faktori kao i fizičko-hemijski faktori koji mogu uticati na odbrambene reakcije pulpo-dentinskog kompleksa . Kod dijabetesa postoji poremećaj mikrocirkulacije u pulpi i posljedičnog usporavanja njenog metabolizma tj.smanjena je njenja je odontogeneza u pulpi [22].

Dok su mehanizmi obolijevanja parodonta kod DM-a potpuno razjašnjeni, ćelijski i molekularni mehanizmi poremećaja u zubnoj pulpi tokom dijabetesa su i dalje problem koji se istražuje [12].

Histopatološke studije pokazuju postojanje angiopatija i zadebljale bazalne membrane kako malih tako i velikih krvnih sudova pulpe [23].

Parametri antioksidantnog sistema, značajno su izmenjeni u pulpi pacova sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom, sto su i potvrdile i brojne studije [21].

Diabetes melitus je hronično oboljenje koje negativno utiče na reparaciju pulpe (reparativnu sposobnost pulpe) i periodoncijuma, što su potvrđile brojne studije [33].

*Madani* sa saradnicima (2014) je patohistološkom analizom proučavao promjene u pulpe tako što je direktno prekrivao pulpu, 32 zuba pacova Vistar soja koji su dovedeni u dijabetes. Poslije četiri sedmice, pacovi su žrtvovani a uzorci zuba pripremljeni za patohistološku analizu. Uočen je znatno intenzivniji inflamatorni odgovor pulpe prekrivene CEM cementom u eksperimentalnoj grupi nego u kontrolnoj ( $p = 0.004$ ), dok na zubima tretiranim sa MTA u eksperimentalnoj grupi nije uočen jači inflamatorni odgovor pulpe u odnosu na pulpu zdravih pacijenata. Ova preliminarna studija ukazuje na bolji terapeutski učinak (dejstvo) MTA na pulpu od CEM cementa kod osoba sa dijabetesom. U nekim studijama je zapaženo prisustvo patoloških kalcifikacija u pulpi [71].

#### 1.1.4. UTICAJ OLOVA NA LJUDSKI ORGANIZAM I NJEGOVA TOKSIČNOST

Poznato je da je olovo jedan od najštetnijih metala jer kao kumulativni toksin može prouzrokovati niz teških oštećenja. Važnost olova kao jednog od najvećih zagađivača životne sredine tokom poslednje decenije intenziviralo je istraživanja o dejstvu olova na ljudski organizam [34].

Zagađenje okoline teškim metalima dovodi do toga da ih tijelo čovjeka apsorbuje. Dospjelo olovo u organizam (najčešće inhalacijom i ingestijom), najviše se deponuje u jetri, kostima i zubima i toksično djeluje na bubrege, kardiovaskularni, crijevni i centralni nervni sistem, dovodeći do akutnih ili hroničnih oboljenja [55].

Prvenstveno utiče na antioksidativne procese i na taj način stvara prekomijeren oksidativni stres [43].

Osnova toksičnosti olova je u tome što se njegovi metalni katjoni vezuju sa posebnim ligandima (npr. sulfidnim, karboksilnim ili amino grupama) biomolekularnih supstanci koje su od posebnog značaja za različite fiziološke funkcije i transport jona [44].

Trovanje ljudi olovom dovodi do mnogih neurotoksičnih promjena kao što je encefalitis, poremećaj ponašanja i nepažnja, smanjenje koncentracije, smanjenje koeficijenta inteligencije, itd [53].

To su potvrdili i *Niu* i saradnici (2008), tako što su pomoću (aktivnosti) komore i Y-lavirinta ispitivali spontana i uslovljena ponašanja odraslih albino pacova, nakon unošenja olovo acetata i natrijum florida u vodi za piće. Oni su ukazali da fluor ili olovo mogu uticati negativno na spontano ponašanje i sposobnost učenja prije nego na nastanak nekih lezija ili promijena u zubu [72].

Nedovoljno podataka o uticaju teških metala na oboljenje ADHD koje je zastupljeno kod 8% djece u SAD, su podstakli *Chan*-a i njegove saradnike da se (2015) bave ispitivanjem uticaja Mn, Ca, Fe, Pb i Hg na nastanak ovog oboljenja primjenom skale za ponašanje (DBA). Nije uočena povezanost između ADHD-a i uticaja ovih metala, sem olova koje se inače dovodi u vezu sa promjenama u ponašanju djece (hiperaktivnost, impulsivnost, smanjenu inteligenciju) [73].

Takođe su mnogi autori provjeravali koncentraciju olova u zubnim tkivima, kao pokazatelju koeficijenta inteligencije dece u područjima bogatim olovom i utvrdili da je koncentracija olova u zubima u negativnoj korelaciji sa stepenom inteligencije djece [71].

Poznato je takođe da ljudi, koji su hronično bili izloženi koncentracijama  $0.75\mu\text{g}$  olova, imaju smetnje u rastu, a posebno kod djece [72,73].

*Berkovitz* i saradnici su ispitivali ugradnju olova u zubna tkiva kod pacijenata sa gastrointestinalnim ulkusom i došli do rezultata da je nivo olova u dentinu pacijenata oboljelih od ulkusne bolesti, značajno viši jer su oštećenja ćelije mukoze tankog creva omogućile pojačanu resorpciju i deponovanje olova u čvrsta zubna tkiva [74].

U radovima *Scharier*-a i sar. ispitivana je koncentracija olova u krvi i mlječnim zubima djece sa bubrežnom insuficijencijom, gdje je utvrđena korelacija između koncentracije Pb u zubima i insuficijencije bubrega [75].

Jedna od savremenijih studija, imala je za cilj da ispita zastupljenost kadmijuma i olova u mlječnim zubima kod djece koja pate od celjaklje i alergija na hranu u industrijskim oblastima Poljske. Upotrebom plamene atomske apsorpционе spektrofotometrije, uvrđeno je da su se ovi metali najviše akumulirali u mlječnim zubima, kod djece sa celjaklijom i alergijama na hranu u poređenju sa zubima zdrave djece. Tokom studije je takođe uočeno da su toksični teški metali u zubima ostali u dinamičnom balansu sa normalnom građom zuba, tj. bili su zamijenjeni kalcijumom u hidroksilapatitnim kristalima. Prema tome, procjena koncentracije kadmijuma i olova u čvrstim zubnim tkivima ne bi se trebalo zasnivati samo na apsolutnom sadržaju ovih metala, već i na odnosu ovih metala prema kalcijumu u zubu [25].

Neke studije u Poljskoj su pokazale da je kod više od polovine pušača potvrđeno da su njihova djeca zbog boravka u zatvorenim prostorijama akumulirala veće količine toksičnih metala, uključujući kadijum i olovo iz dima cigareta [19,21].

Povećane koncentracije olova mogu djelovati i na normalan razvoj djece i na resorpciju hranljivih materija, kao što su kalcijum, selen, bakar, željezo i magnezijum ali i na smanjenu aktivnosti različitih ćelijskih enzima. Olovo se inače nakuplja najviše u bubrežima, jetri, kostima i zubima. Produkti koji eliminišu kadmijum i olovo iz tijela uključuju vitamin C i E, selen, željezo i amino kiseline, metionin i cistein. Poznato je, da se u dentalna tkiva ugrađuju metali u periodu obrazovanja gleđi ili dentina (u toku razvoja zuba) [7,26].

Olovo takođe ima štetno dejstvo na reproduktivni sistem, što je dokazano u brojnim studijama na eksperimentalnim životinjama ali i negativan efekat na intrauterini razvoj ploda i organogenezu, zbog čega mu se pripisuje teratogeno dejstvo. Kod trudnica izloženih povećanim dozama olova, uočena je učestala pojava spontanih pobačaja. Olovo oštećuje sluzokožu usne duplje, dovodeći do Stomatitis saturnina-e [13].

#### 1.1.4.1. APSORPCIJA I DISTRIBUCIJA OLOVA U ORGANIZMU

Apsorpcija olova zavisi od prisutne koncentracije, rastvorljivosti njegovih jedinjenja, fizičkog stanja olova, kao i od fiziološkog stanja organizma i može biti perkutana, pulmonalna ili gastrointestinalna [10].

Poslije izlaganja, olovo se heterogeno ugrađuje u krv, meka tkiva i kosti a period poluraspada je od nedjelju dana, a čak do 4 godine u tvrdim tkivima. Tvrda tkiva su najveće skladište olova u tijelu, koje se isto tako može otpuštati iz njih tokom trudnoće i laktacije, mijenjajući metabolizam minerala [20].

Trovanja olovom je mnogo brže kod djece i mladunaca životinja, što je posljedica većeg stepena resorpcije iz digestivnog trakta. Naime, već je napomenuto da se kod djece resorbuje 50% od oralno unesene količine olova, dok je kod odraslih resorpcija znatno manja i iznosi svega 10% [23].

Nakon resorpcije, olovo se transportuje krvlju, a iz cirkulacije prelazi u tkiva. Nakon resorpcije u digestivnom traktu, olovo u krvi ima poluživot od oko 20-30 dana, a u mekim tkivima 30-40 dana, dok u zubima i kostima (u kojima je deponovan najveći deo olova

organizma) poluživot iznosi od 10-20 godina [ 31].

#### 1.1.4.2. OLOVO I ŽIVOTNA SREDINA

U konstitutivnom smislu, sva živa bića su izgrađena, kako od organskih materija i hemijskih elemenata (makroelementi, mikroelementi) tako i od toksičnih elemenata, koji se u organizmu nalaze u različitim koncentracijama, uslijed kontaminacija iz okoline (Al, Hg, Cd, Pb, Bi, Ag). Među toksičnim elementima posebno se izdvaja olovo kao jedan od najvažnijih i najtoksičnijih teških metala u svijetu zbog činjenice da je životna sredina sve zagađenija. Olovo je najzastupljeniji teški metal u Zemljinoj kori i nalazi u obliku svojih ruda [45].

Ovaj metal se koristi se od praistorijskog vremena i široko je zastupljen i eksplorisan. Proizvodnja olova u svetu se povećava iz godine u godinu a najznačajniji svetski proizvođači su Sjedinjene Američke Države, Rusija, Australija i Kanada. Bivša Jugoslavija je zauzimala osmo mjesto po proizvodnji olova u svetu. Iako se poslednjih godina radi na tome da se nivo eksploracije smanji i dalje je to glavni zagađivač za stanovnike sjeveroistočne i centralne oblasti USA-a. Kroz mnoge studije je dokazano da teška industrija, topionice obojenih metala, fabrike za proizvodnju baterija i motorna vozila predstavljaju najveće izvore olova ali i staklo, boje, keramika odnosno rešetke akumulatora. Vozila u Meksiku Sitiju već dugo godina koriste samo bezolovno gorivo, a neke od novih strategija idu na smanjenje olova u bojama, lakovima, konzervama i igračkama [47].

Akutna trovanja olovom u nekim zemljama u razvoju su rijetkost, ali su hronična trovanja niskim koncentracijama olova je veliki problem javnog zdravstva, posebno među manjinama i socijoekonomski ugroženim grupama. Ovo su takođe i stanovnici sa visokom prevalencijom karijesa [14].

U ovim zemljama u razvoju, svijest o toksičnom uticaju olova raste, ali je malo zemalja sa politikom i propisima protiv ovog problema [15].

U većini razvijenih zemalja, poslednjih godina je uticaj olova umanjen, uglavnom zbog javnih kampanja o zdravstvu i smanjenja njegove upotrebe u komercijalne svrhe, posebno u naftnoj industriji [11].

Olovo je visoko toksično za ljudske zube, a može biti i smrtonosan u određenim zemljama sa jako razvijenom industrijom [17].

Godinama se permanentno povećava koncentracija olova u životnoj sredini što uzrokuje ne samo profesionalna trovanja kod izloženih radnika, već i cijelokupnog stanovništva. Međutim, nije samo vazduh zagađen olovom, već je to i hrana i voda, tako da značajne količine olova mogu da dospiju u organizam i ovim putem. Utvrđeno je da je 50.8% svih profesionalnih oboljenja u Srbiji prouzrokovana olovom [38].

#### 1.1.4.3. UTICAJ OLOVA NA KOSTI I ZUBE

Primarno mjesto odlaganja olova u organizmu su čvrsta tkiva (kosti i zubi) i više od 95 % ukupnog olova u organizmu je deponovano u ovim tkivima. Oovo je labilno vezano ili apsorbovano za površinu hidrosiapatita i može se redistribuirati promjenom pH sredine, izmjenom jonskog sastava tečnosti, helatima, nekim antibioticima, alkoholom ili traumom [19].

U cilju boljeg razumijevanja posljedice dejstva olova na ćelije koštane srži, *Sauk* i saradnici (1992) su ispitivali uticaj olova koristeći (ROS) koštane ćelije *in vitro* i uočili inhibitorni efekat bolova na proliferaciju ćelija koštane srži i produkciju osteokalcina. Ovo je potvrdio i *Long* sa saradnicima (1990) koji je ispitivao djelovanje olova na prokolageni tip i proizvodnju osteokalcina. Rezultati studije su ukazali na značaj osteokalcina (koji ima glavnu ulogu u mineralizaciji tvrdih tkiva) i potvrdili da oovo utiče na smanjenje njegove produkcije [76,77].

##### 1.1.4.3.1. UTICAJ OLOVA NA GLEĐ I DENTIN ZUBA

Postoje izvještaji u literaturi koji ukazuju na to da prisustvo olova u hemijskom sastavu gledi može promijeniti njegovu dentalnu ultrastrukturu i dovesti do oštećenja gleđi. Tako je i *Gomes* sa saradnicima u svojoj studiji utvrđio da su zubi predškolske djece, koja su živjela u industrijskoj oblasti grada, imali veću koncentracije olova u gleđi nego zubi djece koja su živjela u neindustrijskoj oblasti [78].

*Youravonga* i saradnici su ispitivali gleđ i dentin kod djece sa visokom koncentracijom olova u krvi, pomoću sekundarne jonske masene spektrometrije (secondary ion mass spectrometry- SIMS) i mikroanalizom x-zracima. Ove metode su ukazale na vidljiv nivo olova u dentinu na granici sa pulpom, a mikroanaliza x-zracima nije mogla detektovati oovo. Rezultati

ove studije kao i prethodna istraživanja su pokazala da se olovo najviše taloži na gleđno dentinskoj granici zuba [79].

*Antila* je ispitivala koncentracija olova u gleđi mlijecnih sjekutića, 49 djece iz Askole, ruralnog području, koje je najbogatije radonom, u cijeloj Finskoj. Ispitivanje je rađeno pomoću protonske indukcije x-zracima, gdje su rezultati pokazali da je koncentracija olova ( $8.8 \pm 6.6$  ppm) u cijeloj gleđi zuba bila približno slična rezultatima iz studija sprovedenim u drugim oblastima Finske ukazujući na to da radon ne utiče na značajan porast nivoa olova u gleđi zuba. Međutim, nivo olova izmeren na površini gleđi zuba je bio nešto viši u Askola, nego u Oulu (oblasti koja nije bogata radonom) i to na površini gleđi gornjih sjekutića dva puta veći od koncentracije u donjim sekutićima. *Antila* je iste (1987) ispitivala apsolutnu koncentraciju Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr i Pb u gleđi (sa labijalne i lingvalne strane, donjih mlijecnih sjekutića) pomoću protonske indukcije x-zracima. Uočene su značajne varijacije u koncentraciji sa oralne i labijalne površine pojedinih zuba i to samo za olovo, a kod ostalih metala nije uočena statistički značajna razlika za lingvalnu i oralnu površinu [80].

*Järvinen* i saradnici su fizičkom metodom zasnovanoj na protonskoj indukciji x-zraka, ispitivali sadržaj olova u mlijecnim zubima i uočili mnogo veću koncentraciju olova u mlijecnim zubima djece urbane u odnosu na djecu ruralne oblasti Finske [81].

*Frank* i saradnici su sproveli komparativnu studiju zastupljenosti olova u gleđi i dentinu stalnih molara i premolara pomoću disperzije x-zracima fluorescentom analizom, kod mladih ispitanika iz Strazbura, ruralnog Alzasa i Meksiko Sitija. Kod svih ispitanika uočena je razlika u koncentraciji olova u odnosu na starosnu dob. Najviše ugrađenog olova je uočeno u koronarnom dijelu dentina i u kavumu pulpe [82].

#### 1.1.4.3.2. UTICAJ OLOVA NA ZUBE TOKOM TRUDNOĆE I LAKTACIJE

U literaturi se mogu naći brojni podaci o toksičnosti olova na organizam i činjenica da je Zub najbolji i najpouzdaniji pokazatelj ugradnje olova u organizam. Ipak su podaci za odnos olova i zuba oskudni, što je podstaklo *Auroru* da sa saradnicima (2005) ispita ugradnju olova u gleđ i dentin zuba pacova Vistar soja, gdje su trudne ženke pacova dobijale olovo nitrat u vodi za piće tokom trudnoće i dojenja. Uzorci njihovih molara su ispitivani pomoću nuklearne

mikroprobe, i pokazano je da je nivo olova uočen u površnim slojevima gleđi i dentina, i to na samoj granici sa pulpom [83].

*Grobler* i saradnici su ispitivali trudne ženke pacova koje su dobijale olovo u vodi za piće, u toku trudnoće i u toku laktacije. Koncentraciju olova u molarima je ispitivna atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom i utvrđeno je da olovo najviše ugrađeno u zubno tkivo kod ženki koje su pile vodu sa najvećom koncentracijom olova. Međutim, ovo istraživanje je urađeno, primjenom visokih koncentracija olova u vodi koja se inače ne nailazi u životnoj sredini [84].

*Watson* i saradnici su u svojoj studiji došli do rezultata da pacovi koji su bili izloženi olovu u prenatalnom i perinatalnom period imaju 40% povećanu prevalenciju karijesa i 30% smanjenu funkciju parotidne žljezde. Olovo u mlijeku tretiranih životinja je bilo povećano 10 puta više nego u krvi što ukazuje na to da se olovo ugrađuje i u mlijecne žljezde. Takođe, ovi rezultati mogu djelimično objasniti relativno visoku prevalencu karijesa u ispitivanim gradovima iz unutrašnjosti SAD-a, gdje je izloženost olovu uobičajna pojava. Kod čovjeka se olovo deponuje u tvrda tkiva (kosti i zube) i do 62 godine tokom života i zato su ova tkiva najvjerojatnija za analizu uticaja olova. Čak je u jednoj studiji utvrđeno da kod majki koje su par decenija ranije bile izložene olovu to može uticati na fetus. Studije su potvrdile da se koncentracija olova u krvi znatno povećava tokom trudnoće i laktacije jer dolazi do otpuštanja uskladištenog olova iz kostiju u krvotok [85].

*Wesenberg* i saradnici su trudnim ženkama pacova Wistar soja davali olovo i kadium u vodu za piće. Nivo olova i kadijuma u sjekutićima, molarima, epifizi i nadubrežnoj žlijedi je mjerен pomoću atomske apsorpcione spektrofotometrije. Rezultati su ukazali da olovo ima najveći afinitet za čvrsta tkiva, posebno za ugradnju u zube i mogućnost akumulacije u meka tkiva, jer je olovo bez barijere prošlo kroz placentu i majčino mlijeko, resorbujući se u crijeva odojčeta. Uočena korelacija između koncentracije olova u molara pacova i korteksa bubrega ukazala je da su molari glodara najbolji pokazatelji stepena apsorpcije kadijuma i olova, a da sjekutići nisu. Pretpostavlja se da molari glodara mogu da se uporede sa humanim mlijecnim zubima. Tako je jedna studija potvrdila da ljudski mlijecni zubi mogu ukazati na prethodnu izloženost olovu i mogu poslužiti kao indikatori ekspozicije kadijumom [86].

#### 1.1.4.3.3. UTICAJ OLOVA NA ZUBE U RAZVOJU

Bliži pogled u dostupnoj literaturi ukazuje na to da zagađenje olovom može uticati na strukturu gleđi (npr. gleđna hipoplazija je povećana kod djece izložene visokim nivoima olova). Podaci drevnih populacija otkrili su visoku rasprostranjenost defekata hipoplastične gleđi kod populacije koja je imala visoke nivoe olova u kostima i zubima [67].

Neke studije upućuju na to da postoji povezanost između prisustva olova u dentalnom tkivu i kliničkih promjena u gleđi. Takve promjene se mogu povezati sa diskoloracijom. Međutim, ove studije nisu bile dovoljne da bi se utvrdila jasna povezanost između prisustva olova i takvih oštećenja gleđi [33].

Zubi sa povećanim sadržajem olova takođe pokazuju povećanu abraziju i diskoloraciju jer je poroznija struktura gleđi osjetljivija na abraziju i upijanje egzogenih pigmenata [11].

Potvrđeno je takođe da je hipoplazija gleđi povećana kod djece izložene visokim koncentracijama olova [12].

Interesantno je da je kod sjekutića pacova izloženih olovu, uočeno odloženo nicanje sjekutića. Povećanje proteina u matriksu gleđi ovih pacova, moglo bi se povezati sa efektom zaustavljanja rasta. Oovo je citotoksični agens i promjene u količini proteina i kašnjenje u amelogenezi bi mogli biti povezani sa direktnim djelovanjem olova na ameloblaste. Rezultati ukazuju na to da mineralizacija kasni zbog izlaganja olovu [28].

*Gerlach* i saradnici se ispitivali formiranje gleđi kod pacova koji su unosili ovo u vodi za piće, a gleđni matriks, je korišten za ispitivanje koncentracije proteina i određivanje njene mikrotvrdoće. Povećana koncentracija proteina je uočena kod pacova koji su pili vodu sa olovom. Ovim rezultatima se došlo do zaključka da je oovo povećalo koncentraciju proteina, a usporilo stvaranje gleđi (mineralizaciju) kod sjekutića pacova koji su pili olovnu vodu, s tim da toksično dejstvo olova nije ispitivano [87].

*In vitro* studije su pokazale da prisustvo olova u toku amelogeneze može dovesti do promjena kod ultrastrukture gleđi, dovodeći do toga da su ameloblasti veoma osjetljivi na promjene u okruženju. Ove promjene mogu biti povezane sa modifikacijama u fizičko-hemijskom odnosu u gleđi, što može učiniti osjetljivijim na demineralizaciju [71].

#### 1.1.4.4. UTICAJ OLOVA NA PULPU ZUBA I NASTANAK KARIJESA

*Thaweboon* i saradnici (2002) su ispitivali djelovanje olova na pulpno tkivo koristeći ćelije pulpe-fibroblaste, humanih zuba *in vitro*. Studija je pokazala da su sve primjenjene koncentracije olova značajno uticale na povećanu proliferaciju ćelija pulpe pri čemu je produkcija proteina, prokolagena i osteokalcina bila značajno umanjena odnosno zubi u ovoj studiji su ukazali i potvrdili toksično djelovanje olova [88].

*Er* i saradnici su (2015) u svojoj studiji ispitivali uticaj olova i njegovo toksično dejstvo na sjekutićima pacova, pomoću patohistološke i imunohistohemijske analize. Analizirani su uzdužni presjeci, ekstrahovanih donjih sjekutića pacova i uočene degeneacije u periodontalnim membranama, vaskularne promjene u krvnim sudovima pulpe, vaskularne dilatacije pulpe, zapaljenske infiltracije ćelija a protein vementin (zastupljen u mezenhimskim ćelijama) uočen je u pulpi i periodontalnoj membrani. Odontoblastni procesi u dentinskim tubulama su bili pozitivni, a dentinski tubuli su bili redukovani (smanjeni) i neorganizovani. Istraživači su se i ranije bavili proučavanjem dejstva olova na pulpu zuba tako što su kultivisali (zasijavali) ćelije pulpe [89].

Tako je *Yamamura* (1985) sa saradnicima, uspješno kultivisao fibroblaste iz pulpe zuba i posmatrao funkciju fibroblasta i da se pretvaraju u odontoblaste i formiraju dentin kao reakciju na nadražaje [90].

Kako ovdje nije došlo do značajnih rezultata vezanih za promjene na ćelijama pulpe zuba pod dejstvom olova, *Nakanishi* i saradnici su u svojoj studiji promatrati primarne ćelije pulpe na zasijanoj kulturi pomoću enzimskog razdvajanja tripsina i kolagenaze i uočeno je da su primarne ćelije pulpe na kulturi bile gotovo iste kao ćelije pulpe u uslovima *in vivo*. Ovaj enzimski metod odvajanja može biti od koristi studijama zasnovanim na ispitivanju metabolizma pulpe i diferencijacije odontoblasta. *Nakanishi* i saradnici su nastavili zasijavati kulture ćelija pulpe i to ćelije pulpe govečeta, gdje su proučavali ekspresiju specifičnih gena tokom diferencijacije ćelija pulpe (odontoblaste) u preodontoblaste. Poslije 14 dana od eksperimenta, uočena je povećana ekspresija fibronektin i kolagena tipa I i III i alkalne fosfataze dok je osteokalcin (kao marker za preodontoblaste) samo kratko uočen prije mineralizacije. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 je smanjena poslije 21. dana kad je povećana ekspresija alkalne fosfataze (imhibitor TGF- $\beta$ 1).

Rezultati su ukazali na ulogu TGF- $\beta$ 1 u ekspresiji gena ECM i u na diferencijaciju ćelija pulpe u preodontoblaste [91].

*Abdullah* i saradnici su se bavili ispitivanjem matičnih ćelija iz mlječnih i stalnih zuba, periodontalnih ligamenata i koštane srži, kako bi poslije 24 sata utvrdi da li oovo negativno utiče na proliferaciju, diferencijaciju, odnosno ekspresiju gena kod matičnih ćelija. Ovom studijom se došlo do zaključka da izlaganje olovu ne utiče samo na karakteristike fenotipova ćelija, već izaziva i značajne promjene u diferencijaciji ćelija i ekspresiji gena u ćelijama [92].

#### 1.1.4.4.1. UTICAJ OLOVA NA NASTANAK ZUBNOG KARIJESA

Zubi se smatraju pogodnim biomarkerima za određivanje izlaganja metalima, posebno olovu. Jedno od istraživanja je pokazalo da je sadržaj metala u Zubima (kod stanovništva zagađenih oblasti olovom) povezan sa povećanom incidencijom karijesa. Međutim, povezanost uticaja olova i nastanka karijesa u tvrdim zubnim tkivima, još uvijek je predmet brojnih istraživanja [27].

Poslednjih decenija, mnogi epidemiolozi su zainteresovani za provjeru sadržaja olova u Zubima odnosno provjeru da li su djeca koja žive u zagađenim oblastima podložnija karijesu [6].

Moss i saradnici su potvrdili svojom studijom povezanost između izloženosti olova u vrijeme obrazovanja dentina i povećane zastupljenosti karijesa [65].

Veza između uticaja olova u djetinjstvu i nastanka karijesa kod djece je ispitivano još prije trideset godina, gdje je uočena korelacija ali sa različitim rezultatima o koncentraciji olova u hrani, vodi, kosi, Zubima ili u krvi [46].

*Martin* i saradnici (2007) su se bavili ispitivanjem uticaja olova na organizam i na nastanak karijesa zuba kod zdrave djece. Studija je obuhvatala djecu od 8-12 godina i ispitivan je odnos između karijesa i olova i kod mlječnih i kod stalnih zuba. Veza između olova i nastanka karijesa je uočena samo kod mlječnih zuba. U ovoj studiji nije pronađena veza između olova i poremećaja ponašanja i koeficijenta inteligencije u ovoj populaciji [93].

Pored osjetljivosti mlječnih zuba na izloženost teškim metalima, kod stanovništva zagađenih oblasti olovom uočena je povećana osjetljivosti zuba na karijes. U skorije vrijeme, *Tvinnereim* i saradnici su kroz studiju uočili vezu izmedju izlaganja olovu u trenutku formiranja dentina i 40% povećanja u osjetljivosti na karijes kod zuba pacova [94].

Neki autori su u svojim istraživanjima pronašli vezu između izlaganja olovu i njegovog ugrađivanja u zube u razvoju i 40% povećanje prevalencije karijesa kod zuba pacova, ali ova veza nije dovoljno razjašnjena [45].

Zbog neslaganja u literaturi i nedovoljnih podataka na ovu temu, u Brazilu su obavljena epidemiološka istraživanja kako bi se utvrdila povezanost između prisustva olova u dentalnoj gleđi, oštećenja gleđi i karijesa kod mlijecnih zuba. Tako su Gomes-a i saradnici imali za cilj procijeniti povezanost između koncentracije olova u gleđi mlijecnih zuba i prisustva oštećenja gleđi, a samim tim i karijesa dentina među predškolskom djecom. Nije pronađena nikakva povezanost između olova i dentalnog karijesa u industrijskoj zoni što naglašava potrebu za većim brojem studija koje bi istraživale ovakve povezanosti [78].

*Cenić-Milošević* i saradnici su (2013.), takođe imali za cilj da utvrde korelaciju između koncentracije olova u izvađenim zubima stanovnika Pančeva i Beograda kod pripadnika različitih starosnih grupa. Zaključeno je da je jedan od mogućih uzroka gubitka zuba i karijesnih oštećenja upravo dugotrajna izloženost životnoj sredini zagađenoj olovom [95].

Oovo spada u grupu toksičnih mikrolemenata, zbog svog štetnog dejstva gotovo na sve organe i tkiva. Smatra se da takvo dejstvo ima i na zubna tkiva, mada se rezultati pojedinih istraživanja razlikuju. Tako su *Barmes* i *Ludmgh* (1977), ustanovili korelaciju koncentracije olova u zubima i zubnog kvara, u tom smislu da su ispitanici sa visokim koncentracijama olova imali veći broj karijesnih zuba u odnosu na ispitanike sa nižim nivoom olova [96].

*Brudevold* je ispitivao koncentraciju olova u gleđi djece, koja su živjela na području bogatim olovom, u odnosu na djecu koja su živjela u sredini koja nije bila zagađena ovim elementom. Ustanovio je da u gleđi djece na području zagađenim olovom, ima značajno više ovog mikroelementa. Takođe je ustanovio da ova djeca imaju više karijesnih zuba u odnosu na djecu iz nezagađenog područja [97].

Međutim, *Curzon* i *Losee* nisu uočili zavisnost sadržaja olova u zubnim tkivima i karijesa [98].

U istraživanjima *Vulovića* nije ustanovljena jasna korelacija sadržaja olova u zubima i zubnog kvara [99].

#### **1.1.4.5. ZNAČAJ OLOVA KAO BIOMARKERA ZA STEPEN IZLOŽENOSTI ORGANIZMA OLOVU**

Poznato je, da su kod ljudi, koji su hronično izloženi  $0,75 \mu\text{g}$  olova, vidljive promjene u kostima i zubima kao i kod djece u rastu i razvoju. Osnova toksičnosti olova ogleda se u tome da se metalni kation veže sa posebnim ligandima biomolekularnih supstanci, koje su neophodne za različite fiziološke funkcije jona [9,11].

Zub je koristan marker za dugotrajnu evidenciju o distribuciji olova, o čemu govore mnoga epidemiološka istraživanja. Oovo utiče na nastanak karijesa, a djeca intoksicirana olovom, imaju veoma visok nivo olova ugrađen u dentin u blizini pulpe [29].

Godinama je biološki marker interne doze olova u organizmu bio eritrocitni protoporfirin i koncentracija olova u celokupnoj krvi. Međutim pokazalo se da su nepouzdani pokazatelji olova u organizmu, jer im poluživot (EP i PbB) iznosi svega 30 - 35 dana [45].

Još davne 1979. godine vjerovalo da su zubi i kosti mjesto depoa olova, a da su molari pacova u ovom pogledu slični ljudskim mlijecnim zubima [57].

Efekat različitih koncentracija primjenjivanja olova, samog ili u kombinaciji sa drugim elementima na tvrda zubna tkiva pacova je ispitivano još 1980.godine [34].

Za zubna tkiva se već zna da apsorbuju teške metale iz zagađene sredine i to najviše kod dječijih zuba u razvoju te se smatraju pogodnim biomarkerima za određivanje izloženosti metalima a posebno olovu. Veliki broj radova je rađen u cilju dokazivanja činjenice da koncentracija olova u zubima i kostima može biti vrlo precizan pokazatelj stepena izloženosti organizma olovu, odnosno marker nivoa zagađenosti životne sredine ovim elementom. Tako je u svim ovim radovima i dokazano da je koncentracija olova u zubima i kostima u pozitivnoj korelaciji sa količinom ovog toksičnog elementa u okolini [46].

#### **1.1.4.5.1. INTERAKCIJA OLOVA I DRUGIH TEŠKIH METALA SA KALCIJUMOM I OSTALIM ELEMENTIMA U LJUDSKOM ORGANIZMU**

Deficit esencijalnih elemenata povećava toksičnost teških metala, dok višak djeluje zaštitno. Veliki deo ovih istraživanja je rađen na laboratorijskim životinjama, dok su podaci na ljudima oskudni, ali uglavnom identični sa istim na životinjama. Neki teški metali mogu zamijeniti kalcijum u kristalima hidroksiapatita pa zato se procjena nivoa olova u zubu ne bi

trebala zasnovati samo na apsolutnom sadržaju ovog metala već i na njegovom odnosu prema kalcijumu. Takvi odnosi su reprezentativniji za relativne promjene u nivoima određenih metala [1-3].

Sa posebnom pažnjom je u istraživanjima ispitivan odnos olova i metabolizma bioelemenata. Naročito je značajna interakcija olova i kalcijuma, koja je već dugi niz godina predmet mnogih istraživanja. Rane studije ovog problema ukazuju da je deponovanje olova u kosti i meka tkiva značajno veće u uslovima deficita kalcijuma u hrani što je potvrđeno i od strane drugih istraživača. Deponovano oovo u čvrstim tkivima, po mnogim autorima, ne mora predstavljati opasnost za organizam, niti mora da ispolji toksične efekte u njima sem u slučajevima nagle mobilizacije i prelaska u krv, usled određenih fizioloških ili patoloških procesa [45].

*Yu i saradnici* su u svojoj studiji ispitivali uz pomoć atomske apsorpcione spektrofotometrije koncentraciju teških metala (Fe, Zn, Pb, Cu, Mn, Cr) u alveolarnoj kosti vilica i u gleđi zuba kod pacova pod uticajem lipolinske kiseline. Lipolinska kiselina je povećala koncentraciju Cu, Mn i Cr u kostima, a smanjila Cu i Mn u gleđi i takođe smanjila sadržaj Zn, Pb i Fe. Ova studija je dokazala da unos lipolinske kiseline istovremeno sa solima metala dovodi do usklađivanja ravnoteže nakupljanja metala u tvrdim tkivima [100].

*Malara* je ispitivao sadržaj olova i kadijuma iz duvanskog dima djece pušača u mlijekočnim zubima odnosno njihov odnos sa kalcijumom, pomoću atomske apsorpcione sektrofotometrije. Studija je utvrdila da su toksični teški metali koji se skupljaju u zubu, ostali u dinamičnom balansu sa normalnim sadržajem zuba, npr. teški metali su zamjenili kalcijum u hidroksiapatičnim kristalima koji predstavljaju strukturne jedinice kalcificiranih tkiva [101].

Uočeni viši nivoi olova u krvi u prethodnim studijama kod djece koja žive u zajednicama koje piju vodu tretiranu (obogaćenu) fluoridima, podstakla je *Sawani-a* i saradnike (2010) da ispitaju da li fluoridi u kombinaciji sa olovom, povećavaju nivo olova u krvi i u kalcifikovanim tkivima i zubima, ženki pacova i njihovih mladunaca Vistar soja, izloženih ovom metalu od početka trudnoće. Rezultati ove studije ukazuju da fluoridi povećavaju koncentraciju olova u cjelokupnoj krvi, kostima i zubima pacova [102].

*Baranowska-Bosiacka* je sa saradnicima (2008) ispitivala dejstvo suplementa melantonina na mužjake Vistar soja koji su od rođenja do polne zrelosti uzimali oovo-acetat u vodi za piće i melatonin u hrani. Vrijednost Pb, Ca i Mg u zubima je mjerena atomskom

apsorpcionom spektrofotometrijom. Kod pacova koji su uzimali i olovo i melantonin, uočeno je značajno povećanje olova u krvi, kostima i zubima [1].

Postoje prepostavke da međusobno djelovanje olova sa kalcijumom može da ometa normalne regulativne procese kalcijuma, kao npr. vezivanje kalcijuma, vanćelijska međusobna djelovanja proteina povezanih sa mineralnim tkivima i podćelijske funkcije na nivou mitohondrija i membrane vezikula [3].

Dok razni faktori mogu uticati na sadržaj teških metala u čvrstim tkivima zuba, istraživanja su se fokusirala na ispitivanje sistemskih oboljenja koja zahtijevaju dugoročna liječenja uz restriktivne dijete. Kod pedijatrijskih pacijenata takva oboljenja uključuju celjakliju i alergije na hranu [6].

Dugoročno uvođenje restriktivnih dijeta povezano je sa nedostatkom minerala kod djece i promjenama u mineralnom sadržaju tkiva kosti i zuba pa ove promjene mogu dovesti do povećanog nakupljanja toksičnih metala, kao sto su olovo, kadijum, stroncijum, živa i arsen u tijelu [45].

*Orzechowska-Wylegała* i saradnici su (2011) ispitivali relativnu koncentraciju olova, kadijuma i kalcijuma u mlijecnim zubima djece sa celjaklijom ili alergijom na hranu, iz industrijskih oblasti. Ova studija je došla do rezultata da u mlijecnim zubima djece sa celjaklijom i alergijama na hranu, postoji izmjenjen odnos između olovo/kalcijuma i kadimijum/kalcijuma nego u zubima zdrave djece [103].

## 2. HIPOTEZA

**Radne hipoteze istraživanja su:**

- Olovo utiče na ekspresiju medijatora odontogeneze-fibronektina, tenascina-C i TGF- $\beta$ 1 u pulpi.
- Dijabetes značajno mijenja ekspresiju medijatora odontogeneze-fibronektina, tenascina-C i TGF- $\beta$ 1.
- Olovo se intenzivno odlaže u gleđi i dentinu zuba pacova.

**3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

**Osnovni cilj** istraživanja bio je da se ispita koncentracija olova u tvrdim zubnim tkivima i uticaj olova na medijatore odontogeneze u pulpi eksperimentalnih životinja.

**Bliži ciljevi** istraživanja bili su :

- 1.) Da se imunohistohemijskom analizom odrede ekspresije medijatora odontogeneze fibronektina, tenascina i TGF-  $\beta$ 1 faktora u pulpi zuba pacova sa eksperimentalno izazvanim DM-om nakon izlaganja olovu 14 dana.
- 2.) Da se imunohistohemijskom analizom odrede ekspresije medijatora odontogeneze fibronektina, tenascina-C i TGF-  $\beta$ 1 faktora u pulpi zuba pacova nakon izlaganja olovu 30 dana.
- 3.) Da se formira skala ekspresije medijatora fibronektina, tenascina-C i TGF- $\beta$ 1, kod zdravih životinja kod kojih pulpa nije stimulisana.
- 4.) Da se SEM/EDS analizom odredi koncentracija olova u tvrdim zubnim tkivima pacova sa eksperimentalno izazvanim DM-om, nakon 14 dana izaganja životinja olovu.
- 5.) Da se SEM/EDS analizom odredi koncentracija olova u tvrdim zubnim tkivima pacova , nakon 30 dana izlaganja životinja olovu.

## **4. MATERIJAL I METOD RADA**

### **4.1.Uzorak**

Za uzorak su odabrani pacovi Wistar soja, zbog velike sličnosti u fiziologiji pulpe zuba pacova sa fiziologijom pulpe humanih zuba.

Eksperiment je obuhvatao 42 laboratorijska pacova Wistar soja odnosno 682 zuba. Studija je sprovedena u *vivarijumu* Prirodno-matematičkog fakulteta u Banjaluci (odobreno od strane Etičkog komiteta Zavoda za stomatologiju).

#### **4.1.1. Uzgoj i držanje eksperimentalnih jedinki**

Životinje su bile stare dva mjeseca a tjelesna težina im je iznosila od 150-200 g. Pacovi su držani u grupnim pleksiglas kavezima, na 12 časovnom režimu svjetlosti (07.00-19.00) pri temperaturi vazduha 22°C ( $\pm 2$ ) i vlažnost 60%  $\pm 10\%$ , gdje su imali slobodan pristup hrani i vodi tokom trajanja eksperimenta .

Početkom eksperimenta individue su odvojene u odgovarajuće testne i kontrolne grupe. Omogućen im je period adaptacije u trajanju od 15 dana, nakon čega je započet tretman.

#### **4.1.2. Eksperimentalne grupe**

Pacovi su podijeljeni u dvije grupe:

**A1 GRUPU** je činilo 16 pacova (256 molara i premolara gornje i donje vilice) sa eksperimentalno izazvanim DM-om koji su uzimali olovo tokom 14 dana u koncentraciji od 1500 ppm

**A2 GRUPU** je činilo 16 pacova (256 molara i premolara gornje i donje vilice) koji su uzimali olovo tokom 30 dana u koncentraciji od 1500 ppm

#### 4.2. Primjenjeni protokol za eksperimentalno indukovani diabetes mellitus kod pacova:

U A1 grupi 16 pacova je izvagano i zabilježena je njihova tjelesna težina. Svakoj životinji je određen nivo šećera u krvi prije početka eksperimenta. Glikemija je mjerena aparatom za mjerjenje glikemije (ACCU ACEH, Roche) iz krvi repne vene. Rastvor Alloxana-a je dobijen rastvaranjem 100mg praha u 10 ml fiziološkog rastvora i potom aplikovan intraperitonealno u dozi 100 mg na kilogram tjelesne težine pacova. Protokol je ponavljan sve dok izmjerena vrijednost glikemije nije prešla 200mg/dcl (životinja u hiperglikemiji). Alloxan djeluje na ciljne ćelije ( $\beta$  ćelije pankreasa) toksično i uništava ih. Međutim, ova oštećenja pankreasa kod pacova, su reverzibilna zbog izuzetne regenerativne sposobnosti ćelija pankreasa pa je neophodna kontrola vrijednosti glukoze u krvi pacova. Postignuta hiperglikemija je kontrolisana redovnim mjerjenjem.

**KONTROLNU B GRUPU** je činilo 10 zdravih pacova (160 molara i premlara gornje i donje vilice).

#### 4.3. Protokol za intoksikaciju olovom

Radi proučavanja uticaja olova na distribuciju medijatora dentinogeneze u pulpi zuba pacova, urađena je intoksikacija adultnih pacova olovnim-acetatom u koncentraciji od 1500 ppm putem vode *ad libitum*. Intoksikacija je u jednoj grupi trajala 30 dana a u drugoj grupi 14 dana.

Sve procedure na životnjama, njegovanje, eksperimentalni retman, žrtvovanje bez bola i stresa izvedeni su u skladu sa Smjernicama za brigu o životnjama u eksperimentalnim istraživanjima („*Guide for the Care and Use Laboratory Animals*“, 1996 National Academy Press, Washington, DC).

Životinje su žrtvovane dekapitacijom pod dubokom eterskom anestezijom. Nakon dekapitacije, gornjovilične kosti su odvajane od mekih tkiva (hirurškim skalpelom i makazama) a zatim pohranjene u fiksativ (10% neutralni puferovani formalin).

U ovoj fazi eksperimenta polovina uzorka je dostavljena u laboratoriju Zavodu za patologiju Kliničkog centra u UKCRS, gdje je urađena priprema za patohistološku i imunohistohemijsku analizu.

#### 4.4. Histološka analiza

Kosti gornjih vilica su zajedno sa zubima nakon 48 h fiksacije (u 10% neutralnom puferovanom formalinu) dekalcifikovane u rastvoru azotne kiseline (ne duže od 90 minuta). Dekalcifikovani (razmekšani) uzorci su potom isprani tekućom vodom i obrađeni u automatizovanom tkivnom procesoru Leica TP 1020 (Leica Byosystems) po standardnom protokolu; dehidracija u rastućim koncentracijama etil alkohola (70%,96%,100%) ; bistrenje u ksilolu, impregnacija tečnim parafinom), nakon čega su odabrani uzorci zuba ukalupljeni u parafinske blokove.

Nakon hlađenja, parafinski blokovi su i za histološku i za imunohistohemijsku analizu sječeni na kliznom mikrotomu (Leica SM 2000R, Leica Byosystems) na presjeke debljine 4-5  $\mu\text{m}$ .

Za histološku analizu, poprečni presjeci molara dobijeni u nivou zubne pulpe su sakupljeni na odgovarajuća predmetna stakalca i sušeni na 60°C. U procesoru za automatsko bojenje (Leica ST4040 Linear stainer, Leica Byosystems) tkivni presjeci su deparafinisani, rehidrirani i ispirani u destilovanoj vodi. Nakon toga su obojeni standardnom metodom hematoksilin - eosin (HE). Definitivni preparati su analizirani svjetlosnim mikroskopom (Leica DM 2500, Leica Byosystems).

#### 4.5. Imunohistohemijska analiza

Za imunohistohemijsku analizu, tanki presjeci mekog tkiva zubne pulpe su sakupljeni na pozitivno nanelektrisana Super Frost predmetna stakla (Menzel-glaser). Nakon deparafinizacije i rehidratacije tkivnih presjeka imunohistohemijsko bojenje je nastavljeno blokiranjem aktivnosti endogene peroksidaze. Reakcija je obavljena inkubacijom tkiva u 3% rastvoru vodonik peroksidu 10 minuta na sobnoj temperaturi. Po isteku vremena, vodonik peroksid je ispran destilovanom vodom a procedura nastavljena enzimskim demaskiranjem ciljnih antigena. Za demaskiranje su korišteni enzimimi ready to use formata: tripsin za fibronektin, pepsin za TGF  $\beta$ 1 (oba Thermo Fisher Scientific Fremont USA) i proteinaza K za tenascin ( DAKO Corporaion USA). Enzimska digestija je izvođena 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga su presjeci tkiva isprani destilovanom vodom a zatim i TBS puferom (Tris buffered saline) pH 7,4.

Da bi se izbjeglo pozadinsko bojenje i smanjilo nespecifično bojenje endogenih IgG pacova, tkivni presjeci su poslije ispiranja enzima a prije dodavanja primarnog antitjela tretirani komercijalnim otopinama za blokiranje nespecifičnih reakcija: Rodent Block R ( Biocare Medical, USA) za fibronektin, a Ultra V Block (Thermo Fisher Scientific ) za tenascin i TGF  $\beta$ 1. Po isteku inkubacionog vremena (5-15 minuta) ove otopine su laganim protresanjem stakla uklonjene sa tkivnih presjeka.

Na tako pripremljenim tkivima imunohistohemijska detekcija ciljnih antigena je izvedena reakcijom peroksidaze hrena primjenom odabralih antitjela:

1. Poliklonalno zečije Anti-Fibonektin antitjelo

*(Rabbit polyclonal Anti-Fibronectin antibody, PA1-23693, Thermo Fischer Scientific )*

2. Monoklonalno mišije Anti Tenascin antitjelo, klon 4C8MS

*(Mouse monoclonal Anti Tenascin antibody, Clone 4C8MS, MA5-16086 Thermo Fischer Scientific*

3. Poliklonalno zečije Anti-TGF  $\beta$ 1, N Terminal-no antitjelo

*(Rabbit polyclonal Anti-TGF  $\beta$ 1, N-Terminal antibody, SAB4502954-100UG Sigma )*

Prema uputstvu proizvođača, primarna antitjela su sa komercijalnim rastvaračem antitjela (UltraAb Diluent, Thermo Fisher Scientific, USA) razrijeđena u omjerima; fibronektin 1:100, tenascin 1:150 i TGF  $\beta$ 1:100.

Optimalno razrijeđena antitjela su aplicirana na tkiva i ostavljena da stoje preko noći u frižideru na 4°C. Po isteku inkubacije, naredni dan višak antitijela je ispiran TBS puferom (Tris buffered saline) pH 7,4.

Specifičnost interakcije između primarnih antitjela i njihovih antigenih determinanti je detektovana primjenom osjetljivih detekcionih sistema komponovanih od anti-mišijih i/ ili anti-zečijih IgG konjugovanih sa peroksidazom hrena. Za vizualizaciju fibronektina korišten je EnVision+ Single Reagents /HRP Rabbit ( Dako Corporation USA), za tenascin, Lab Vision™ UltraVision™ LP Detection System: HRP Polymer, a za TGF-  $\beta$ 1 Ultravision Quanto Detection System HRP/ DAB (oba Thermo Fisher Scientific, USA). Inkubacija svakog polimernog sistema je trajala 30 minuta. Izvedena je na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori, nakon čega

su tkiva isprana TBS puferom. Specifično imunobojenje je postajalo vidljivo nakon petominutne inkubacije sa 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride hromogenom (DAB hromogenom).

Nastali kompleks između tkivnog antiga i njemu kompatibilnog antitijela razvije smeđu boju u cilju detekcije pozitivne imunološke reakcije. Nakon ispiranja viška hromogena za prikaz kompletne tkivne strukture presjeci tkiva su kontrastirana Maier-ovim hematokilinom (30 sekundi), isprana vodom, dehidrirana u rastućoj koncentraciji etanola (70%, 90% i 100%), izbistrena u ksilolu i trajno uklopljena u kanada balzam. Nakon toga su gotovi preparati analizirani na svjetlosnom mikroskopu Leica DM2000 i fotografisani kamerom povezanom sa mikroskopom.

#### 4.6. Procjena ekspresije fibronektina, tenascina-C i TGF- $\beta$ 1

Ekspresija medijatora odontogeneze je utvrđivana u pulpi (rastresitom vezivnom tkivu pulpe, fibroblastima pulpe), odontoblastima, predentinu i dentinu (nastavcima odontoblasta-Tomesova vlakna koja su smještena u predentinu i dentinu). Interpretacija ekspresije je vršena na svim očuvanim poprečnim presjecima zuba u jednom uzorku. Procjena ekspresije istraživanih antitijela je rađena prema vlastitoj semikvantitativnoj skali prikazanoj u tabeli 1.

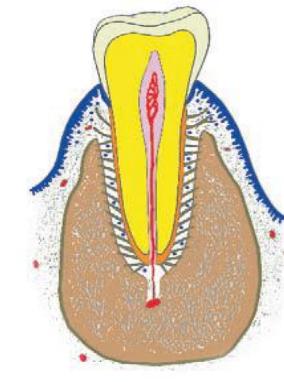
Tabela 1. Kriterijumi korišteni za semikvantifikaciju ekspresije

Ocjena	
0	odustvo bojenja, sve analizirane strukture bez bojenja
1	slaba ili umjerena, fokalna pozitivnost/ difuzna slaba pozitivnost
2	visoka fokalna pozitivnost / difuzna umjerena pozitivnost
3	difuzna visoka pozitivnost

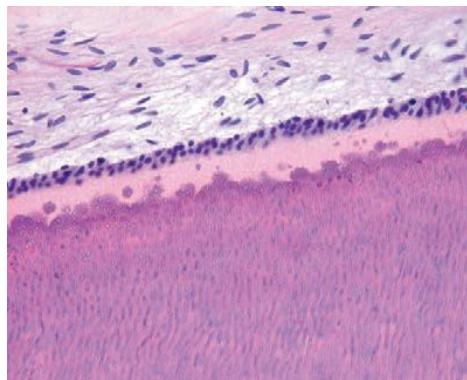
Na slikama od 1 do 7 prikazani su presjeci zubi i to makroskopski, šematski i makroskopski presjek, kao i histološki prikazi pulpe, gleđno-dentinske granice i periodontalnog ligamenta kod zdravog zuba.



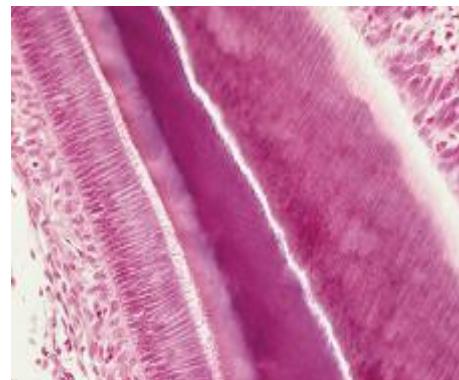
Slika 1. Makroskopski izgled zuba [112].



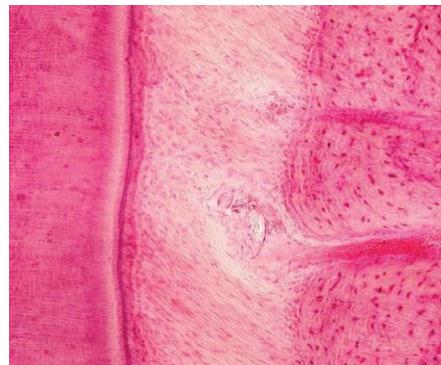
Slika 2. Šematski prikaz presjeka zuba [112].



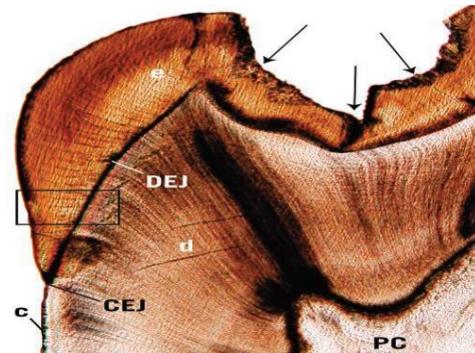
Slika 3. Histološka slika pulpe  
(predentin-dentin) [112].



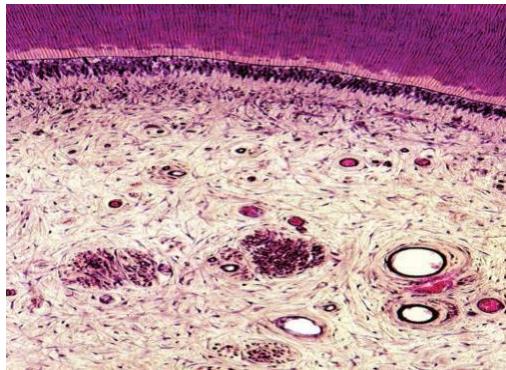
Slika 4. Histološka slika gleđno-dentinske granice  
[112].



Slika 5. Hiostološki preparat  
peridentalnog ligamenta [112].



Slika 6. Presjek humanog zuba [112].



Slika 7. Histološki preparat humane pulpe zuba [112].

Morfološke promjene u zubu pacova su tumačene na osnovu kriterijuma datog u tabeli 2.

Tabela 2. Morfološka interpretacija promjena u zubu pacova:

Gingiva	Morfološka promjena	Ameloblasti	Gled	Dentin	Odontoblasti	Pulpa
1 Pseudoepitelna hiperplazija 2. Periodontitis i gingivitis	1 (prisutne)	1 (prisutne)	1 (prisutne)	1 (prisutne)	1 (prisutne)	1. Pulpitis; 2. Krvarenje u pulpi; 3. Nekroza pulpe
0 (odsutne)	0 (odsutne)	0 (odsutne)	0 (odsutne)	0 (odsutne)	0 (odsutne)	0 (odsutne)

#### 4.7. SEM-EDS analiza

U ovoj studiji su nakon dekapitacije, gornjovilične kosti pacova odvajane od mekih tkiva (hirurškim skalpelom i makazama) a zatim pohranjene u fiksativ (10% neutralni puferovani formalin). U ovoj fazi eksperimenta materijal je dostavljen u Univerzitetski centar za skenirajuću elektronsku mikroskopiju u Novom Sadu, gdje je uradena priprema materijala za SEM-EDS analizu. Uzorke su činili zubi tj. premolari i molari iz grupe A1 (8 pacova tj.128 premolara i molara gornje i donje vilice), A2 (8 pacova tj.128 premolara i molara gornje i donje vilice) i B1 (5 pacova tj.80 premolara i molara gornje i donje vilice). Uzorci zuba pacova Wistar soja su sječeni i polirani dijamantskim diskom u ravni koja je prolazeći grebenima od meziolingvalnog ka distolingvalnom smijeru eksponirala poprečni presek zone gleđi i dentinske mase. Uzorci su sušeni i pripremani za SEM snimanja naparavanjem zlatom u postupku Ion Sputter Coating

uređajem Bal-Tec SCD 005. Naparavanje je sprovedeno strujom od 30mA u trajanju od 90 sekundi sa radnom distancom WD50mm i metom od čistog zlata(Au).

Snimanje i analize su vršene skening mikroskopom JEOL JSM 6460LV i priključenom OXFORD INCAx-sight spektralnom analizatoru.

Za potrebe ove analize slike su dobijene Back-scatterovanom ili Primarnom emisijom odbijenih elektrona u Compo modu (BEIc) jer se pokazalo da najkorisnije ističe zone gleđi i dentinske mase. Uzorci su posmatrani pri ubrzaju 20kV na radnoj distanci (WD) od 10 mm i pod upadnim uglom koji je bio primeren nagibu polirane površine premolara i molara. Opšti snimak dat je u preglednom uvećanju 35x, a za potrebe preciznije EDS analize upotrebljeno je uvećanje 100x.

#### 4.8. Statistička obrada podataka

Od podataka prikupljenih kliničkim i laboratorijskim istraživanjem formirana je datoteka u Microsoft Excelu iz koga je eksportovana u statistički programski paket IBM SPSS20 uz pomoć kojeg su podaci analizirani.

Od deskriptivnih statističkih metoda korišćeni su: frekvencija, procenat, aritmetička sredina, standardna devijacija, medijana, minimum i maksimum. Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su Hi-kvadrat test, Man Vitni U test i Spirmanova korelacija ranga. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

## 5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 5.1. Rezultati imunohistohemijske analize zuba pacova

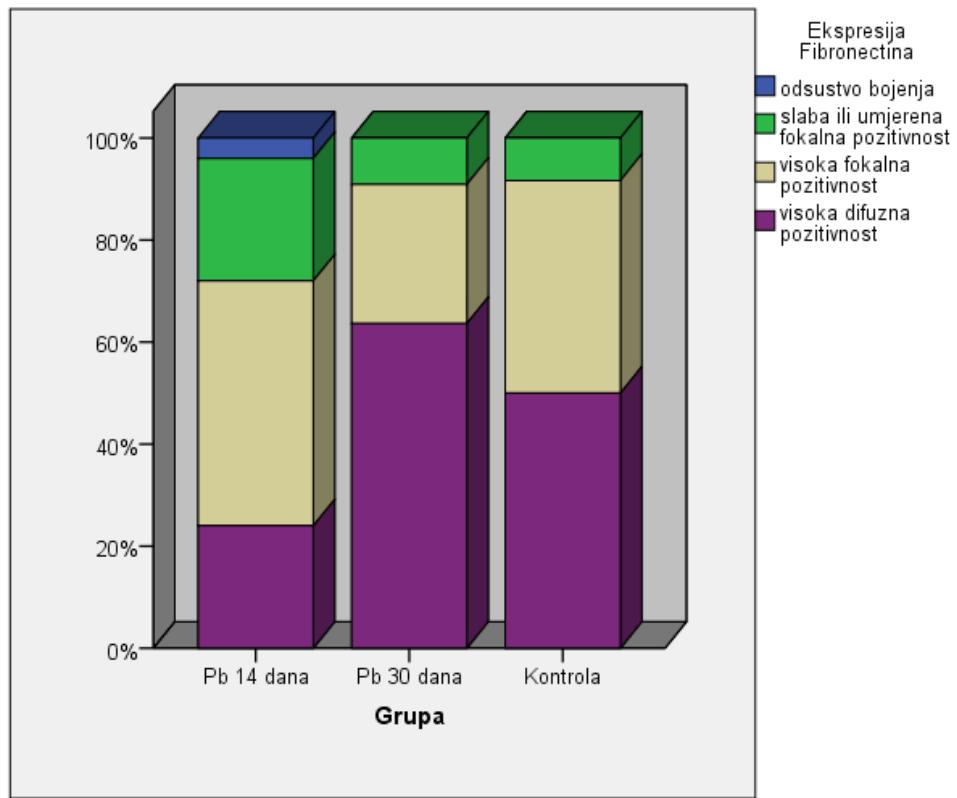
#### 5.1.1. Rezultati imunohistohemijske analize zuba pacova koji su dobijali olovo tokom 14 i 30 dana i kontrolne grupe

Dobijeni rezultati su prikazani u tabelama od 3 do 11 i slikama od 8 do 16.

Tabela 3. Ekspresija fibronektina u ispitivanim grupama

			Ekspresija Fibronektina				Ukupno
Grupa	Pb 14 dana	odsustvo bojenja	slaba ili umjerena fokalna pozitivnost	visoka fokalna pozitivnost	visoka difuzna pozitivnost		
		N	1	6	12	6	25
Grupa	Pb 30 dana	%	4.0%	24.0%	48.0%	24.0%	100.0%
		N	0	1	3	7	11
Grupa	Kontrola	%	0.0%	9.1%	27.3%	63.6%	100.0%
		N	0	1	5	6	12
Svega		%	0.0%	8.3%	41.7%	50.0%	100.0%
		N	1	8	20	19	48
		%	2.1%	16.7%	41.7%	39.6%	100.0%

U grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 14 dana visoka fokalna pozitivnost fibronektina je uočena u 48% slučajeva, slaba ili umjerena fokalna i visoka difuzna pozitivnost u po 24% dok je odsustvo bojenja registrovano u 4% slučajeva (tabela 3 i slika 8). U grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 30 dana visoka fokalna pozitivnost je uočena u 27.3% slučajeva, slaba ili umjerena fokalna i visoka difuzna pozitivnost u po 9.1% dok je odsustvo bojenja nije registrovano ni u jednom slučaju. (tabela 3 i slika 17). Nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji fibronektina između ispitivanih grupa ( $\chi^2$  = 6,864;  $p = 0,345$ ).

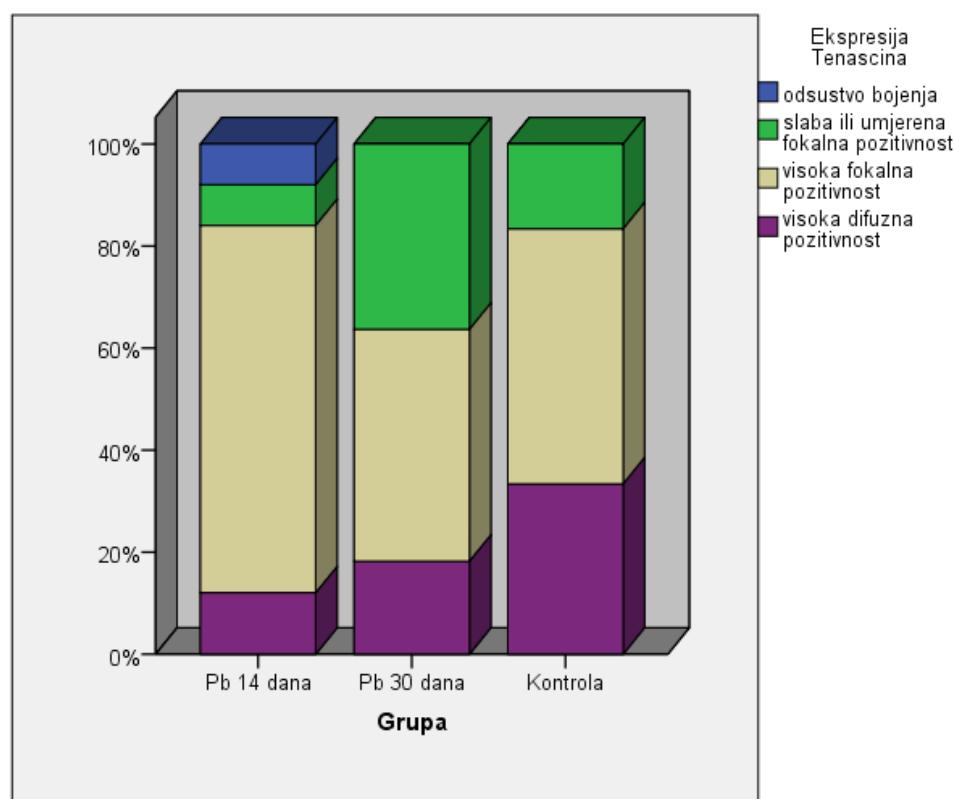


Slika 8. Grafički prikaz ekspresije fibronektina u ispitivanim grupama

Tabela 4. Ekspresija tenascina-C u ispitivanim grupama

Grupa		Ekspresija tenascina-C				Ukupno		
		odsustvo bojenja	slaba ili umjerena fokalna pozitivnost	visoka fokalna pozitivnost	visoka difuzna pozitivnost			
Svega	Pb 14 dana	N	2	2	18	3	25	
		%	8.0%	8.0%	72.0%	12.0%	100.0%	
	Pb 30 dana	N	0	4	5	2	11	
		%	0.0%	36.4%	45.5%	18.2%	100.0%	
	Kontrola	N	0	2	6	4	12	
		%	0.0%	16.7%	50.0%	33.3%	100.0%	
		N	2	8	29	9	48	
		%	4.2%	16.7%	60.4%	18.8%	100.0%	

U grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 14 dana visoka fokalna pozitivnost tenascina-C je uočena u 72,0% slučajeva, slaba ili umjerena fokalna u 8% i visoka difuzna pozitivnost u 12%, dok je odsustvo bojenja registrovano u 8% slučajeva (tabela 4 i slika 9). U grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 30 dana visoka fokalna pozitivnost je uočena u 45.5% slučajeva, slaba ili umjerena fokalna u 36.4% i visoka difuzna pozitivnost u 33.3%, dok je odsustvo bojenja nije registrovano ni u jednom slučaju (tabela 4 i slika 18). Nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji tenascina-C između ispitivanih grupa (Hi-kvadrat = 8,676; p = 0,195). Nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji tenascina-C između ispitivanih grupa (Hi-kvadrat = 8,676; p = 0,195).



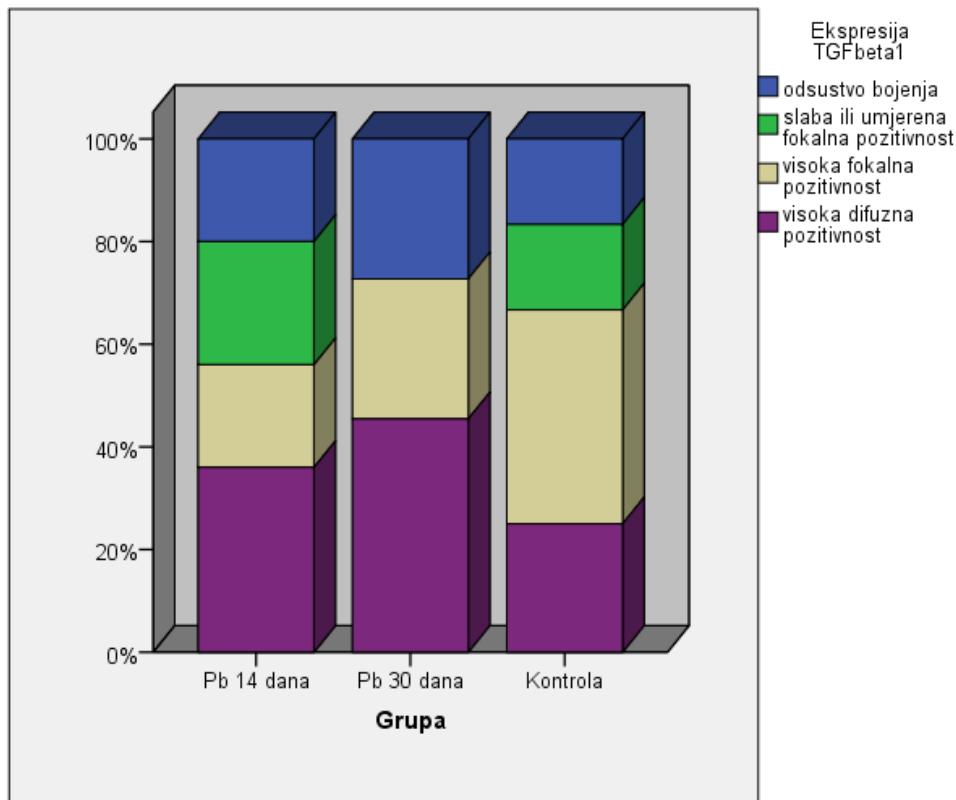
Slika 9. Grafički prikaz ekspresija tenascina-C u ispitivanim grupama

Tabela 5. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 u ispitivanim grupama

			Ekspresija TGF $\beta$ 1				Ukupno
Grupa	Pb 14 dana	odsustvo bojenja	slaba ili umjerena fokalna pozitivnost	visoka fokalna pozitivnost	visoka difuzna pozitivnost		
		N	6	5	9	25	
		%	20.0%	24.0%	20.0%	36.0%	100.0%
	Pb 30 dana	N	3	0	3	5	11
		%	27.3%	0.0%	27.3%	45.5%	100.0%
	Kontrola	N	2	2	5	3	12
		%	16.7%	16.7%	41.7%	25.0%	100.0%
	Svega	N	10	8	13	17	48
		%	20.8%	16.7%	27.1%	35.4%	100.0%

U grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 14 dana visoka fokalna pozitivnost TGF- $\beta$ 1 je uočena u 20,0% slučajeva, slaba ili umjerena fokalna u 24,0 % i visoka difuzna pozitivnost u 36,0 %, dok je odsustvo bojenja registrovano u 20,0 % slučajeva (tabela 5 i slika 10).

U grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 30 dana visoka fokalna pozitivnost je uočena u 27.3% slučajeva, slaba ili umjerena fokalna nije registrovana i visoka difuzna pozitivnost u 45.5%, dok je odsustvo bojenja registrovano u 27.3% slučajeva (tabela 5 i slika 10). Nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji TGF- $\beta$ 1 između ispitivanih grupa (Hikvadrat = 5,056; p = 0,563).



Slika 10. Grafički prikaz ekspresije TGF-β1 u ispitivanim grupama

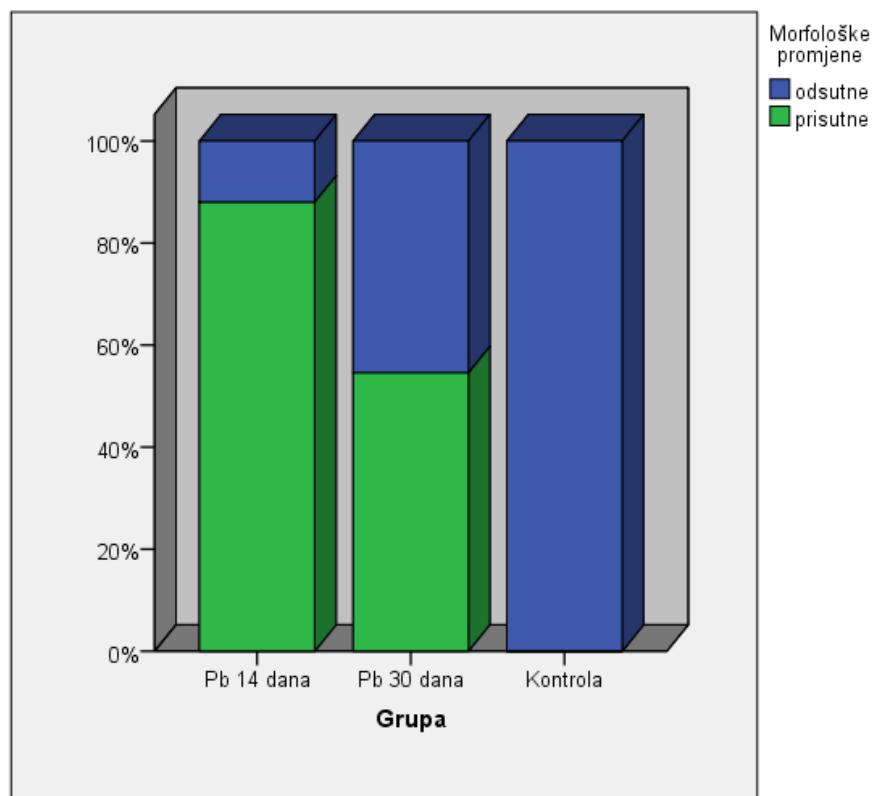
Tabela 6. Morfološke promjene u ispitivanim grupama

			Morfološke promjene		Ukupno	
			Odsutne	Prisutne		
Grupa	Pb 14 dana	N	3	22	25	
		%	12.0%	88.0%	100.0%	
	Pb 30 dana	N	5	6	11	
		%	45.5%	54.5%	100.0%	
	Kontrola	N	12	0	12	
		%	100.0%	0.0%	100.0%	
Svega		N	20	28	48	
		%	41.7%	58.3%	100.0%	

Analiza morfoloških promjena u pulpi zuba pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 14 dana je ukazala na postojanje ovih promjena u 88% slučajeva i odsustvo u 12% slučajeva

(tabela 6 i slika 20). U grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 30 dana prisustvo morfoloških promjena je uočeno u 54,5% a odsustvo u 45,5% slučajeva (tabela 6 i slika 11).

Uočeno je da postoji visoko statistički značajan razliku u prisustvu morfoloških promjena u ispitivanim grupama ( $\text{Hi-kvadrat} = 25,918$ ;  $p < 0,001$ ). Ni kod jednog pacova iz kontrolne grupe nije zabilježeno prisustvo morfoloških promjena.

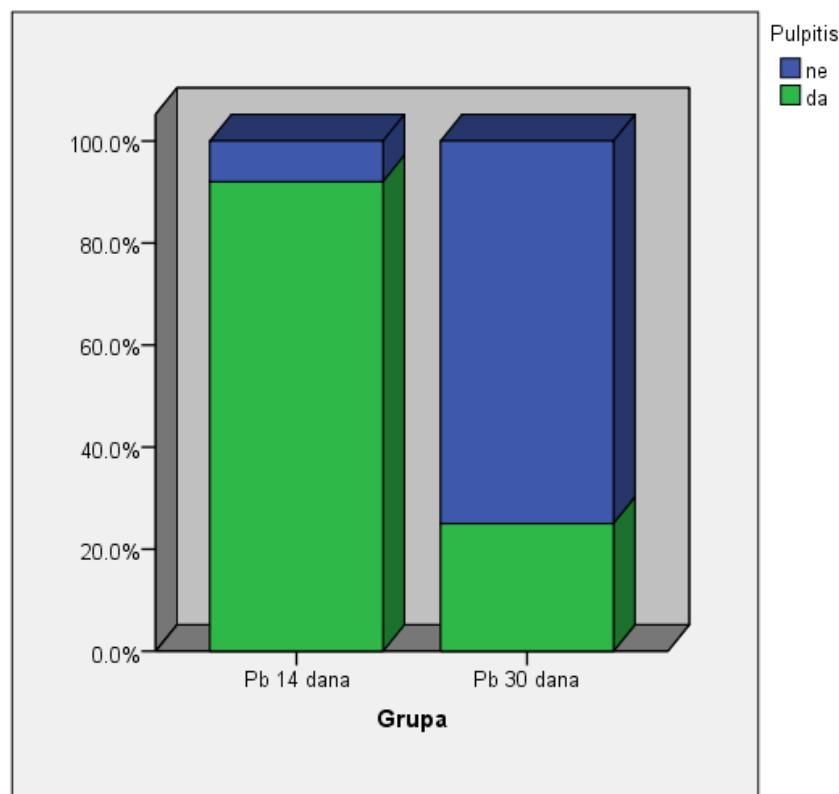


Slika 11. Grafički prikaz morfoloških promjena u ispitivanim grupama

Tabela 7. Učestalosti zapaljenja pulpe u ispitivanim grupama

			Pulpitis		Ukupno	
			Ne	Da		
Grupa	Pb 14 dana	N	2	23	25	
		%	8.0%	92.0%	100.0%	
	Pb 30 dana	N	9	3	12	
		%	75.0%	25.0%	100.0%	
Svega		N	11	26	37	
		%	29.7%	70.3%	100.0%	

Analiza zapaljenja pulpe zuba pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 14 dana je ukazala na postojanje ovih promijena u 92% slučajeva i odsustvo u 8% slučajeva. U grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 30 dana prisustvo morfoloških promijena je uočeno u 25% a odsustvo u 75% slučajeva. Postoji visoko statistički značajna razlika u učestalosti pulpitis između ispitivanih grupa ( $\text{Hi-kvadrat} = 17,422$ ;  $p < 0,001$ ) (tabela 7 i slika 12).

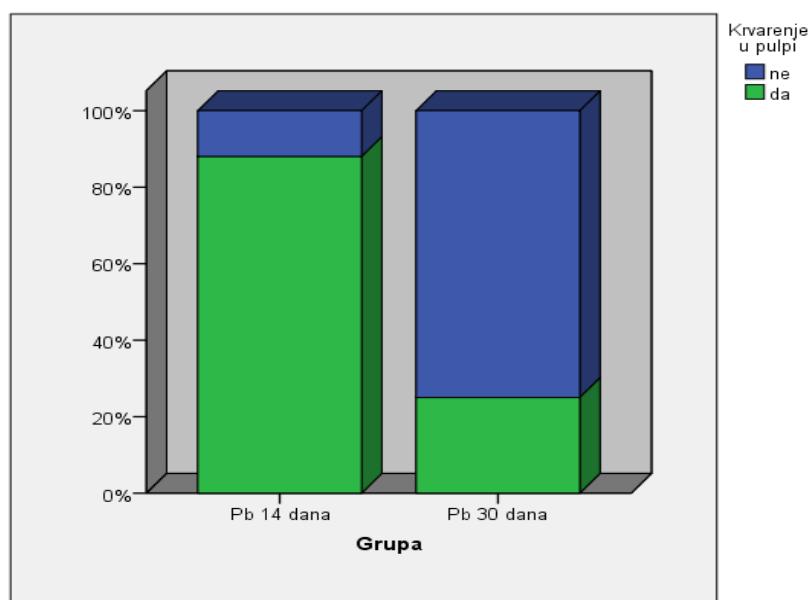


Slika 12. Grafički prikaz učestalosti pulpitis u ispitivanim grupama

Tabela 8. Krvarenje u pulpi u ispitivanim grupama

			Krvarenje u pulpi		Ukupno	
			Ne	Da		
Grupa	Pb 14 dana	N	3	22	25	
		%	12.0%	88.0%	100.0%	
	Pb 30 dana	N	9	3	12	
		%	75.0%	25.0%	100.0%	
Svega		N	12	25	37	
		%	32.4%	67.6%	100.0%	

Analiza krvarenja u pulpi zuba pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 14 dana je ukazala na postojanje krvarenja u pulpi u 88% slučajeva odsustvo u 12% slučajeva. U grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 30 dana prisustvo krvarenja u pulpi je uočeno u 25% a odsustvo u 75% slučajeva. Postoji visoko statistički značajna razlika u učestalosti javljanja krvarenja u pulpi između ispitivanih grupa ( $\chi^2$ -kvadrat = 14,685;  $p < 0,001$ ) (tabela 8 i slika 13).

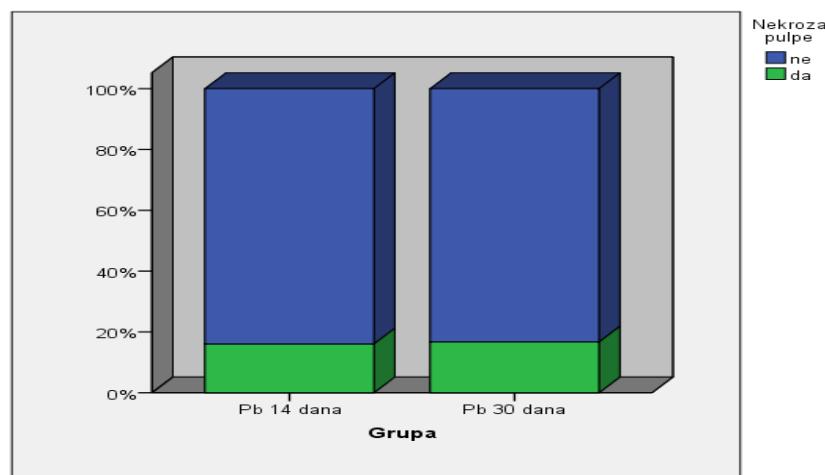


Slika 13. Grafički prikaz krvarenja u pulpi u ispitivanim grupama

Tabela 9. Nekroza pulpe u ispitivanim grupama

			Nekroza pulpe		Ukupno	
			Ne	Da		
Grupa	Pb 14 dana	N	21	4	25	
		%	84.0%	16.0%	100.0%	
Svega	Pb 30 dana	N	10	2	12	
		%	83.3%	16.7%	100.0%	
			31	6	37	
			83.8%	16.2%	100.0%	

Analiza nekroze u pulpi zuba pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 14 dana je ukazala na postojanje nekroze u pulpi u 16 % slučajeva odsustvo u 84% slučajeva. U grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 30 dana prisustvo nekroze je uočeno u 16,7 % a odsustvo u 83,3 % slučajeva. Analiza dobijenih rezultata pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti javljanja nekroze pulpe između ispitivanih grupa (Hi-kvadrat = 0,003; p = 1,000)(tabela 9 i slika 14).

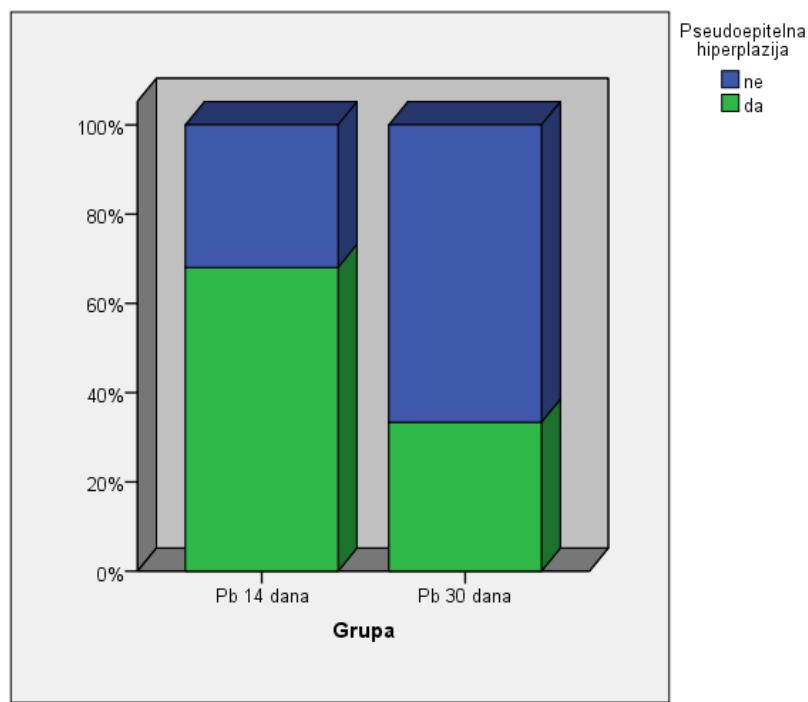


Slika 14. Grafički prikaz pojave nekroze pulpe u ispitivanim grupama

Tabela 10. Pseudoepitelna hiperplazija u ispitivanim grupama

		Pseudoepitelna hiperplazija		Ukupno
		Ne	Da	
Grupa	Pb 14 dana	N	8	17
		%	32.0%	68.0%
Svega	Pb 30 dana	N	8	4
		%	66.7%	33.3%
Svega		N	16	21
		%	43.2%	56.8%
				100.0%

Analiza pseudoepitelna hiperplazija a pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 14 dana je ukazala na postojanje pseudoepitelna hiperplazija u 68 % slučajeva prisustvo u 32% slučajeva. U grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 30 dana prisustvo pseudoepitelne hiperplazije je uočeno u 33,3% a prisustvo u 66,7% slučajeva. Postoji statistički značajna razlika u učestalosti javljanja pseudoepitelne hiperplazije između ispitivanih grupa ( $\chi^2$  kvadrat = 3,970;  $p = 0,046$ ) (tabela 10, slika 15).

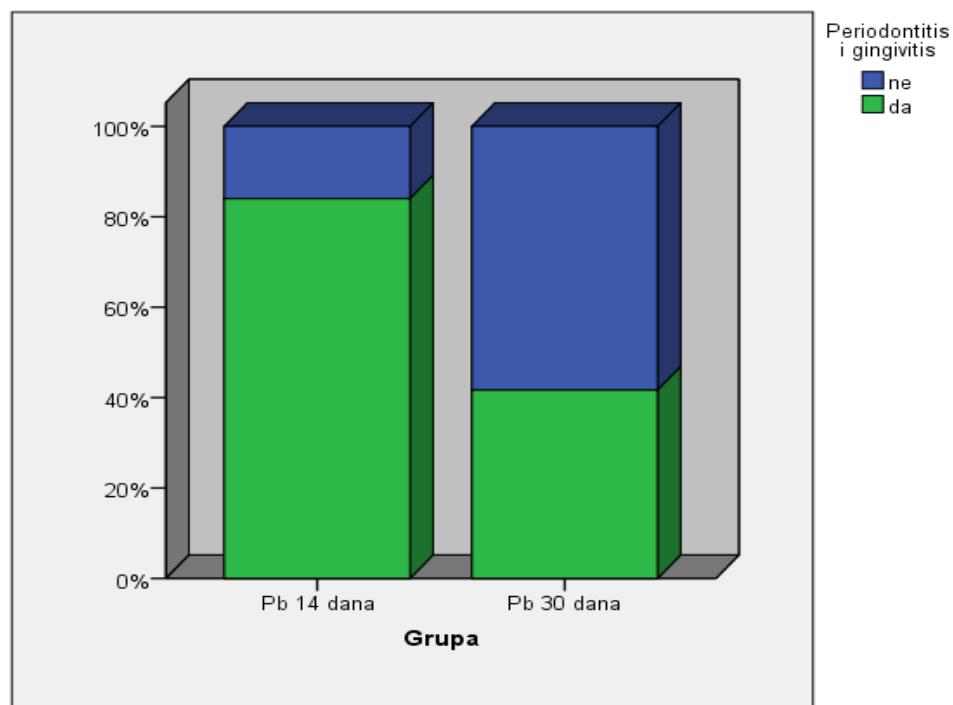


Slika 15. Grafički prikaz pseudoepitelne hiperplazije u ispitivanim grupama

Tabela 11. Periodontitis i gingivitis u ispitivanim grupama

			Periodontitis i gingivitis		Ukupno	
			Ne	Da		
Grupa	Pb 14 dana	N	4	21	25	
		%	16.0%	84.0%	100.0%	
	Pb 30 dana	N	7	5	12	
		%	58.3%	41.7%	100.0%	
Svega		N	11	26	37	
		%	29.7%	70.3%	100.0%	

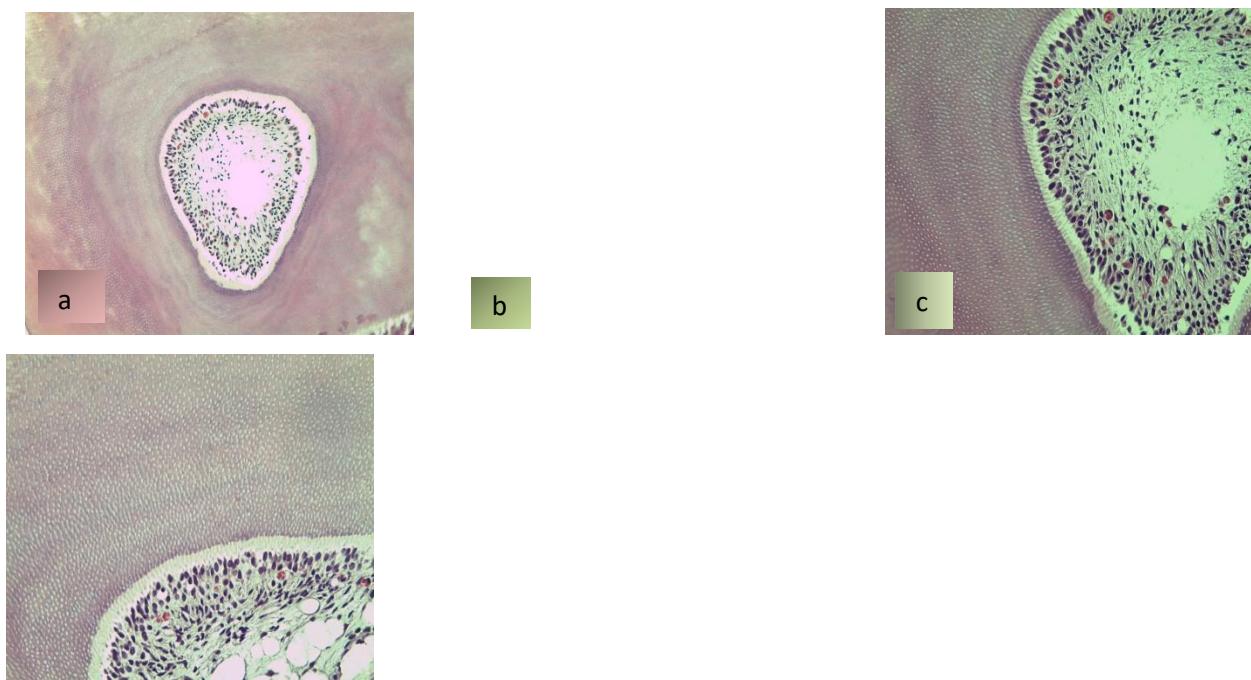
Analiza periodontitis i gingivitisa pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 14 dana je ukazala na postojanje periodontitisa i gingivitisa u 84% slučajeva prisustvo u 16% slučajeva. U grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 30 dana prisustvo periodontitisa i gingivitisa je uočeno u 41,7 % a prisustvo u 58,3 % slučajeva. Analiza dobijenih rezultata pokazuje da postoji statistički značajna razlika u učestalosti javljanja periodontitisa i gingivitisa između ispitivanih grupa ( $\chi^2$ -kvadrat = 6,955;  $p = 0,018$ ) (tabela 11, slika 16).



Slika 16. Grafički prikaz periodontitisa i gingivitisa u ispitivanim grupama

### 5.1.2. Rezultati imuohistohemijske analize zuba pacova (kontrolna grupa)- prikazi histoloških preparata

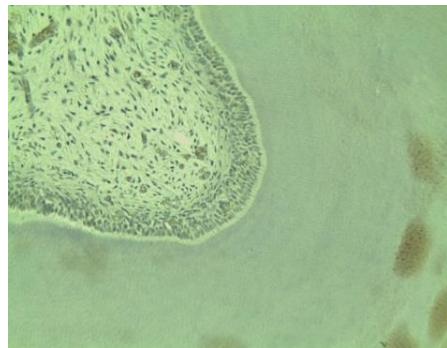
Na histološkom prikazu presijeka pulpe zdravog zuba pacova uočava se pulpa, sloj odontoblasta, predentin i dentin bez morfoloških promjena, zapaljenja pulpe, krvarenje u pulpi, nekroza pulpe, pseudoepitelne hiperplazije, periodontitisa i gingivitisa (slika 17). Takođe se na histološkom presijeku uzorka kontrolne grupe uočava trabekularna građa dentina sa palisadno postavljenim odontoblastima duž unutrašnje ivice pulpnog tkiva, koji čine sincicijalni sloj ćelija. Slične vrijednosti ekspresija TGF- $\beta$ 1 i tenascina-C su uočeni kod ostalih uzoraka zuba kontrolne grupe pacova. Ova pojava ekspresija navedenih medijatora odontogeneze se može objasniti sa povećanim intenzitetom reparativne dentinogeneze uslijed zastupljenosti karijesnih lezija, defekta na gleđi kod zuba pacova kontrolne grupe. Ćelijska struktura u komori pulpe je potopljena u ćelijski matriks. Zdrav zub predstavlja pozitivnu kontrolu u svakoj eksperimentalnoj grupi.



Slika 17: a)Poprečni presjek zdravog zuba. Uočava se pulpa, sloj odontoblasta, predentin i dentin bez morfoloških promjena: b) HE x 200 i c) HE x 400

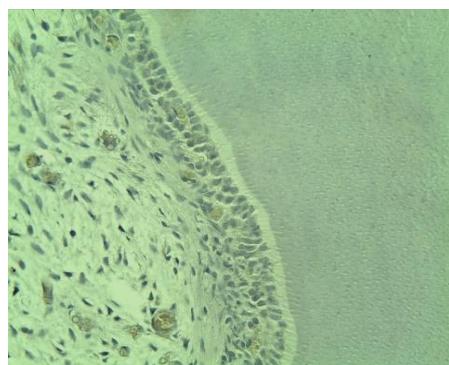
Na slici 18 je prikazan poprečni presijek zuba pacova iz kontrolne grupe, koji nisu dobijali olovo u vodi, na kojoj se jasno vidi da je ekspresija TGF- $\beta$ 1 izostala kao i reparativna dentinogeneza. Od ukupnog broja uzoraka iz kontrolne grupe zuba pacova, analiza dobijenih

rezultata je pokazala da je ekspresija TGF- $\beta$ 1 bila uočena u 25,0% uzoraka od ukupnog broja uzoraka, što govori da je u ovoj grupi zuba sa uočenom ekspresijom vjerovatno bilo karioznih lezija, promjena na pulpi i defekata na gleđi, koji su podstakli ekspresiju navedenog medijatora.



Slika 18. Poprečni presjek zuba. Odsutna ekspresija TGF u citoplazmi odontoblasta, (ocjena 0), anti-TGF x 200

Na slici 19 je prikazan poprečni presjek zuba pacova iz kontrolne grupe koji nisu dobijali oovo u vodi i na kojoj se jasno vidi da je niska ekspresije tenascina-C, kao i reparativna dentinogeneza. Od ukupnog broja uzoraka iz kontrolne grupe zuba pacova, analiza dobijenih rezultata je pokazala da je ekspresija tenascina-C bila uočena kod 16,7% od ukupnog broja uzoraka svih grupa, što govori da je u ovoj grupi zuba sa uočenom ekspresijom slabe ili umjerene fokalne pozitivnosti (ocjena ) vjerovatno bilo karijesnih lezija, promjena na pulpi ili defekata na gleđi koji su podstakli ekspresiju navedenog medijatora.

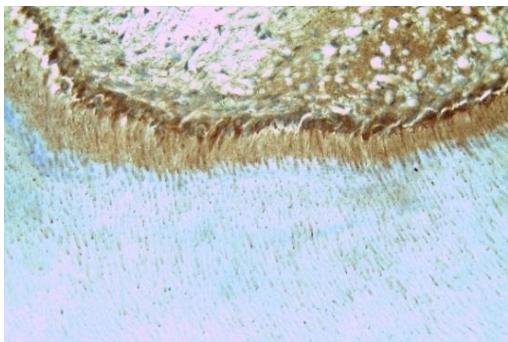


Slika 19. (K7) Poprečni presjek zuba. Prikaz niska ekspresije tenascina-C,

u citoplazmi odontoblasta (ocjena 1), anti-tenascin x 200

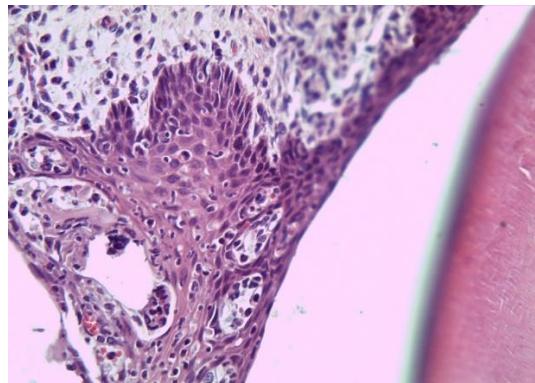
### 5.1.3. Rezultati imuohistohemijske analize zuba pacova sa dijabetesom koji su dobijali olovo-acetat 14 i 30 dana-prikazi histoloških preparata

Na histološkom prikazu presjeka pulpe uočava se visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 u citoplazmi odontoblasta (ocjena 3) (slika 20). Analizom dobijenih rezultata, ekspresija TGF- $\beta$ 1 visoke difuznosti je uočena u grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 14 dana, u manjem broju uzoraka u odnosu na uzorke zuba pacova koji su dobijali olovo tokom 30 dana u vodi.



Slika 20. Poprečni presjek zuba pacova koji su dobijali olovo tokom 14 dana u vodi, sa eksperimentalno izazavanim dijabetesom. Prikaz visoke ekspresije TGF u citoplazmi odontoblasta (ocjena 3), anti-TGF x 400

Na slikama od 12 od 16 prikazani su poprečni presjeci korijena zuba pacova koji su dobijali olovo-acetat u vodi tokom 30 dana. Na histološkom presjeku je prikaz interdentalnog dijela gingive zuba pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 30 dana (slika 21). Uočava se zapaljenje gingive (gingivitis).



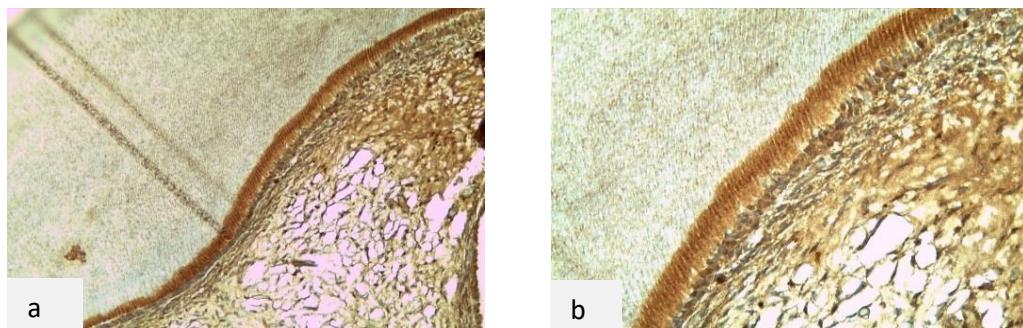
Slika 21. Prikaz interdentalnog dijela gingive. Uočava se zapaljenje gingive, HEx 400.

Na histološkom presjeku je prikazan poprečni presjek zuba pacova koji su dobijali olovu u vodi tokom 30 dana, gdje je uočen visoke ekspresije fibronektina u citoplazmi odontoblasta (ocjena 3) (slika 22).



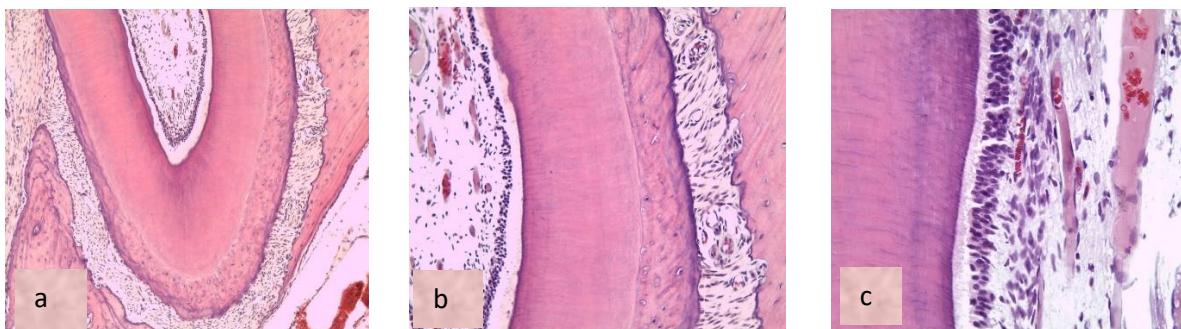
Slika 22. Poprečni presjek zuba. Prikaz visoke ekspresije fibronektina u citoplazmi odontoblasta (ocjena 3), anti-fibronektin x 400

Na slici 23 (23a i 23b) prikazan je poprečni presjek korijena zuba pacova koji su dobijali olovu u vodi tokom 30 dana, sa visokom ekspresijom fibronektina u citoplazmi odontoblasta.



Slika 23: Poprečni presjek zuba. Prikaz visoke ekspresije fibronektina u citoplazmi odontoblasta (ocjena 3) a) anti-fibronectin x 200 i b) anti-fibronectin x 400.

Na histoloskom presjeku je prikazan poprečni presjek zuba pacova koji su dobijali oovo u vodi tokom 30 dana (slika 24). Uočava se pulpa, sloj odontoblasta, predentin, dentin, cement, periodontalni ligament i vilična kost bez morfoloških promjena.



Slika 24: Poprečni presjek zuba. Uočava se pulpa, sloj odontoblasta, predentin, dentin, cement, periodontalni ligament i vilična kost bez morfoloških promjena: a) HE x 100, b) HE x 200 i c) HE x 400.

Na slici 25 prikazan je poprečni presjek korijena zuba pacova koji su dobijali oovo tokom 30 dana, sa visokom ekspresijom TGF- $\beta$ 1, u citoplazmi odontoblasta.



Slika 25. Poprečni presjek zuba. Prikaz visoke ekspresije TGF- $\beta$ 1 u citoplazmi odontoblasta (ocjena 3), anti-TGF  $\beta$ 1 x 400.

## 5.2.Rezultati SEM analize zuba pacova

SEM-EDS analiza rađena je kod dvije grupe zuba pacova iz grupe A1 i A2:

- a) grupe A1: analiza rađena na 12 zuba pacova sa vještaki izazvanim dijabetesom, koji su pili olovo 14 dana
- b) grupa A2: analiza rađena na 9 zuba pacova koji su pili olovo 30 dana (grupa A2)

SEM-EDS analiza je rađena u tri sloja zuba: u gleđi (spectrum 1), predjelu gleđno-dentinske granice (spectrum 2), u dentinu (spectrum 3) i u pulpi (spectrum 4). Samo na jednom zubu, u grupi pacova koji su pili olovo 14 dana SEM-EDS analiza je rađena u pulpi (spectrum 4). U grupi pacova koji su pili olovo u vodi za piće 14 dana, SEM je rađena u gleđi na 12 zuba, u gleđno dentinskoj granici na 11 zuba i u dentinu na 12 zuba. U grupi pacova koji su pili olovo u vodi za piće 30 dana, SEM je rađena u gleđi na 7 zuba, u gleđno dentinskoj granici na 8 zuba, u dentinu na 6 zuba i u pulpi na jednom zubu. U slijedećoj tabeli prikazan je broj pozitivnih nalaza masenih udjela navedenih elemenata u ispitivanim djelovima zuba u obe ispitivane grupe.

- a) **grupe A1:** SEM-EDS je rađena u grupi pacova koji su pili olovo u vodi za piće 14 dana , u gleđi na 12 zuba, u gleđno dentinskoj granici na 11 zuba , u dentinu na 12 zuba i u pulpi na jednom zubu,
- b) **grupa A2:** : SEM-EDS je rađena kod pacova pacova koji su pili olovo30 dana , u gleđi na 7 zuba, u gleđno dentinskoj granici na 8 zuba u dentinu na 6 zuba i u pulpi na jednom zubu.

**Ovom analizom odredivani su maseni udjeli** elemenata u navedenim delovima zuba i u navedenim segmentima zuba nađeno je prisustvo slijedećih elemenata: C, O, Na, Mg, P, K, Ca i Pb. U slijedećoj tabeli prikazan je broj pozitivnih nalaza masenih udjela navedenih elemenata u ispitivanim djelovima zuba u obe ispitivane grupe (A1 i A2 grupa) (tabela12).

Tabela 12. Broj zuba sa masenim udijelom pojedinih elemenata zuba pacova koji su dobijali Pb

N		Grupa	
		Pacovi dobijali 14 dana	Pacovi dobijali 30 dana
		Broj zuba	Broj zuba
Wt% C 1	Sloj zuba	Gleđ	12
		GDG	11
		Dentin	12
		Pulpa	0
Wt% Na 2	Sloj zuba	Gleđ	1
		GDG	0
		Dentin	2
		Pulpa	0
Wt% Mg 3	Sloj zuba	Gleđ	0
		GDG	0
		Dentin	2
		Pulpa	0
Wt% P 4	sloj j zuba	Gleđ	12
		GDG	11
		Dentin	12
		Pulpa	0
Wt% K 5	sloj j zuba	Gleđ	0
		GDG	0
		Dentin	0
		Pulpa	0
Wt% Ca 6	sloj j zuba	Gleđ	12
		GDG	11
		Dentin	12
		Pulpa	0
Wt% Pb 7	sloj j zuba	Gleđ	0
		GDG	0
		Dentin	0
		Pulpa	0

Tabela 13. Prosječne vrijednosti masenog udjela pojedinih elemenata u dijelovima zuba kod ispitivanih grupa

	Sloj zuba	Grupa											
		Pb 14 dana						Pb 30 dana					
		N	$\bar{x}$	SD	Med	Min	Maks	N	$\bar{x}$	SD	Med	Min	Maks
Wt% C	Gleđ	12	24.25	13.57	20.86	9.12	53.65	7	31.09	15.17	28.94	13.53	56.63
	GTG	11	19.95	6.92	18.89	11.74	35.28	8	21.68	9.52	17.58	14.95	43.24
	Dentin	12	23.56	6.58	24.87	11.57	32.36	6	19.91	6.78	22.61	10.08	26.09
	Pulpa	0	.	.	.	.	.	1	17.83	.	17.83	17.83	17.83
	Ukupno	35	22.66	9.55	21.25	9.12	53.65	22	24.02	11.50	21.68	10.08	56.63
Wt% O	Gleđ	12	38.17	8.26	41.80	16.78	43.88	7	41.13	9.63	44.84	24.75	54.55
	GTG	11	38.26	4.48	38.81	31.09	44.79	8	44.88	8.74	46.87	27.69	54.48
	Dentin	12	39.43	5.90	39.62	30.00	46.61	6	44.14	11.07	46.39	24.26	55.13
	Pulpa	0	.	.	.	.	.	1	36.52	.	36.52	36.52	36.52
	Ukupno	35	38.63	6.29	39.58	16.78	46.61	22	43.10	9.28	45.05	24.26	55.13
Wt% Na	Gleđ	12	.09	.32	.00	.00	1.10	7	.91	1.22	.82	.00	3.44
	GTG	11	.00	.00	.00	.00	.00	8	.22	.41	.00	.00	.98
	Dentin	12	.22	.51	.00	.00	1.35	6	.00	.00	.00	.00	.00
	Pulpa	0	.	.	.	.	.	1	.00	.	.00	.00	.00
	Ukupno	35	.11	.35	.00	.00	1.35	22	.37	.79	.00	.00	3.44
Wt% Mg	Gleđ	12	.00	.00	.00	.00	.00	7	.00	.00	.00	.00	.00
	GTG	11	.00	.00	.00	.00	.00	8	.07	.21	.00	.00	.58
	Dentin	12	.11	.27	.00	.00	.81	6	.00	.00	.00	.00	.00
	Pulpa	0	.	.	.	.	.	1	.00	.	.00	.00	.00
	Ukupno	35	.04	.16	.00	.00	.81	22	.03	.12	.00	.00	.58
Wt% Al	Gleđ	12	.00	.00	.00	.00	.00	7	.00	.00	.00	.00	.00
	GTG	11	.07	.22	.00	.00	.74	8	.00	.00	.00	.00	.00
	Dentin	12	.00	.00	.00	.00	.00	6	.00	.00	.00	.00	.00
	Pulpa	0	.	.	.	.	.	1	.00	.	.00	.00	.00
	Ukupno	35	.02	.13	.00	.00	.74	22	.00	.00	.00	.00	.00
Wt% P	Gleđ	12	13.92	3.39	14.66	8.14	19.22	7	10.62	4.49	10.90	1.36	14.51
	GTG	11	15.61	2.40	15.87	10.24	18.77	8	12.91	4.54	13.43	3.50	18.23
	Dentin	12	13.95	2.13	13.86	10.55	17.40	6	13.95	3.06	14.50	9.08	17.10
	Pulpa	0	.	.	.	.	.	1	16.55	.	16.55	16.55	16.55
	Ukupno	35	14.46	2.74	14.68	8.14	19.22	22	12.63	4.18	13.43	1.36	18.23
Wt%	Gleđ	12	.21	.41	.00	.00	1.16	7	.22	.30	.00	.00	.77

Cl	GTG	11	.00	.00	.00	.00	8	.02	.07	.00	.00	.19
	Dentin	12	.16	.37	.00	.00	1.03	6	.00	.00	.00	.00
	Pulpa	0	.	.	.	.	.	1	.00	.	.00	.00
	Ukupno	35	.13	.33	.00	.00	1.16	22	.08	.19	.00	.77
	Gleđ	12	.00	.00	.00	.00	.00	7	.03	.08	.00	.20
Wt% K	GTG	11	.00	.00	.00	.00	.00	8	.08	.22	.00	.62
	Dentin	12	.00	.00	.00	.00	.00	6	.00	.00	.00	.00
	Pulpa	0	.	.	.	.	.	1	.00	.	.00	.00
	Ukupno	35	.00	.00	.00	.00	.00	22	.04	.14	.00	.62
	Gleđ	12	23.28	5.68	23.02	14.37	31.76	7	15.48	8.26	17.10	.67 25.88
Wt% Ca	GTG	11	25.66	4.35	25.28	15.98	31.73	8	20.13	10.82	20.72	1.92 37.40
	Dentin	12	22.35	4.52	23.11	14.69	27.79	6	21.74	8.49	21.65	9.70 33.57
	Pulpa	0	.	.	.	.	.	1	29.10	.	29.10	29.10
	Ukupno	35	23.71	4.96	24.86	14.37	31.76	22	19.50	9.33	19.38	.67 37.40
	Gleđ	12	.32	.61	.00	.00	1.70	7	.17	.45	.00	.00 1.20
Wt% I	GTG	11	.46	.80	.00	.00	2.10	8	.00	.00	.00	.00
	Dentin	12	.18	.62	.00	.00	2.14	6	.27	.65	.00	.00 1.60
	Pulpa	0	.	.	.	.	.	1	.00	.	.00	.00
	Ukupno	35	.32	.67	.00	.00	2.14	22	.13	.42	.00	.00 1.60
	Gleđ	12	.00	.00	.00	.00	.00	7	.36	.62	.00	.00 1.30
Wt% Pb	GTG	11	.00	.00	.00	.00	.00	8	.00	.00	.00	.00
	Dentin	12	.00	.00	.00	.00	.00	6	.00	.00	.00	.00
	Pulpa	0	.	.	.	.	.	1	.00	.	.00	.00
	Ukupno	35	.00	.00	.00	.00	.00	22	.11	.37	.00	.00 1.30

U tabelama 13 prikazane su prosječne vrijednosti masenih udjela pojedinih elemenata u dijelovima zuba kod ispitivanih grupa. Prosječne vrijednosti udjela **ugljenika** u zubu pacova koji su dobijali olovo u vodi za piće tokom 14 dana bila je najveća u gleđi (24,25), potom u dentinu (23,56) i najmanja u predjelu gleđno-dentinske granice (19,95). Prosječne vrijednosti masenih udjela **ugljenika** u zubu pacova koji su dobijali olovo 30 dana, bila je najveća u gleđi (31,09), zatim u dijelu gleđno-dentinske granice i manja u dentinu (21,68). Prosječne vrijednosti udjela **kiseonika** u zubu pacova koji su dobijali olovo u vodi za piće tokom 14 dana bila je najveća u dentinu (39,43), potom u predjelu gleđno-dentinske granice (38,26) a u gleđi (38,17) najmanja. Prosječne vrijednosti masenih udjela kiseonika u zubu pacova koji su dobijali olovo 30 dana, bila je u predjelu gleđno-dentinske granice (44,48) u gleđi (41,13), potom i u dentinu (44,14). Prosječne vrijednosti udjela **natrijuma** u zubu pacova koji su dobijali olovo u vodi za piće

tokom 14 dana bila je najveća u dentinu (0,22), potom u gleđi (0,09) i najmanja u predjelu gleđno-dentinske granice (38,17). Prosječne vrijednosti masenih udjela natrijuma u zubu pacova koji su dobijali oovo 30 dana, bila je najveća u gleđi (31,09), potom u predjelu gleđno-dentinske granice (0,022) i u dentinu nije ni detektovana. Prosječne vrijednosti udjela **magnezijuma** u zubu pacova koji su dobijali oovo u vodi za piće tokom 14 dana bila je detektovana samo u dentinu (0,11). Prosječne vrijednosti masenih udjela **magnezijuma** u zubu pacova koji su dobijali oovo 30 dana, bila je pronađena jedino u predjelu gleđno-dentinske granice (0,07). Prosječne vrijednosti udjela **aluminijuma** u zubu pacova koji su dobijali oovo u vodi za piće tokom 14 dana bila je detektovana samo u oblasti gleđno-dentinske granice (0,11). Dok prosječne vrijednosti masenih udjela **magnezijuma** u zubu pacova koji su dobijali oovo 30 dana nije ni detektovana. Prosječne vrijednosti masenih udjela fosfora u zubu pacova koji su dobijali oovo 14 dana, bila je najveća u predjelu gleđno-dentinske granice (15,61), potom u predjelu dentina (13,96) i u gleđi najmanja vrijednost (13,92). Prosječne vrijednosti masenih udjela **fosfora** u zubu pacova koji su dobijali oovo 30 dana, bila je najveća u dentinu (13,96), zatim u oblasti gleđno-dentinske granice (21,91) a najmanja u gleđi (10,62). Prosječne vrijednosti masenih udjela **hlora** u zubu pacova koji su dobijali oovo 14 dana, bila je najveća u predjelu gleđi (0,21), potom u predjelu dentina (0,16) i u oblasti gleđno-dentinske granice nije ni detektovan. Prosječne vrijednosti masenih udjela **hlora** u zubu pacova koji su dobijali oovo 30 dana, bila je najveća u gleđi (13,96), zatim u oblasti gleđno-dentinske granice (0,02) a u dentinu nije ni detektovan.

Prosječne vrijednosti udjela **kalijuma** u zubu pacova koji su dobijali oovo u vodi za piće tokom 14 dana nije ni detektovana. Prosječne vrijednosti masenih udjela **kalijuma** u zubu pacova koji su dobijali oovo 30 dana, bila je najveća u predjelu gleđno-dentinske granice (0,8) i potom u gleđi (0,03) u dentinu nije ni detektovan. Prosječne vrijednosti udjela **kalcijuma** u zubu pacova koji su dobijali oovo u vodi za piće tokom 14 dana bila je najveća u gleđno-dentinske granice (25,66) potom u gleđi (23,28) i najmanja u dentinu (22,35). Prosječne vrijednosti masenih udjela **kalcijuma** u zubu pacova koji su dobijali oovo 30 dana, bila je najveća u pulpi (29,10), potom i u dentinu (21,74), u oblasti gleđno-dentinske granice (20,13) a u pulpi (15,48). Prosječne vrijednosti udjela **joda** u zubu pacova koji su dobijali oovo u vodi za piće tokom 14 dana bila je najveća u oblasti gleđno-dentinske granice (0,46) potom u gleđi (0,32) i najmanja u dentinu (0,18). Prosječne vrijednosti masenih udjela **joda** u zubu pacova koji

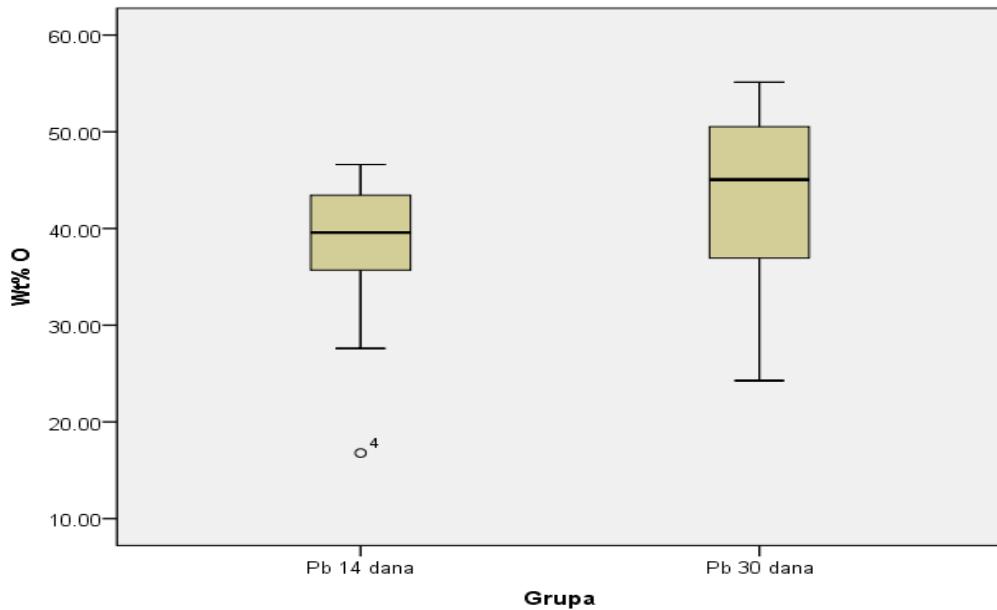
su dobijali oovo 30 dana, bila je najveća u u dentinu (0,27), u gleđi (0,17) a u oblasti gleđno-dentinske granice nije ni detektovan.

Prosječne vrijednosti udjela **olova** u zubu pacova koji su dobijali oovo u vodi za piće tokom 14 nije detektovana ni u jednom sloju zuba. Prosječne vrijednosti masenih udjela **olova** u zubu pacova koji su dobijali oovo 30 dana, bila je detektovana samo u gleđi (0,36). Maseni udio olova uočen je samo kod dva zuba i to u grupi koja je dobijala oovo tokom 30 dana. Oovo je registrovano samo u predjelu gleđi.

Tabela 14. Značajnost razlike masenih udjela pojedinih elemenata između testiranih grupa nezavisno od analiziranog djela zuba

	Mann-Whitney U	Z	P
Wt% C	373.000	-.197	.844
<b>Wt% O</b>	<b>246.000</b>	<b>-2.278</b>	<b>.023</b>
Wt% Na	318.000	-1.730	.084
Wt% Mg	380.500	-.191	.849
Wt% Al	374.000	-.793	.428
Wt% P	289.500	-1.566	.117
Wt% Cl	379.000	-.155	.877
Wt% K	350.000	-1.800	.072
Wt% Ca	273.000	-1.836	.066
Wt% I	341.000	-1.136	.256
Wt% Pb	350.000	-1.800	.072

Analiza ukupno dobijenih vrijednosti masenog udjela pojedinih elemenata je ukazala da postoji statistički značajna razlika samo u masenim vrijednostima kiseonika ( $p<0,23$ ). Manje vrijednosti su uočene u grupi pacova koji su dobijali oovo u vodi za piće tokom 14 dana u odnosu na grupu pacova koji su dobijali oovo tokom 30 dana (tabela 14, slika 26).



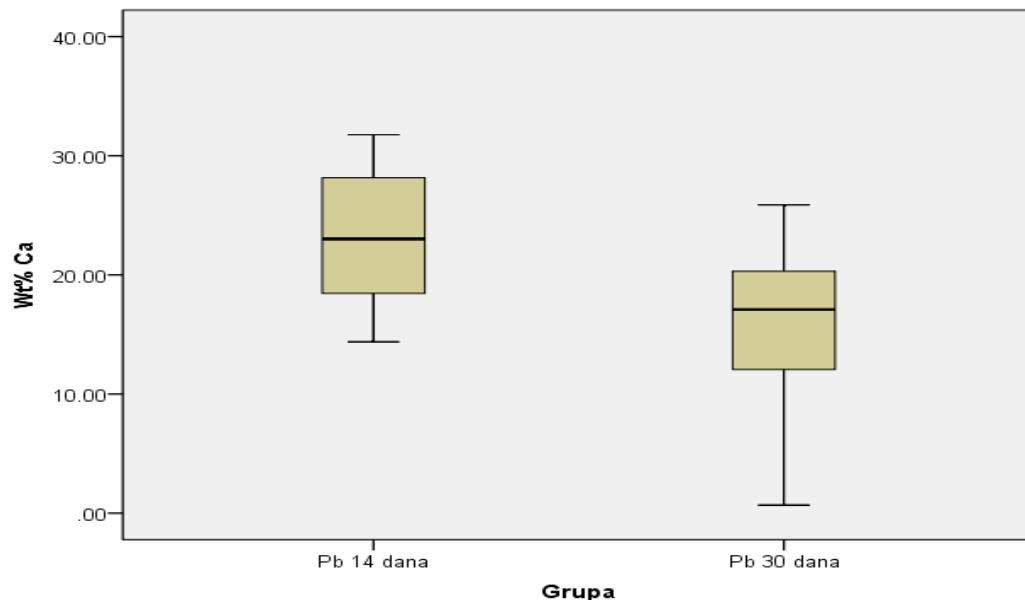
Slika 26. Box-plot dijagram masenog udjela kiseonika u ispitivanim grupama

Tabela 15. Značajnost razlike masenih udjela pojedinih elemenata između testiranih grupa u gledi

	Mann-Whitney U	Z	P
Wt% C	28.000	-1.183	.261
Wt% O	29.000	-1.099	.299
Wt% Na	21.500	-2.235	.083
Wt% Mg	42.000	.000	1.000
Wt% Al	42.000	.000	1.000
Wt% P	21.000	-1.775	.083
Wt% Cl	38.000	-.410	.773
Wt% K	36.000	-1.309	.650
<b>Wt% Ca</b>	<b>17.000</b>	<b>-2.114</b>	<b>.036</b>
Wt% I	37.000	-.592	.711
Wt% Pb	30.000	-1.902	.340

Analiza dobijenih vrijednosti masenog udjela pojedinih elemenata u gledi je ukazala da postoji statistički značajna razlika jedino u vrijednostima kalcijuma ( $p<0,06$ ). I ovdje su manje vrijednosti zabilježene u grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi za piće tokom 14 dana u

odnosu na grupu pacova koji su dobijali olovo tokom 30 dana. U masenim udjelima ostalih elemenata nije dobijena statistički značajna razlika (tabela 15, slika 27).

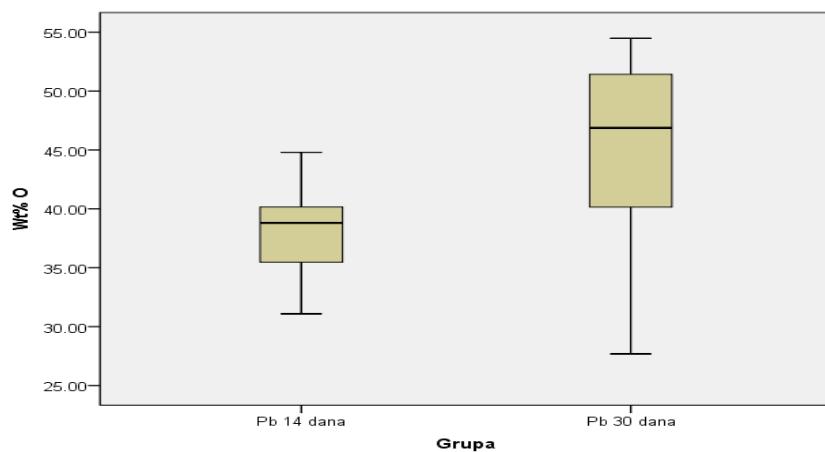


Slika 27. Box-plot masenog udjela kalcijuma u gleđi između ispitivanih grupa

Tabela 16. Značajnost razlike masenih udjela pojedinih elemenata između testiranih grupa u predjelu gleđno-dentinske granice

	Mann-Whitney U	Z	P
Wt% C	41.000	-.248	.840
<b>Wt% O</b>	<b>17.000</b>	<b>-2.229</b>	<b>.026</b>
Wt% Na	33.000	-1.704	.395
Wt% Mg	38.500	-1.173	.657
Wt% Al	40.000	-.853	.778
Wt% P	26.000	-1.486	.152
Wt% Cl	38.500	-1.173	.657
Wt% K	38.500	-1.173	.657
Wt% Ca	29.000	-1.239	.238
Wt% I	32.000	-1.560	.351
Wt% Pb	44.000	.000	1.000

Analiza dobijenih vrijednosti masenog udijela pojedinih elemenata u predjelu gleđno-dentinske granice je ukazala da postoji samo statistički značajna razlika jedino u vrijednostima kiseonika ( $p<0,026$ ). Manje vrijednosti su dobijene u grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi za piće tokom 14 dana u odnosu na grupu pacova koji su dobijali olovo tokom 30 dana. U masenim udjelima ostalih elemenata nije dobijena statistički značajna razlika (tabela 16, slika 28).



Slika 28. Box-plot dijagram masenog udijela kiseonika u gleđno dentinskoj granici u ispitivanim grupama

Tabela 17. Značajnost razlike masenih udjela pojedinih elemenata između testiranih grupa u dentinu

	Mann-Whitney U	Z	P
Wt% C	25.000	-1.030	.335
Wt% O	22.000	-1.311	.213
Wt% Na	30.000	-1.029	.616
Wt% Mg	30.000	-1.029	.616
Wt% Al	36.000	.000	1.000
Wt% P	34.000	-.187	.892
Wt% Cl	30.000	-1.029	.616
Wt% K	36.000	.000	1.000
Wt% Ca	34.500	-.141	.892
Wt% I	33.500	-.429	.820
Wt% Pb	36.000	.000	1.000

Analiza dobijenih vrijednosti masenog udjela pojedinih elemenata u dentinu pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika u masenim udjelima elemenata između ispitivanih grupa (tabela 17).

Povezanost dobijenih vrijednosti masenog udjela pojedinih elemenata u određenim dijelovima zuba procjenjivana je Spirmanovim koeficijentom korelacije. Uočeno je da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između masenog udjela ugljenika (C) sa masenim udjelima natrijuma i hlora, a statistički značajna negativna korelacija sa masenim udjelima kiseonika, fosfora i kalcijuma. Takođe je zapaženo da postoji statistički značajna negativna korelacija između masenog udjela kiseonika sa masenim udjelima ugljenika, kalcijuma i joda. Statistički značajna negativna korelacija zabilježena je između masenog udjela natrijuma sa masenim udjelima fosfora, hlora i kalcijuma. Nije uočena statistički značajna korelacija masenog udjela magnezijuma sa masenim udjelima ostalih elmenata. Postoji statistički značajna korelacija masenog udjela aluminijuma sa masenim udjelom joda i da ne postoji statistički značajna negativna korelacija između masenog udjela fosfora sa masenim udjelima ugljenika, natrijuma, hlora i statistički značajna pozitivna korelacija sa masenim udjelom kalcijuma. Uočeno je da ne postoji statistički značajna negativna korelacija između masenog udjela hlora sa masenim udjelima natrijuma, fosfora i kalcijuma i statistički značajna pozitivna korelacija sa masenim udjelom ugljenika. Nije registrovana statistički značajna korelacija masenog udjela kalijuma sa masenim udjelima ostalih elmenata. Postoji statistički značajna negativna korelacija između masenog udjela kalcijuma sa masenim udjelima ugljenika, kiseonika, natrijuma, hlora i olova i statistički značajna pozitivna korelacija sa masenim udjelom fosfora. Zapaženo je da postoji statistički značajna negativna korrelacija između masenog udjela joda sa masenim udjelom kiseonika i statistički značajna pozitivna korelacija sa masenim udjelom aluminijuma. I takođe je uočeno da postoji statistički značajna negativna korelacija između masenog udjela olova sa masenim udjelom kalcijuma (tabela 18).

Tabela 18. Matrica Spirmanovih koeficijenata korelacije masenih udjela elemenata

Spirmanov Ro		Wt% C	Wt% O	Wt% Na	Wt% Mg	Wt% Al	Wt% P	Wt% Cl	Wt% K	Wt% Ca	Wt% I	Wt% Pb
Wt% C	Ro	1.000	-.267*	.304*	.126	.000	-.804**	.466**	.077	-.657**	.055	.232
	P	.	.044	.022	.350	1.000	.000	.000	.570	.000	.686	.083
	N	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
Wt% O	Ro	-.267*	1.000	.075	.098	-.146	-.247	-.221	-.221	-.467**	-.410**	.197
	P	.044	.	.580	.467	.278	.064	.098	.098	.000	.002	.141
	N	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
Wt% Na	Ro	.304*	.075	1.000	-.102	-.058	-.410**	.621**	.209	-.442**	-.073	.164
	P	.022	.580	.	.452	.670	.002	.000	.118	.001	.588	.223
	N	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
Wt% Mg	Ro	.126	.098	-.102	1.000	-.031	-.167	-.102	-.045	-.169	-.102	-.045
	P	.350	.467	.452	.	.816	.213	.452	.740	.209	.452	.740
	N	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
Wt% Al	Ro	.000	-.146	-.058	-.031	1.000	.114	-.058	-.025	.130	.307*	-.025
	P	1.000	.278	.670	.816	.	.400	.670	.851	.335	.020	.851
	N	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
Wt% P	Ro	-.804**	-.247	-.410**	-.167	.114	1.000	-.424**	-.012	.927**	.096	-.249
	P	.000	.064	.002	.213	.400	.	.001	.929	.000	.479	.062
	N	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
Wt% Cl	Ro	.466**	-.221	.621**	-.102	-.058	-.424**	1.000	.173	-.299*	.066	.156
	P	.000	.098	.000	.452	.670	.001	.	.197	.024	.628	.248
	N	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
Wt% K	Ro	.077	-.221	.209	-.045	-.025	-.012	.173	1.000	.006	-.082	-.036
	P	.570	.098	.118	.740	.851	.929	.197	.	.966	.543	.788
	N	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
Wt% Ca	Ro	-.657**	-.467**	-.442**	-.169	.130	.927**	-.299*	.006	1.000	.206	-.272*
	P	.000	.000	.001	.209	.335	.000	.024	.966	.	.124	.040
	N	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
Wt% I	Ro	.055	-.410**	-.073	-.102	.307*	.096	.066	-.082	.206	1.000	-.082
	P	.686	.002	.588	.452	.020	.479	.628	.543	.124	.	.543
	N	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
Wt% Pb	Ro	.232	.197	.164	-.045	-.025	-.249	.156	-.036	-.272*	-.082	1.000
	P	.083	.141	.223	.740	.851	.062	.248	.788	.040	.543	.
	N	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57

\*\* Korelacija je statistički značajna na nivou verovatnoće od 0.01

\* Korelacija je statistički značajna na nivou verovatnoće od 0.05

## **6. DISKUSIJA**

### **6.1. DISKUSIJA REZULTATA IMUNOHISTOHEMIJSKE ANALIZE**

Uprkos činjenici da je izloženost olovu jedan od glavnih zdravstvenih problema u mnogim zemljama jer ono utiče na opšte zdravlje i patologiju zuba (nastanak karijesa, defekti gleđi zuba) ipak je broj studija koje su se bavile ispitivanjem uticaja olova na ćelije pulpnog tkiva koje učestvuju u dentinogenezi jako ograničen. Poznato je da reparatorna dentinogeneza i formiranje tercijarnog dentina nastaje kao odgovor na odgovarajuće patološke nadražaja, a jedan od njih je i sam uticaj olova [2,3,8]

*In vivo* životinjski modeli obezbeđuju prihvatljivu alternativu ljudskim modelima, mada razlike među vrstama treba uzeti u obzir u tumačenju reakcije tkiva. Većina istraživača u svojim studijama koristi eksperimentalne modele za ispitivanje odontogeneze pulpe [100].

Podstaknuti ovim saznanjima, ova studija se bavila ispitivanjem uticaja olova na distribuciju medijatora dentinogeneze u pulpi zuba pacova. U ovu kliničku studiju su bila uključena 42 laboratorijska pacova Wistar soja odnosno 682 zuba (molara i premolara). Imunohistohemijska analiza imala je za cilj da procjeni ekspresije fibronektina, tenascina-C i TGF- $\beta$ 1 u pulpi (rastresitom vezivnom tkivu pulpe, fibroblastima pulpe), odontoblastima, predentinu i dentinu (nastavcima odontoblasta-Tomesova vlakna). Takođe su ispitivane i morfološke promijene u gingivi, ameloblastima, gleđi, dentinu, odontoblastima i pulpi. Zadatak imunohistohemijske analize o ovoj studiji je bio da lokalizuje specifične antigene u tkivu, pomoću ciljno usmjerenih antitijela i prepozna samo ciljni antigen pri tom omogućavajući vizuelizaciju biomarkera i ekspresije pojedinih proteina u različitim tkivima. Ispitivanje mehanizma signalizacije procesa odgovornih za indukciju odontoblastne diferencijacije je od fundamentalnog značaja za razumijevanje reparatorne sposobnosti pulpnog tkiva. Rezultati novijih istraživanja su pokazali da su brojniji signalni molekuli uključeni u transdukcione mehanizme dentinogeneze i da imaju izrazitu bioaktivnost u vrlo malim koncentracijama. Među ovim molekulima značajno mjesto pripada fibronektinu, faktoru rasta i progenitornim ćelijama pulpe obzirom na njihovu ulogu u podsticanju dentinogeneze [54,55].

Studija Nabil-a i njegovih saradnika imala je za cilj da ispita prisutvo olova u zubima pacova, nakon njegove oralne aplikacije vodom za piće i da se procijeni uticaj različitih

koncentracija olovo acetata kod mužjaka Albino pacova pomoću krvne slike, težine, krvne plazme, odnosno na osnovu funkcije jetre, bubrega i tiroidne žlijezde. Ova studije je potvrdila da olovni acetat ima štetno dejstvo na opšte zdravlje mužjaka Albino pacova. Neki radovi su takođe ukazali na značaj olova u nastanku i razvoju pojedinih stomatoloških oboljenja te su pojedini autori ispitivali sadržaj olova u zubima, pljuvački i gingivi radnika profesionalno izloženim olovu. Rezultati ovih istraživanja su ukazali na značajnu akumulaciju olova kao i vezu olova sa oboljenjima kao što su karijes i parodontopatija. To su potvrdila i ispitivanja Cleymaet-a R. i saradnika gdje je utvrđeno da je koncentracija olova u krvi i pljuvački u korelaciji sa njegovim sadržajem u površinskom sloju gledi [78,67,104,105].

#### 6.1.1. Diskusija ekspresije fibronektina u procesu odontogeneze

U ovoj studiji za detekciju fibronektina je korišteno poliklonalno zečije antitijelo (Rabbit on Rodent HRP- polymer, Biocare Medical) koje je visoko specifično za fibronektina. A dobijena bojenja su jasno vizuelizirala spoj antitijelo-fibronektin. Procjena ekspresije istraživanih antitijela je rađena prema vlastitoj semikvantitativnoj skali prikazanoj u tabeli 1. Fibronektini su veliki glikoproteini koji učestvuju u mnogim ćelijskim procesima, posebno u interakciji sa ekstracelularnim matriksom i ćelijama kao što su fibroblasti, osteoblasti itd. U mnogim studijama je analizirana ekspresija, funkcija i struktura fibronektina i otkriveno da fibronektin ima kompleksnu molekularnu strukturu. Uticaj fibronektina na odontogenezu nije tačno razjašnjen ali se smatra da ima ulogu signalne molekule koja podstiče različite ćelijske funkcije uključujući adheziju, migraciju i sekundarnu inicijaciju diferencijacije odontoblastima srodnih ćelija [12,13].

Vojinović i sar. (2002. godine) su na osnovu SEM analize ispitivali patološku dentinogenezu. U studiji su korištena tri humana mlječna zuba i jedan Zub psa. U ovoj studiji je utvrđeno da je struktura patološkog dentina slična strukturi pokrovног dentina i da značajno zavisi od jačine i dužine iritacije (nadražaja) pri čemu jake iritacije mogu da oštete odontoblaste. Međutim, odontoblasti kao izuzetno otporne ćelije ponekad i pod jakim iritacijama mogu da sačuvaju integritet i nastave da formiraju tubule unutar amorfne dentinske mase. Rezultati ove eksperimentalne studije su usaglašeni sa rezultatima naših istraživanja u pogledu reaktivne dentinogeneze, jer su pokazali da je ekspresija fibronektina, visoke difuzne pozitivnosti bila najveća u grupi pacova koji su uzimali oovo 30 dana (63.6%) i eksresija TGF- $\beta$ 1 visoke

difuzna pozitivnost je bila najizraženija u grupi koji su uzimali oovo 30 dana (45.5%), dok je visoka difuzna pozitivnost u grupu pacova sa dijabetesom koji su dobijali oovo 14 dana i bili uočena samo u 24.0%. Uloga fibronektina u odontogenezi je važna s obzirom da njegova koncentracija u toku odontogeneze raste. Kada odontoblasti formiraju dentin kao odgovor na nadražaj ili ozljedu, on je onda drugačiji od sekundarnog a naziva se reparatori, iregularni ili tercijarni osteodentin [3].

Rezultate ove studije su saglasni i sa nalazima *Yoshiba* i saradnika koji su ispitivali distribuciju fibronektina u pulpi zuba u razvoju i razvijenim zubima metodom indirektne imunofluorescencije koji su potvrđili da je fibronektin bio prisutan u sloju odontoblasta tijekom svih faza dentinogeneze. U apikalnoj regije zuba u razvoju, intenzivnom fluorescencijom fibronektin je pronađen uz bazalnu membranu i u prvo formiranom sloju predentina. Slična zastupljenost fibronektina kod razvijenih zuba je uočena u odontoblastnom sloju [57].

U eksperimentalnom straživanju, koje je sprovedeno na psima gdje je biomatriks unutar pulpne komore zuba, eksperimentalnih životinja poslužio kao uzorak, objašnjena je molekularna osnova indukcije stvaranja reparativnog dentina. Ovdje je pulpno tkivo eksperimentalnih životinja implantirano sa milpor-filterom, natopljenim fibronektinom što je i uticao na stvaranje dentinskog matriksa oko implantata i indukovalo pojavu odontoblastolikih ćelija. Do istog zaključka je došao i *Veis* koji je u svojoj studiji potvrđio da pulpne ćelije implantirane (prekrivene) fibronektinom, mogu biti diferencirane u odontoblastima slične ćelije i da faktor rasta može uticati na dentinogenetu indukovani fibronektinom (koji veže faktore rasta, a posebno TGF-  $\beta$ 1) [56].

To je potvrđilo i ovo istraživanje gdje je imunohistohemijskom analizom ispitivana ekspresija fibronektina u pulpi zuba pacova. U grupi pacova koji su dobijali oovo u vodi tokom 14 dana visoka fokalna pozitivnost ekspresije fibronektina je uočena u 48% slučajeva, slaba ili umjerena fokalna i visoka difuzna pozitivnost u po 24%, dok je odsustvo bojenja registrovano u 4% slučajeva. U grupi pacova koji su dobijali oovo u vodi tokom 30 dana, gdje se imunohistohemijskom analizom takođe utvrđivala ekspresija fibronektina, analiza rezultata je pokazala da je njegova visoka fokalna pozitivnost uočena u 27.3% slučajeva, slaba ili umjerena fokalna i visoka difuzna pozitivnost u po 9.1% dok je odsustvo bojenja nije registrovano ni u jednom slučaju.

*Linde* i saradnici su u različitim fazama dentinogeneze ispitivali ekspresiju fibronektina pomoću indirektnе fluorescencije. Ekspresija fibronektina je utvrđena u bazalnoj membrane između unutrašnjeg gleđnog epitela i osnovnog mezenhima zuba i u sloju predentina, ali ne i u predentinu što ukazuje da molekule fibronektina nisu direktno uključene u mineralizaciju. [60].

U ovoj studiji IHH analizom, kod grupe pacova sa indukovanim dijabetesom (koji su dobijali olovo tokom 14) su nađene brojne morfološke promjene (88%), pulpitis (92%) odnosno krvarenja u pulpi (88%). Nekroze pulpe je bila neznatna u obe eksperimentalne grupe pacova. Pseudoepitelna hiperplazija je bila veća u grupi pacova sa eksperimentalno izazvanim DM-om (68%) kao i periodontitis i gingivitis (84%) u odnosu na pacove bez dijabetesa koji su dobijali olovo tokom 30 dana. Slične nalaze na modelu pacova sa eksperimentalno izazvanim diabetes mellitusom dobili su *Tesseromatis* i saradnici koji su ukazali na postojanje inflamacije u „lами propriji“ gingive i u predelu papila, odnosno zadebljanje zida arteriola [111].

Nekontrolisan ili neadekvatno kontrolisan diabetes mellitus može biti faktor rizika za razvoj oralnih komplikacija. To je podstaklo *Catanzaro-a* i saradnike da ispitaju da li DM dovodi do zapaljenja i strukturnih promjena u pulpi. Mužijacima pacova Wistar soja su aplikovane injekcije streptozotocina (STZ) i indukovani vještački dijabetes. Nakon 30 i 90 dana nitriti u tkivu pulpe su bili povišeni samo u prvih 30 dana dok su poslije 60 dana bili manji u odnosu na kontrolnu grupu. Ova studija ukazuju da dijabetes dovodi do promjena u oralnim tkivima i ekspresije medijatora zapaljenja [106].

*Deri* je u svojoj eksperimentalnoj studiji sa pacovima Wistar soja, kod kojih je hiperglikemija eksperimentalno uzrokovanata intraperitonealnom aplikacijom Alloxan-a, takođe utvrdila da je usporeniji metabolizam pulpe kod dijabetičnih pacova nego kod zdravih i efekti direktnog prekrivanja su bili generalno slabiji, bez obzira na upotrijebljeni materijal (MTA ili CH). Zaključeno je da je mikroangiopatija u pulpi zuba jedan od razloga za ovakve rezultate [108].

Mikrocirkulacija pulpe ima važnu ulogu u regulaciji metaboličkih procesa zuba i dentinogeneze. Na krvne sudove pulpe utiču brojni fizičko-hemijski faktori koji mogu uticati na odbrambene reakcije pulpo-dentinskog kompleksa. Kod dijabetesa postoji poremećaj mikrocirkulacije u pulpi i posljedično usporavanje metabolizma i procesa odontogeneze u pulpi [22]. Ovim činjenicama se mogu objasniti rezultati ove studije koji ukazuju na značajne morfološke promjene, krvarenje u pulpi, pulpitis, pseudoepitelnu hiperplaziju i periodontitis i

gingivitis u grupi pacova sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom naime, (čime je smanjena i odontogeneza) što takođe objašnjava i smanjena ekspresija fibronektina i TGF- $\beta$ 1 visoke difuzne pozitivnosti. U zubnoj pulpi pacijenata sa šećernom bolešću postoje promjene na malim i većim krvnim sudovima, naročito zadebljanje bazalne membrane, koje utiče na leukotaksu polimorfonuklearnih leukocita i celularnih elemenata imunog sistema. Ove promjene su najizraženije u centralnoj zoni pulpe [90].

Dok su mehanizmi obolijevanja parodonta kod DM-a potpuno razjašnjeni, ćelijski i molekularni mehanizmi poremećaja u zubnoj pulpi tokom dijabetesa su i dalje problem koji se istražuje [12]. Diabetes mellitus (DM) je stanje hronične hiperglikemije i predisponirajući faktor za nastanak karijesa, hipoplazije gleđi, gingivitisa, periodontitisa, oralne kandidijaze i kserostomije i mnogim drugim oboljenjima usne duplje [3].

To je podstaklo *Silvu* i njene saradnike da ispitaju da li postoje hipoplazije gleđi u zuba pacova (mladunaca) Vistar soja, gdje su ženke dovedene u dijabetes tokom trudnoće. Makroskopski su uočeni bjeličasti defekti u gleđi (hipoplazije), što je potvrđeno i SEM-om u skoro svim zubima eksperimentalne grupe (93,88%). Takođe je u nekim studijama, kod pacova dovednih u dijabetes pronađeno više periapikalnih lezija nego kod zuba zdravih pacova [69].

Neka istraživanja ukazuju na usporenu tj. smanjenu odbrambenu reakciju pulpe i odontoblasta (proces dentinogeneze) kod oboljelih od diabetes mellitusa.

*Moradi* sa saradnicima (2014) je patohistološkom analizom proučavao promjene u pulpi nakon direktnog prekrivanja pulpe zuba pacova Vistar soja koji su dovedeni u dijabetes. Poslije četiri sedmice uočen je znatno intenzivniji inflamatorni odgovor pulpe prekrivene cementom u eksperimentalnoj grupi dok je u na zubima tretiranim sa MTA uočena razlika u inflamatornom odgovoru pulpe u odnosu na zdrave pacijente. Ova preliminarna studija ukazuje na bolji terapeutski učinak (dejstvo) MTA na pulpu od cementa kod osoba sa dijabetesom [71].

#### 6.1.2. Diskusija ekspresija TGF- $\beta$ 1 u procesu odontogeneze

Neka istraživanja su detaljnije objasnila strukturu patološkog dentina pod uticajem olova, jer su uočene ćelije drugačije od odontoblasta. Autori su takođe zapazili da se u okuženju pulpnog tkiva, nalazi specifični stimulator-faktor rasta TGF- $\beta$ 1, koji inicira i vodi ovaj proces [53].

Karakter signalizacije procesa odgovornih za indukciju odontoblastne diferencijacije je od fundamentalnog značaja za razumijevanje kako fiziološke dentinogeneze tako i reparatorne sposobnosti pulpnog tkiva. Ključne uloge igraju faktori rasta u fiziološkoj diferencijaciji odontoblasta, kao i tokom reparativne dentinogeneze. Značajan fokus je stavljen na faktore rasta, posebno na transformišući faktor rasta ( $TGF - \beta 1$ )  $\beta$  porodice, koji se može direktno uključiti u signalizaciju, citodiferencijaciju odontoblasta i odontoblastoidnih ćelija [7,53,100].

Ekspresija faktora rasta u unutrašnjem gleđnom epitelu dovodi do njegovog zarobljavanja u dentalnoj bazalnoj membrani što kasnije utiče na formiranje preodontoblasta [6].

Iako dokaz da su faktori rasta odgovorni za signaliziranje odontoblastne diferencijacije *in vivo* još uvijek nedostaje, poznato je da su transformišući faktor rasta- $\beta 1$  ( $TGF - \beta 1$ ),  $TGF - \beta 3$ , morfogenetski protein kosti-2 (BMP-2) i insulinu-sličan faktor rasta-1 (IGF-1), važne signalne molekule za odontoblastnu diferencijaciju u *in vitro* uslovima [17].

Tokom dugogodišnjih istraživanja, došlo se do zaključka da na diferencijaciju novih odontoblasta u pulpi utiču brojni faktori kao što su: koštani sijaloproteini, joni kalcijuma, ekstracelularni matriks, faktori rasta, fibronektin, tenascin-C, NGF-u iz pulpe, odnosno citokini koji preko faktora rasta utiču na početak formiranja patološkog dentina (nastaje kao odgovor na patološke nadražaje pa i olova) što je takođe u skladu sa rezultatima ovog istraživanja. Analiza dobijenih rezultata je pokazala da je visoka fokalna pozitivnost uočena u 20,0% slučajeva, slaba ili umjerena fokalna u 24,0 % i visoka difuzna pozitivnost u 36,0 %, dok je odsustvo bojenja registrovano u 20,0 % zuba u grupi pacova koji su dobijali olovo u vodi tokom 14 dana.

Povećana ekspresija  $TGF-\beta 1$  je pronađena u ćelijama pulpe tokom tercijarne dentinogeneze i utvrđena je uloga ovog faktora rasta na diferencijaciju specifičnih ćelija pulpe neophodnih u reparatornom odgovoru. Mnoge druge studije su potvrdile da se  $TGF-\beta 1$  nalazi u dentinskom matriksu i utiče na vaskularne reakcije neophodne u reaktivnoj dentinogenezi [15-17].

*Magloira* i saradnici, kao i mnogi drugi, pridaju značaj  $TGF-\beta 1$  u patološkoj dentinogenezi, uslijed povrede zuba, kao posljedica karijesa odnosno preparacije kaviteta [45].

*Tabatabaei* i saradnici su se u svojoj studiji bavili proučavanjem proliferacije matičnih ćelija u prisustvu matriksa dentina dobivenog iz nekolagenih proteina, faktora rasta iz trombocita i transformišućeg faktora rasta ( $TGF-\beta 1$ ). Rezultati su pokazali da kombinacija

faktora rasta i prečišćenog matriks bez ne-kolagenih proteina (naročito pri 10mg/ml koncentracije) ima mitotsko djelovanje na matične ćelije pulpe [48].

*Laurent* i saradnici (2008) su metodom imunohistohemijske analize ispitivali dejstvo silikatnog cementa (Biodentine<sup>TM</sup>) i njegov uticaj na nastanak reparativnog dentina, modelovanje i sekreciju TGF- $\beta$ 1. Imunohistohemijskom analizom je došlo do rezultata koji ukazuju da je Biodentin<sup>TM</sup> (aplikovan direktno na pulpu) izazvao rani oblik sinteze (nastanka) reparativnog dentina vjerovatno zbog modulacije lučenja TGF- $\beta$ 1 [6].

U eksperimentalnoj *in vivo* studiji, *Tziafas* i saradnici su ispitivali uticaj TGF- $\beta$ 1, kao aktivne komponente matriksa dentina tokom indukcije reparativne dentinogeneze, na uzorcima pulpe zuba molara i očnjaka pasa. Imunohistohemijskom analizom pomoću antitijela TGF- $\beta$ 1 su uočili da ćelije pulpe pokazuju ekspresiju kao odgovor na egzogeni TGF- $\beta$ 1 [53].

Još neki autori su na osnovu dobijenih rezultata potvrdili da primjena pojedinih faktora rasta posebno TGF- $\beta$ 1, stimuliše diferencijaciju odontoblasta i dovodi do oslobođanja endogenih faktora rasta sadržanih u organskom matriksu dentina, što dodatno stimuliše dentinogenezu i objasnili strukturu patološkog dentina, odnosno nastanka patološkog dentina [44,53].

Mnoga imunohistohemijska ispitivanja i *in situ* hibridizacija su pokazali da se za vrijeme procesa diferencijacije odontoblasta pojavljuju: FGF-i, TGF- $\beta$  1-3, BM proteini, IGF-i kao i hormoni rasta. Takođe su neke savremenije studije pokazale da je povećana ekspresija hormona rasta pronađena u ćelijama pulpe tokom tercijarne dentinogeneze i da je potvrđena uloga ovog faktora rasta na diferencijaciju specifičnih ćelija pulpe tokom reparatornog odgovora. Oni ističu da TGF- $\beta$ 1 (koji se nalazi u dentinskom matriksu) utiče na vaskularne reakcije neophodne u reaktivnoj dentinogenezi i može da izazovu transdentinsku stimulaciju odontoblasta u uslovima *in vivo* [18,99.70].

Nakon diferencijacije, dolazi do ekspresije faktora rasta od strane odontoblasta, koji može ostati zarobljen unutar matrice dentina. Takvi faktori rasta mogu biti u stanju da signaliziraju reparativne procese koji dovode do diferencijacije ne-odontoblastnih ćelija, što je od velikog značaja prilikom povrede zuba. Ostali faktori rasta mogu da se povezuju sa odontoblastnom aktivnošću, ali ne mogu ostati unutar dentalne matrice. Na primjer, TGF- $\beta$ 3 je izražen snažnije nego TGF- $\beta$ 1 u humanim odontoblastima, ali nije otkriven u matrici dentina [19].

### 6.1.3. Diskusija ekspresije tenascina-C u procesu odontogeneze

Reakcije pulpo-dentinskog procesa na uticaj olova kao i njihovi ćelijski i molekularni mehanizmi još nisu u potpunosti istraženi. Signalni molekuli ovih procesa su tkivni faktori rasta, tenascin-C, fibronektin i drugi faktori [21].

*D'Souza* i saradnici su provjeravali da li su ćelije koje učestvuju u stvaranju reparativnog dentina slične odontobastima. Istraživanje je rađeno na prvim molarima pacova gdje su urađene preparacije pete klase a životinje su žrtvovane u različitim vremenskim intervalima. Na uzorcima dentina ovih zuba je rađena hibridizacija sa genom specifičnim za tipove kolagena I i III. Poliklonalna antitijela za dentin sialoprotein (DSP) i dentin specifičan protein (fenotip odontoblasta) su korišteni u imunohistohemijskim eksperimentima. Rezultati ove studije su ukazali da su ćelije koje formiraju reparativni dentin ćelije slične odontoblastima. [37].

Ekspresija tenascina-C visoke fokalne pozitivnosti je bila najizraženija u grupi pacova sa eksperimentalno izazvanim DM-om koji su uzimali oovo 14 dana (72.0%). Visoka fokalna pozitivnost je uočena u 72,0% slučajeva, slaba ili umjerena fokalna u 8% i visoka difuzna pozitivnost u 12%, dok je odsustvo bojenja registrovano u 8% slučajeva. U grupi pacova koji su dobijali oovo u vodi tokom 30 dana visoka fokalna pozitivnost je uočena u 45.5% slučajeva, slaba ili umjerena fokalna u 36.4% i visoka difuzna pozitivnost u 33.3%, dok odsustvo bojenja nije registrovano ni u jednom slučaju.

*Leites* i saradnici su se bavili (2011) procjenom histološkog odgovora i ekspresijom tenascina i fibronektina u pulpi poslije direktnog prekrivanja pulpe sa kalcijum hidroksidom i MTA na 40 stalnih zuba svinja. Rezultati imunohistohemiske analize su pokazali da je znatno veći inflamatorni odgovor pulpe bio poslije sedam dana u grupi sa direktnim prekrivanjem kalcijum hidroksidom, a nesto kasnije sa MTA. Ekspresija tenascina-C i fibronektina je u obe grupe (i kod kalcijuma i MTA) je bila približno sličnog intenziteta. Važno je naglasiti da su i fibronektin i tenascin-C uočeni tokom reparativne dentinogeneze (nezavisno od korištenog materijala za direktno prekrivanje pulpe) što je u skladu sa rezultatima ove studije gdje je veća ekspresiju i fibronektina i TGF- $\beta$ 1 bila u grupi pacova koji su uzimali oovo tokom 30 dana [59].

Slične rezultate su dobili *Moradi* i saradnici, koji su imali za cilj da procijene ekspresiju fibronektina i tenascina-c, nakon direktnog prekrivanja pulpe pasa MTA-om, propolisom plazmom bogatom trombocitima. Životinje su žrtvovane poslije 7 i 30 dana. Rezultati studije su

pokazali da je ekspresija tenascina-C bila znatno veća kod zuba koji su izvađeni poslije 30 dana nego kod onih koji su izvađeni poslije 7 dana. U zaključku se takođe navodi da je MTA bolji izbor za direktno prekrivanje pulpe i da se tenascin-C aktivira u reparatornoj dentinogenezi. Rezultati ove studije su takođe saglasni sa ovim nalazom obzirom da je intezitet ekspresije bio veći tamo gdje je i uticaj nadražaja bio veći (u ovom slučaju olovo koje su miševi dobijali tokom trideset dana u vodi za piće) [71].

U jednoj od studija, *Zarrabi* i saradnici (2011) su imunohistohemijskom analizom ispitivali ekspresiju tenascina-C i fibronektina poslije direktnog prekrivanja humanih zuba MTA i novim endodontskim cementom. Rezultati imunohistohemijske analize su pokazali da je ekspresija fibronektina i tenascina-C uočena u obe grupe zuba i već poslije dvije sedmice sa malo većim intezitetom u grupi sa MTA. Ekspresija oba antitijela se smanjivala poslije osam nedjelja. U stvari i ova studija je ukazala na značaj fibronektina i tenascina, kao glavne komponente matriksa reparativnog dentinskog mosta [61].

U ovoj studiji analiza dobijenih rezultata je pokazala da je ekspresija tenascina-C visoke fokalne pozitivnosti bila najizraženija u grupi pacova sa eksperimentalno izazvanim DM-om koji su uzimali olovo 14 dana (72.0%).

Većina funkcionalnih studija sa tenascinom-C je rađena na miševima. Tokom istraživanja rezultati su ukazali da tenascin-C kao i fibronektin i tkivni hormon rasta, imaju važnu ulogu u signalizaciji ćelija što potvrđuje njegova sposobnost da bude izazvan (indukovan) tokom trauma, upala ili razvoja tumora. Takođe, tenascin-C je važan i u regulisanju razmnožavanja ćelija i njihovog kretanja, posebno u toku zarastanja rana jer utiče na diferencijaciju specifičnih ćelija pulpe neophodnih u reparatornom odgovoru. Brojne uloge tenascina-C u funkcionisanju i signalizaciji ćelija čine tenascin-C popularnim proteinom za proučavanje razvoja novih terapijskih procedura i otkrivanju novih metoda. U nekim studijama se tenascin-C klasificuje kao ljepljivi protein koji onemogućava (koči) spajanje sa fibronektinom [18].

Najveći broj eksperimentalnih studija sa tenascinom-C je rađena na miševima gdje se došlo do zaključka da tenascin-C (fibronektin kao i TGF- $\beta$ 1), imaju važnu ulogu u signalizaciji ćelija tokom traume i upala. Takođe je potvrđeno da tenascin-C utiče i na diferencijaciju specifičnih ćelija pulpe neophodnih u odontogenezi. Ipak je još uvijek veza između fibronektina, tenascina-C i tkivnog hormona rasta i njihove uloge u reparativnoj dentinogenezi predmet brojnih istraživanja [19].

## 6.2. Diskusija rezultata SEM-EDS analize

Iako je nivo olova u tvrdim zubnim tkivima koristan pokazatelj izloženosti olovu, informacije o njegovim efektima u tkivima zuba su vrlo ograničena [4].

Deficit esencijalnih elemenata povećava toksičnost pojedinih teških metala, dok njihov višak uglavnom deluje zaštitno. Veliki deo ovih istraživanja je rađen na laboratorijskim životinjama, dok su podaci na ljudima oskudni. Pojedini teški metali mogu zamijeniti kalcijum u kristalima hidroksiapatita pa se zato i procjena nivoa olova u zubu ne bi smjela bazirati samo na absolutnom sadržaju ovog metala već i na njegovom odnosu prema kalcijumu. [1-3].

Jedna od savremenijih studija, imala je za cilj da ispita zastupljenost kadmijuma i olova u mlječnim zubima kod djece koja pate od celjaklike i alergija na hranu u industrijskim oblastima Poljske. Upotrebom plamene atomske apsorpcione spektrofotometrije, uvrđeno je da su se ovi metali najviše akumulirali u mlječnim zubima. Tokom studije je takođe uočeno da su toksični teški metali u zubima ostali u dinamičnom balansu sa normalnom građom zuba, tj. da su zamijenjeni kalcijumom u hidroksiapatitnim kristalima [15].

Do sličnih rezultata su došli *Orzechowska-Wylegała* i saradnici koji su ispitivali relativnu koncentraciju olova, kadijuma i kalcijuma u mlječnim zubima djece sa celjaklijom ili alergijom na hranu. Utvrdili su da u mlječnim zubima djece sa celjaklijom i alergijama na hranu, postoji znatno veći odnos između olovo/kalcijuma i kadijum/kalcijuma nego u zubima zdrave djece [102].

Rane studije su pokazale je deponovanje olova u kosti i meka tkiva značajno veće u uslovima deficita kalcijuma u hrani.[78].

U svojoj studiji *Malara* i saradnici su ispitivali sadržaj olova i kadijuma iz duvanskog dima u mlječnim zubima djece pušača, odnosno njihov odnos sa kalcijumom, metodom atomske apsorpcione sektrofotometrije. Studija je utvrdila da su toksični teški metali koji se talože u zubu ostali u dinamičnom balansu sa normalnim sadržajem zuba(npr.teški metali su zamijenili kalcijum u hidroksiapatičnim kristalima) [100].

Rezultati navedenih studija ukazuju da oovo može zamijeniti kalcijum u kristalima hidroksiapatita što je u skladu sa nalazima ovog eksperimentalnog istraživanja. Analizom dobijenih vrijednosti masenog udjela pojedinih elemenata uočeno je da je prosječna vrijednost udjela kalcijuma u zubu pacova koji su dobijali oovo u vodi za piće tokom 14 dana bila je

najveća u gleđno-dentinske granice (25,66 ) potom u gleđi (23,28) i najmanja u dentinu (22,35) a da je prosječne vrijednosti masenih udjela kalcijuma u zubu pacova koji su dobijali oovo 30 dana, bila najniža u oblasti gleđno-dentinske granice. Maseni udio fosfora u zubu pacova koji su dobijali oovo 14 dana, bila je najveća u predjelu gleđno-dentinske granice (15,61), potom u predjelu dentina (13,96) i najmanji u gleđi (13,92). Prosječne vrijednosti masenih udjela **fosfora** u zubu pacova koji su dobijali oovo 30 dana,bila je najveća u dentinu (13,96), zatim u oblasti gleđno-dentinske granice (21,91) a najmanja u gleđi (10,62). Prosječne vrijednosti masenih udjela olova u zubu pacova koji su dobijali oovo 30 dana, bila je detektovana samo u ovoj grupi zuba i to u gleđi u vrijednosti 0,36%. Ovi rezultati ukazuju na najnižu vrijednost kalcijuma u oblasti gleđno-dentinske granice i na detektovano oovo samo u gleđi zuba pacova koji su dobijali oovo 30 dana. Ovo ukazuje da je oovo zamijenilo kalcijum u kristalima hidroksiapaptiti sto se podudara sa prethodnim studijama.

Do sličnih rezultata su došli i *Liu* i saradnici koji su (2013) sproveli studiju u kojoj su određivali maseni udio elemenata koje su detektovali u gleđi i dentinu pomoću indukovane masene spektrometrije .Uzorke su činili humani zubi (treći molari) sakupljeni u ambulantama u Tajvanu. Dobijeni rezultati su pokazali da je u gleđi detektovan P čiji je maseni udio iznosio 2,19% zatim Ca (27.91%), i Pb (0,72) a koncentracija P, Ca i Pb je bila veći u dentin nego u gleđi. Takođe je i odnos Ca i P bio konstantan [49].

Rezultati ove studije i vrijednosti masenih udjela P, Ca i Pb se podudaraju sa prethodnom studijom *Arora*-e i saradnika u kojoj je uočen udio Ca (24.35%) i P (12.41%) sa konstatntnim odnosom među Ca/P (1.96). Treba naglasiti da se rezultati ove studije za koncentraciju kalcijuma u gleđi i dentinu zuba pacova koji su dobijali oovo u periodu od 14 dana podudaraju sa rezultatima navedenih studija i da je vrijednost kalcijuma bila znatno niža u grupi zuba pacova koji su dobijali oovo tokom 30 dana.

*Arora* i saradnici su kao i prethodni autori zaključili da koncentracija olova u gleđi i dentinu raste sa godinama i u određenim periodima (dobima) pokazuje da Zub može biti pouzdan biomarker za oovo[82].

U našem istraživanju je protokol SEM analize bio sproveden na istim slojevima (spektrumima) svih zuba (gleđi, gleđno-dentinskoj granici i u dentinu) a oovo nije detektovano u značajnoj koncentraciji. Jedno od objašnjenja bi moglo biti da zubi nisu ispirani ni tretirani u ultrasoničnom kupatilu pa su vizualno neuočljivi tragovi mekih tkiva unijeli zabunu u analizi. U

eksperimentalnim grupama ovog studija ovakve promijene se mogu objasniti prisustvom karijesnih šupljina ili defekata gleđi u koje se nataložilo olovo a koje je SEM analizom detektovano u površinskim dijelovima gleđi [89].

Takođe su *Barmes* i saradnici ustanovili korelaciju koncentracije olova u zubima i zubnog kvara, u tom smislu da su ispitanici sa visokim koncentracijama olova imali veći broj karijesnih zuba u odnosu na ispitanike sa nižim nivoom olova [95].

*Gill F.* i saradnici su ispitivali odnos sadržaja olova u zubima i prevalence zubnog karijesa, zubnog plaka, pH salive, broja salivarnih kariogenih mikroorganizama, stepena dentalne abrazije i prebojenosti zuba. Ustanovili su pozitivnu korelaciju između koncentracije olova u zubima i svih navedenih pokazatelja zdravlja zuba, osim pH salive. Oni su utvrdili da su zubi sa većim koncentracijama olova bili sa karijesom, imali više plaka, bili više prebojeni, više abradirani, a isti pacijenti su u salivi imali veći broj kariogenih mikroorganizama. Jedino je pH pljuvačke bio u negativnoj korelaciji sa koncentracijom olova u zubima [109].

Rezultati ovih istraživanja su saglasni sa rezultatima *Appleton-a* koji se bavio ispitivanjem olovne linije pomoću SEM-a. Analizom uz pomoć x-zraka je uočena lokalizacija olova u vidu tzv. olovne linije i brzi pada intracelularnog kalcijuma, koji je bio zamijenjen jonima olova [22].

Do sličnih rezultata su došle neke studije koje su pokazale da se davanjem intravenske injekcije olovo acetata miševima, javlja odgovor u dentinu zuba, formiranjem tzv. olovne linije. Ovo je bilo povezano sa brzim, ali privremenim porastom serumskog kalcijuma i fosfora tj. činjenice da olovo zamjenjuje kalcijum i fosfor u rešetkama (kristalima) hidroksiapatita [108].

U našoj studiji je takođe SEM analizom detektovan fosfor i analiza dobijenih rezultata je pokazala da je prosječna vrijednost masenog udjela fosfora u zubima pacova koji su dobijali olovo 30 dana, bila je najveća u dentinu (13,96), zatim u oblasti gleđno-dentinske granice (21,91) a najmanja u gleđi (10,62). Ovaj nalaz ukazuje da je olovo pored kalcijuma moglo zamijenilo i fosfor u kristalima hidroksiapatita.

Cilj *Issa-e* je bio da se utvrdi da li se SEM-EDS-om može detektovati olovo na površini gleđi prvih molara pacova uz bukokluzalnu i cervikalnu ivicu zuba, nakon dobijanja olovo (30 mg / L) u vodi za piće tokom 60 dana. Olovo je detektovano u svim molarim iz eksperimentalne grupe a veća koncentracija olova izmjerena je uz gingivalnu nego uz bukokluzalnu ivicu. Osim toga uočena je i smanjena koncentracija kalcijuma uz ove ivice.

Rezultati istraživanja su u skladu sa našem ispitivanjem gdje je takođe uočena manja koncentracija olova detektovana samo u gleđi zuba. Treba naglasiti samo da su eksperimentalne životinje (pacovi) u studiji Issa i saradnika dobijali oovo 60 dana (30 mg / L) u vodi za piće a pacovi u našoj studiji dobijali oovo acetat u koncentraciji 1500 ppm (u vodi ad libitum) u mnogo kraćem periodu . To objašnjavaju i mnogo manje vrijednosti masenog udjela olova i to samo u gleđi. [24].

Studija *Bercovitz-a* i saradnika (1990) je obuhvatala analizu prisustva olova u zuba djece i odraslih pomoću atomske apsorpcione spektrofotometrije i ukazala je na veću koncentraciju olova u dečijim Zubima [73].

Međutim rezultati nekih studija nisu bili u potpunosti u skladu sa našim rezultatima kao i rezultatima prethodnih studija gdje je oovo detektovano u gleđi. *Youravonga* i saradnici su ispitivali gleđ i dentin kod djece sa visokom koncentracijom olova u krvi, metodom sekundarne jonske masene spektrometrije (secondary ion mass spectrometry-SIMS) i mikroanalizom x-zracima. Ove metode su ukazale na vidljiv nivo olova u dentinu na granici sa pulpom, a mikroanaliza x-zracima nije mogla detektovati oovo. Mikroanaliza x-zracima u ovom ispitivanju nije mogla detektovati oovo za razliku od sekundarne jonske masene spektrometrije koja ga je detektovala u dentinu na granici sa pulpom [78].

I u našoj studiji se došlo do prepostavke da se veća koncentracija olova mogla detektovati nekom osjetljivijim i preciznijim metodom i u ostalim dijelovima zuba a ne samo u gleđi. Jedna od njih je i SEM sa multielementnim detektorima koja može biti dobra zamjena za konvencionalno hemijsko ispitivanje, posebno kada se radi o ambijentalnom SEM-u, kojim se lako rukuje, kod kojeg analiza kratko traje i ne zahtijeva standardne protokole pripreme uzorka, što se obično zahtijeva kada su u pitanju analize SEM-om [79].

*Grebler* i saradnici su (2000) pomoću atomske apsorpcione spektrofotometrije mjerili koncentraciju ugrađenog olova u gleđi, dentinu i pulpi (cirkumpulpalnog dentina) odnosno u krvi, kod stanovnika udaljene seoske zajednice u Južnoj Africi. Dobijeni rezultati su ukazali na naveću koncentraciju olova u cirkupulpalnom dentinu i sličnost sa rezultatima iz drugih studija udaljenih, ruralnih područja, dok su vrijednosti olova u krvi bile različite [ 77 ].

*Anttila* je ispitivala koncentracija olova u gleđi mlječnih sjekutića, 49 djece iz Askole, ruralnog područja, najbogatijeg radonom, u Finskoj. Ispitivanje je rađeno pomoću protonske indukcije x-zracima a rezultati su pokazali da je koncentracija olova (8.8+/-6.6 ppm) u gleđi

zuba bila slična rezultatima studija sprovedenim u drugim oblastima Finske. Međutim, nivo olova izmeren na površini gleđi zuba je bio nešto viši u Askoli, nego u Oulu (oblasti koja nije bogata radonom) i to na površini gleđi gornjih sekutića dva puta veći od koncentracije u donjim sekutićima [110 ].

*Antila A* je ispitivala i apsolutnu koncentraciju Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr i Pb u gleđi (sa labijalne i lingvalne strane, donjih mlijecnih sjekutića) pomoću protonske indukcije x-zracima. Uočene su značajne varijacije u koncentraciji sa oralne i labijalne površine pojedinih zuba i to samo za olovo ali ne i kod ostalih metala. *Järvinen* i saradnici su fizičkom metodom zasnovanoj na protonskoj indukciji x-zraka, ispitivali sadržaj olova u mlijecnim zubima i uočili mnogo veću koncentraciju olova u mlijecnim zubima djece urbane u odnosu na djecu ruralnih oblasti Finske [79,80].

*Arora* i saradnici su (2015) imali za cilj da potvrde i standarizuju ugrađivanje olova u zube, kao najvažnijeg biomarkera. U studiji su urađene serije eksperimenata u kojima su pacovi Vistar soja pili vodu, a zastupljenost olova u krvi, bubrezima, mozgu, kostima i zubima je ispitivana pomoću masene spektrofotometrije. U ispitivanju je utvrđeno da olovo ima najveću tendenciju ugradnje u zub, što je i bio cilj ove studije. Ovi rezultati ukazuju na značaj zuba, kao najvažnijeg biomarkera za olovo. Rezultati su takođe ukazali na najmanju koncentraciju olova u krvi i mozgu, što ukazuje da krvno-moždana barijera smanjuje nivo apsorpcije olova i da nalaz krvi nije mjerodavan i pouzdan marker za olovo [82].

Rezultati koji nisu bili u skladu sa našim su nalazi *Grobler-a* i saradnika koji su ispitivali trudne ženke pacova koje su dobijale olovo u vodi za piće tokom trudnoće i tokom laktacije. Koncentraciju olova u molarima je ispitivna atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom i utvrđeno je da je olovo najviše ugrađeno u zubno tkivo kod ženki koje su pile vodu sa najvećom koncentracijom olova. Međutim, ovo istraživanje je urađeno, primjenom visokih koncentracija olova u vodi koja se inače ne nailazi u životnoj sredini [83].

*Berkkan* i saradnici su (2011) određivali olova u uzorcima zuba pacova Vistar soja aplikacijom tečne hibridne generacije (Flow-injection hydride generation (FI-HG) i pomoću atomske apsorpcione spektrofotometrije. Četrdeset zuba pacova Vistar soja su analizirani *in vivo*, koncentracija olova je iznosila  $0.6\text{mg L}^{-1}$  i  $0.4\text{mg L}^{-1}$  a granica osjetljivosti na detekciju olova je imala vrijednost od  $0.66 - 15.60\mu\text{g}$ . Relativna standardna devijacija kod 11 ponavljanja za

mjerenje blank devijacije iznosila 3,8%. Rezultati ukazuju na zastupljenost olova u zubima pacova eksperimentalne grupe [11].

Trovanje olovom kod ljudi dovodi do mnogih neurotoksičnih promjena kao što je encefalitis, poremećaj ponašanja, smanjenje koncentracije, smanjenje koeficijenta inteligencije, a ove promjene kao i smetnje u rastu, su uočene kod djece koja su hronično bila izložena velikim koncentracijama olova [1].

Povećane koncentracije olova mogu djelovati i na normalan razvoj djece i na resorpciju hranljivih materija, kao što su kalcijum, selen, bakar, željezo i magnezijum ali i na smanjenu aktivnosti različitih čelijskih enzima. Oovo se inače nakuplja najviše u bubrežima, jetri, kostima i zubima. [7,26].

Pored SEM-a koji je korišten u našoj studiji i drugih gore navedenih metoda ispitivanja olova u tvrdim zubnim tkivima, postoje i druge laboratorijske metode a jednu od njih je koristio i *Nabil-a* i njegovi saradnici (2012) koji su procijenjivali uticaj različitih koncentracija olova acetata kod mužjaka Albino pacova pomoću krvne slike, težine, krvne plazme, odnosno na osnovu funkcije jetre, bubrega i tiroidne žlezde. Na osnovu ove studije je potvrđeno da olovni acetat ima štetno dejstvo na eksperimentalne mužjake Albino pacova [103].

*Cleymaet* i saradnici su utvrdili da je koncentracija olova u krvi i pljuvački u korelaciji sa njegovim sadržajem u površinskom sloju gleđi [104].

U pojedinim radovima je ukazano na značaj olova u nastanku i razvoju nekih stomatoloških oboljenja. Tako je u jednoj od studija ispitivan sadržaj olova u zubima, pljuvački i gingivi radnika profesionalno izloženih olovu i dokazana značajna akumulacija olova kao i vezu olova u ovim tkivima i tečnostima sa dentalnim oboljenjima - karijesom i parodontopatijom [33,70].

## **7. ZAKLJUČAK**

Na osnovu dobijenih rezultata u ovom istraživanju mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Maseni udio olova u zubu pacova koji su dobijali oovo 30 dana, bio je detektovan samo u gleđi dok oovo u zubu pacova koji su dobijali oovo u vodi za piće tokom 14 dana nije detektovano ni u jednom sloju zuba.
2. Masenih udio kalcijuma u zuba pacova koji su dobijali oovo 30 dana, u oblasti gleđi je bio niži u odnosu na vrijednosti udjela kalcijuma u gleđi zuba pacova koji su dobijali oovo tokom 14 dana.
3. Maseni udio fosfora u zubima pacova koji su dobijali oovo tokom 30 dana bio je najmanji u gleđi i bio je niži nego u gleđi zuba pacova koji su dobijali oovo tokom 14 dana.
4. Ekspresija fibronektina je bila veća u zubima pacova koji su dobijali oovo tokom 30 dana nego u zuba pacova sa eksperimentalno izazvanim DM-om koji su dobijali oovo tokom 14 dana.
5. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 je bila je veća u zubima pacova koji su dobijali oovo tokom 30 dana nego u zubima pacova sa eksperimentalno izazvanim DM-om koji su dobijali oovo tokom 14 dana.
6. Ekspresija tenascina-C je bila je veća u zubima pacova koji su dobijali oovo tokom 30 dana nego u zubima pacova sa eksperimentalno izazvanim DM-om koji su dobijali oovo tokom 14 dana.
7. Morfoloških promjena u pulpi i gingivi, bilo je najviše u grupi pacova sa eksperimentalno izazvanim DM-om koji su uzimali oovo tokom 14 dana.
8. Pulpitis je bio znatno veći (česći) u grupi pacova sa eksperimentalno izazvanim DM-om koji su uzimali oovo tokom 14 dana.
9. Krvarenje u pulpi je bilo znatno veće u grupi pacova sa eksperimentalno izazvanim DM-om koji su uzimali oovo tokom 14 dana.
10. Pseudoepitelna hiperplazija je bila veća u grupi pacova sa eksperimentalno izazvanim DM-om koji su uzimali oovo tokom 14 dana.
11. Periodontitis i gingivitis su češće registrovani u grupi pacova sa eksperimentalno izazvanim DM-om koji su uzimali oovo tokom 14 dana.

## 8. LITERATURA

1. Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Marchlewicz M, Noceń I, Czupryńska K, Olszewska M, Skotnicka E, Jach M, Wiszniewska B, Chlubek D. The Effect of Melatonin Supplementationon Lead, Calcium and Magnesium Distributionin the Tissues of Lead-Exposed Rats, Polish J. of Environ. Stud. 2008;17(2):181-188.
2. Sroisiri T, Panjit C, Rudee S, Swasdison S, Suppukpatana P. Effects of lead on the proliferation, protein, production, and osteocalin secretion of human dental pulp *in vitro* 2002;33(3):9-12.
3. Vojinović J, Stevanović R. Patološka dentinogeneza u posteruptivnoj fazi razvoja zuba. Stomatološki Glasnik Srbije 2004;51(3):123-129.
4. Hwa-Yen L, Jiunn-Hsing C, Chun-Yu C, Hung-Lin C, Chung-Wei Y, Yuh-Chang S. Study of P, Ca, Sr, Ba and Pb Levels in Enamel and Dentine of Human Third Molars for Environmental and Archaeological Research. Advances in Anthropology 2013;3(2):71-77.
5. Stevanović R, Vojinović J. Eksperimentalna svetlosno mikroskopska izučavanja patološke dentinogeneze. Serbian Dental J 2005;52(2):27-40
6. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine TM induces TGF-b1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. International Endodontic Journal 2012;45: 439–448.
7. Masumi H, Takamasa S, Masatoshi K, Jun-ichi K, Toshihiko N. Regulation of tenascin expression in cultured rat dental pulp cells. Journal of Odontology 2004;92:22–26.
8. Manish A, Sheena W, Chan Y, Chris G. R, Kennedy B.J. Spatial Distribution of Lead in Enamel and Coronal Dentine of Wistar Rats Biological Trace Element Research. Sydney: Faculty of Dentistry, University of Sydney 2005;105 p.
9. Väkevä L, Mackie E, Kantomaa T, Thesleff I. Comparison of the distribution patterns of tenascin and alkaline phosphatase in developing teeth, cartilage, and bone of rats and mice Author information. Anat.Rec. 1990;228(1):69-76.
10. Mark FT, Smith MM, Ferguson MWJ. Development, Function and Evolution of Teeth 2007, Cambridge University Press; 2000.

11. Berkan O. et al. Pulpal Progenitors and Dentin Repair. *Advances in Dental Research* 2011;23:307-312
12. Irma T, Mackie E, Vainio S, Echiquet R. Changes in the distribution of tenascin during tooth development 1987;101(2):289-292.
13. Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. *Brazilian Dental Journal* 2011;22(1):3-13.
14. Baldissera EZ, Fernandes da Silva A, Gomes APN, Etges A, Botero T, Demarco FF, Tarquinio SBC. Tenascin and Fibronectin Expression after Pulp Capping with Different Hemostatic Agents: A Preliminary Study. *Brazilian Dental Journal* 2013;24(3):188-93.
15. Corrêa YT, Silva-Sousa LC, Cesar M, Foss M. Enamel Hypoplasia in a Litter of Rats with Alloxan-Induced Diabetes Mellitus. *Braz Dent J* 2003;14(2):87-93.
16. Zhang R, Cooper PR, Smith G, Nor J.E, Smith AJ. Angiogenic Activity of Dentin Matrix Components. *Journal of Endodontics* 2011;37:26-30.
17. Harichane Y, Hirata A, Dimitrova-Nakov S, Granja I, Goldberg A, Kellermann
18. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1996;7:104-133.
19. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Archives of Oral Biology* 2000;45:1013-1016.
20. Wirostko B, Wong TY, Simo R. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Progress in Retinal and Eye Research* 2008;27(6):608-621.
21. Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in healthy and inflamed human dental pulps. *Journal of Endodontics* 2002;28(1):20-23.
22. Fletcher A, Bregman C, Woicke J, Salcedo T, Zidell R, Janke H, et al. Incisor degeneration in rats induced by vascular endothelial growth factor/fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase inhibition. *Toxicologic Pathology* 2010;38(2):267-279.
23. Honore SM, Zelarayan LC, Genta SB, Sanchez SS. Neuronal loss and abnormal BMP/Smad signaling in the myenteric plexus of diabetic rats. *Autonomic Neuroscience- Basic & Clinical* 2011;164(1-2):51-61.

24. Issa Mardegan , Tocchini de Figueiredo F.A, Ramos J, Gerlach RF, Reiko Hashimoto Kawakita E. Tooth lead signal obtained by SEM-EDS may be useful for detection of environmental contamination with this metal. *Forensic Sci Int* 2012;214(1-3):96-104.
25. Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis:embryonic as a template for dental tissue repair. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12(5):425-437.
26. Gasic J, Radicevic G, Simonovic-Dacic D. Uloga pojedinih ćelija pulpe u procesu dentinogeneze (klasifikacija dentinogeneze). *Stomatološki Glasnik Srbije* 2004;16(1):66-76.
27. Tziafas D, Papadimitriou S. Role of exogenous TGF- $\beta$  in induction of reparative dentinogenesis in vivo. *European Journal of Oral Science* 1998;106(1):192-196.
28. Miori Pascona Miori F, Kantovitza KR, Caldo-Teixeirab AS, Sanches Borgesc AF, Tatiana Nunes Silvad, Puppin-Rontanie RM, Garcia-Godoyf F. Clinical evaluation of composite and compomer restorations in primary teeth: 24-month results. *Journal of Dentistry* 2006;34(6):381-388.
29. Šubarić Lj, Mitić A, Matvijenko V, Živković M, Živković D, Jovanović R, Perić D, Mitić A, Veselinović J. Promene na pulpi i dentinu nakon direktnog i indirektnog prekrivanja alkalnim cementom. *Praxis medica* 2013;42(3):23-3.
30. Mitić N, Dačić-Simonović D, Savić V. Reparative dentinogenesis caused by chronic pathologic irritation (SEM study). *Acta stomatologica naissi* 1995;23(2):11-15
31. Nichols MS, Shaw JH. The effect of alloxan diabetes on caries incidence in the albino rat. *J Dent Res* 1957;36(1):68–74.
32. Miralles L, Silvestre F.J, Hernandez-Mijares A, Bautista D, Llambes F, Grau D. Dental caries in type 1 diabetics: influence of systemic factors of the disease upon the development of dental caries. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11(3):256–260
33. Bal C, Oztas N, Cincik M, Baris E. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in rat molar teeth after pulp capping with Mineral trioxidide aggregate and Calcium hydroxide. *NY State Dent J* 2011;77(6):36-42
34. Yara Teresinha C, Soussa S, Luiz Cesar P, Enamel Hypoplasia in a Litter of Rats with Alloxan-Induced Diabetes Mellitus. *Braz Dent J* 2003;14(2):87-93.

35. Badr G. Supplementation with undenatured whey protein during diabetes melittus improves the healing and closure of diabetic wounds through the rescue of functional long-lived wound macrophages. *Cell Physiol Biochem* 2012;29(3-4):571-582.
36. Pashley DH, Carvahlo RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *Journal of Dentistry* 1997;25(5):355-72
37. D'Souza RN, Bachman T, Baumgardner KR, Butler WT, Litz M. Characterisation of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars. *J Dent Res.* 1995;74(2):702-709.
38. Lesot H, Smith AJ, Tzialas D, Begue-Kim C, Cassidy N, Ruch J.V. Effects of biologically active molecules on dental tissue repair: Comparison of reactionary and reparative dentinogenesis with the induction of odontoblast differentiation *in vitro*. *Cells. Materials* 1994;4:199-218
39. Lesot H, Begue-Kirn. Experimental induction of odontoblasts differentiation and stimulation during reparative processes. *Cell Mater* 1993;3:201-217
40. Goldberg M, Six N, Decup F, Lasfargues J, Salih E, Tompkins K, Veis A. Bioactive molecules and the future of pulp therapy. *Am. J Dent.* 2003;16(1):66-76.
41. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *Journal of Dentistry* 2010;38(9):687-697
42. Paula-Silva F, Ghosh A, Silva L, Kapila Y. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *Journal of Dental Research* 2009;88(4):339-344.
43. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *Journal of Dentistry* 2010;38(9):687-697
44. Kilian O, Flesch I, Wenisch S, Taborski B, Jork A, Schnettler R, Jonuleit T. Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells *in vitro*. *Eur J Med Res* 2009;9(7):337-44
45. Magloire H, Romeas A, Melin M, Couble ML, Bleicher F, Farges JC. Molecular regulation of odontoblasts activity under dentin injury. *Adv Dent Res.* 2001;15(1):46-50.

46. Vaahtokari A, Thomas Åberg T, Jernvall J, Keränen S, Thesleff I. The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *The Mechanisms of Development* 1996;54(1):39-43.
47. Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II and TGF- in human dentin. *Bone Miner Res* 1990;5:717-723.
48. Tabatabaei FS, Torshabi MJ Effects of Non-Collagenous Proteins, TGF- $\beta$ 1, and PDGF-BB on Viability and Proliferation of Dental Pulp Stem Cells *Oral Maxillofac Res*. 2016;31;7(1):e4.
49. Liu J, Jin T, Chang S, Ritchie HH, Smith AJ, Clarkson BH, Hama-Tamaki T, Kaku M, Shibata S. Matrix and TGF- $\beta$ -related gene expression during human dental pulp stem cell (DPSC) mineralization. *In Vitro Cell Bio Anim* 2007;43(3-4):120-128.
50. Bostrom KI, Jumabay M, Matveyenko A, Nicholas SB, Yao YC. Activation of Vascular Bone Morphogenetic Protein Signaling in Diabetes Mellitus. *Circulation Research* 2011;108:446-457.
51. Graham M. Pulp Healing and Regeneration. More Questions than Answers. *Advances in Dental Research* 2011;23(3):270-274
52. Thompson CB, Challoner PB, Neiman PE, Groudine M. Levels of c-myc oncogene mRNA are invariant throughout the cell cycle. *Nature* 1985;314:363-366.
53. Tziafas D, Alvanou A, Papadimitriou S, Gasic J, Komnenou. Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor- $\beta$  1 on dog dental pulp cells in vivo. *Arch Oral Bio* 1988;43(6):431-434.
54. Murray PE, Hafez AA, Smith AJ, Windsor LJ, Cox CF. Histomorphometric analysis of odontoblast-like cell number and dentine bridge secretory activity following pulp exposure. *Int Endod J* 2003;36(2):106-116.
55. Bjorndal L. Presence or absence of tertiary dentinogenesis in relation to caries progression. *Adv Dent Res* 2001;15:80-83.
56. Wieser R, Attisano L, Wrana JL, Massague J. Signaling activity of transforming growth factor e type II receptors lacking specific domains in the cytoplasmic region. *Mol. Cell. Biol.* 1993;13:7239-7247

57. Yoshiha K, Yoshiha N, Nakamura H, Iwaku M, Ozawal H. Immunolocalization of Fibronectin during Reparative Dentinogenesis in Human Teeth after Pulp Capping with Calcium Hydroxide, *J Dent Res* 1996;75(8): 1590-1597.
58. Mizuno M, Banzai Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin, *Int Endod J.* 2008;41(11):933-8.
59. Leites AB, Baldissera EZ, Silva AF, Tarquinio S, Botero T, Piva E, Demarco FF. Histologic response and tenascin and fibronectin expression after pulp capping in pig primary teeth with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *Oper Dent.* 2011;36(4):448-56.
60. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1993;4:679-72.
61. Zarrabi MH, Javidi M, Jafarian AH, Joushan B. Immunohistochemical expression of fibronectin and tenascin in human tooth pulp capped with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. *J Endod.* 2011;37(12):1613-8. doi: 10.1016/j.joen.2011.08.021. Epub 2011 Oct 13.
62. Etges R, Bouvier J, Bordier C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J Biol Chem.* 1986;261:9098–9101.
63. Sato R, Fukuoka H, Yoko. Immunohistochemical localization of tenascin-C in rat periodontal ligament with reference to alveolar bone remodeling. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2007;43(3-4):120-128.
64. Honore SM, Zelarayan LC, Genta SB, Sanchez SS. Neuronal loss and abnormal BMP/Smad signaling in the myenteric plexus of diabetic rats. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical* 2011;164(1-2):51-61.
65. Thesleff I, Vainio S, Jalkanen M. Cell matrix interactions in tooth development. *Int J Dev Biol.* 1989;31:91–97.
66. Leite MF, Ganzerla E, Marques MM, Nicolau J. Diabetes induces metabolic alterations in dental pulp. *Journal of Endodontics* 2008;34:1211-1214.
67. Sahlberg C, Aukhil I, Thesleff I. Tenascin-C in developing mouse teeth: expression of splice variants and stimulation by TGF- $\beta$  and FGF. *Eur J Oral Sci.* 2001;109:114–124

68. Obradović B, Oralne manifestacije kod šećerne bolesti. *Acta Stomatologica Croatica* 1991;25:59-63.
69. Paula-Silva F, Ghosh A, Silva L, Kapila Y. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *Journal of Dental Research* 2009;88:339-344.
70. Abbas Mesgarani, Sina Haghifar, Narges Eshkevari, Maryam Ehsani, Soraya Khafri, Shima Nafarzade, Zahra Damankesh, Frequency of odontogenic periradicular lesions in diabetic patients, *Caspian J Intern Med.* 2014 Winter; 5(1): 22–25.
71. Moradi S, Saghravanian N, Moushekhan S, Fatemi S, Forghani. Immunohistochemical Evaluation of Fibronectin and Tenascin Following Direct Pulp Capping with Mineral Trioxide Aggregate, Platelet-Rich Plasma and Propolis in Dogs' Teeth. *Iran Endod Journal* 2015;10(3):188-92.
72. Niu R, Sun Z, Wang J, Cheng Z, Shanxi W.J, Effects of fluoride and lead on locomotor behavior and expression of nissl body in brain of adult rats. *Research report Fluoride* 2008;41(4)276–282.
73. Bercovitz K, Laufer D. Tooth type as indicator of exposure to lead of adults and children. *Archives of Oral Biology* 1990;35(1): 895-897
74. Schroeder U. Reaction of human pulp to experimental pulpectomy and capping with calcium hydroxide. *Odontology Review* 1973;24-25.
75. Sauk JJ, Smith T, Silbergeld EK, Fowler BA, Sommerman MJ. Lead inhibits secretion of osteonectin/SPARC without significantly altering collagen or Hsp 47 production in osteoblastlike ROS 17/2.8 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;116: 240-7.
76. Long G.J, Rosen J.F, Pounds J.G. Lead impairs the production of osteocalcin by rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;106(2): 207-217.
77. Gomes VE, Gerlach RF, Sousa MLR, Krug FJ. Concentração de chumbo em dentes decidídos de pré- escolares de Piracicaba, SP, Brasil Estudo Piloto. *Rev Odonto Ciência* 2003;18(3):73-76.
78. Youravong N, Teampaisan R, Norén JG, Robertson A, Dietz W, Odelius H, Dahlén G. Chemical composition of enamel and dentine in primary teeth in children from Thailand exposed to lead. *Sci Total Environ.* 2008;389(2-3):253-8. Epub 2007.

79. Anttila A. Trace-element content in the enamel surface and in whole enamel of deciduous incisors by proton-induced X-ray emission of children from rural and urban Finnish areas. *Arch Oral Biol.* 1987;32(10):713-717
80. V Järvinen et al Lead Content of Deciduous Molar Enamel in Finland, as Measured by Proton-Induced X-Ray Emission. *Scand J Work Environ Health* 1984;10(2), 103-107.
81. Frank RM, Sargentini-Maier ML, Turlot JC, Leroy MJ. Comparison of lead levels in human permanent teeth from Strasbourg, Mexico City, and rural zones of Alsace. *J Dent Res* 1990;69:90-3
82. Arora M, Chan SW, Ryan CG, Kennedy BJ, Walker DM. Spatial distribution of lead in enamel and coronal dentine of wistar rats. *Biol Trace Elem Res.* 2005;105(1-3):159-70.
83. Grobler SR, Rossouw RJ, Kotze D. Lead in teeth of weanling rats received via the maternal drinking water. *Arch Oral Biol.* 1985;30(6):509-511.
84. Watson GE, Davis BA, Raubertas RF, Pearson SK, Bowen WH. Influence of maternal lead ingestion on caries in rat pups. *Nat. Med.* 1997;3:1024-1025.
85. Wesenberg GBR, Gosse G, Justesen NP, Rasmussen P. Lead and cadmium in teeth, bone and kidneys of rats with a standard Pb-Cd supply. *Inr. J. environ. Stud.* 1979;14:223-230.
86. Gerlach RF, Cury JA, Krug FJ, Line SRP. Effect of lead on dental enamel formation. *Sci Total Environ* 2004;318:45-58.
87. Thaweeboon S, Chunhabundit P, Surarit R, Swasdison S, Suppukpatana S. Effects of lead on the proliferation, protein production, and osteocalcin secretion of human dental pulp cells *in vitro*. *Southeast Asian J trom Med Public Helath* 2002;33(3):654-661.
88. Er F, Koparal M, Deveci E, Irtegün S. Immunohistochemical and histopathological changes in the teeth of rats after lead acetate application. *Anal Quant Cytopathol Histopathol.* 2015;37(2):109-114.
89. Yamamura T. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulp wound healing. *J Dent Res* 1985;64:530-42.
90. Nakanishi M, Nagasawa H, Tamada Y, Reddi AH. Regulatory role of transforming growth factor- $\beta$  bone morphogenic protein-2 and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol* 1994;162:18-22.

91. Abdullah M, Rahman FA, Gnanasegaran N, Govindasamy V, Kasim NHB, Musa S. Diverse Effects of Lead Nitrate on the Proliferation, Differentiation, and Gene Expression of Stem Cells Isolated from a Dental Origin. *The Scientific World Journal* 2014;12p.
92. Martin RR, Naftel SJ, Nelson AJ, Feilen AB, Narvaez A. Metal distributions in the cementum rings of human teeth: Possible depositional chronologies and diagenesis. *J. Archaeology Sci.* 2007;34(6), 936–945
93. Tvinnereim HM, Eide R, Riise T. Heavy metals in human primary teeth: some factors influencing the metal concentrations. *Sci. Total Environ.* 2000; 255, 21–27.
94. Cenić-Milošević D, Mileusnić I, Kolak V, Pejanović Đ, Ristić T, Jakovljević A, Popović M, Pešić D, Melih I. Zagađenje okoline olovom i njegov uticaj na gubitak zuba i lezije tvrdih zubnih tkiva. *Vojnosanit Pregl* 2013;70(8):751–756.
95. Barmes DE, Adkins BL, Schamschula RG. Etiology of caries in Papua-New Guinea: associations in soil, food and water. *Bull, WHO* 1970;43:769-84.
96. Brudevold F, Steadman LT. The distribution of lead in human enamel *Journal of Dental Research* 1956;35,430-437.
97. Curzon Losee Curzon MES, Crocker DC. Relationships of trace elements in human tooth enamel to dental caries. *Arch Oral Biol* 1978;23:647-53.
98. . Vulović M, Beloica D, Gajić M, Carević M, Stevanović R, Ivanović M, Vulićević Z, Marković D. Beograd: Elit-Medica; 2002
99. Lakhtin Yu.V. Harmonization of heavy metal metabolism in jaw alveolar bone and teeth enamel of rats under the effect of  $\alpha$ -lipoic acid. *Stomatology* 2013;1:42-44.
100. Malara P, Kwapuliński J, Drugacz J, Lead and cadmium occurrence in deciduous teeth of children exposed to cigarette smoke in apartments. *Przegl Lek.* 2004;61(10):1122-5
101. Sawani RM, Leite GA, Saraiva MC, Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Fluoride increases lead concentrations in whole blood and in calcified tissues from lead-exposed rats. *Toxicology* 2010;271(1-2):21-26.
102. Orzechowska-Wylegała B, Obuchowicz A, Malara P, Fischer A, Kalita B. Cadmium and lead accumulate in the deciduous teeth of children with celiac disease or food allergies. *Int J Stomatol Occlusion Med.* 2011;4(1):28-31. Epub 2011.

103. Nabil IM, Eweis EA, El-Beltagi HS, Abdel-Mobdy YE. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2(1): 41-46.
104. Cleymaet R, Bottemberg P, Slop D, Clara R, Coomans D. Study of lead and cadmium content of surface enamel of schoolchildren from an industrial area in Belgium. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991;19:107–11.
105. Mazhari F, Khordi Mood M, Esmaeili H, Tootooni H. Prevalence of periodontal diseases and oral health status, in children with type I Diabetes in Khorasan, Iran in 2002. *The J Islamic Dent Assoc Iran (JIDA)* 2007;19:29–34.
106. Katanzaro Catalano P, Benassi V, Caldarini C, Cianfriglia L, Mosticone R, Nava A, Pantano W, Porreca F. Health status and life style in Castel Malnomo (Rome, I-II cent. A.D.). *Med Secoli* 2010;22:111–128.
107. Đeri A. Magistarska teza, Efekti mineral trioksid agregata i kalcijum hidroksida na pulpu zuba pacova sa eksperimentalno izazvanim diabetes mellitus-om tipa 1. Medicinski fakultet Banja Luka 2014.
108. Appleton J. The effect of lead acetate on dentine formation in the rat. *Arch Oral Biol.* 1991;36(5):377–382.
109. Gil F, Facio A, Villanueva E, Pérez ML, Tojo R, Gil A. The association of tooth lead content with dental health factors. *Sci Total Environ.* 1996 Dec 2;192(2):183–191
110. Anttila A. Lead content of deciduous tooth enamel from a high-radon area. *Acta Odontol Scand.* 1987 Aug;45(4):283-8.
111. Tesseromatis C. Kotsiou A., Parara H., Vairaktaris E., and Tsamouri M., Morphological Changes of Gingiva in Streptozotocin Diabetic Rats. *Int J Dent.* 2009; 2009: 725628. Published online 2009 Jan 27. doi: 10.1155/2009/725628
112. Ivar A.Mjor, Biologija Pulpe i Dentina u Restaurativnoj Stomatologiji, Data Status 2008, Beograd

## BIOGRAFIJA MR SC. IRENE KUZMANOVIĆ RADMAN

Mr sc. Irena Kuzmanović Radman rođena je 1978. godine u Banjoj Luci. Osnovnu školu "Vuk Karadžić" je završila 1993. godine, a Gimnaziju 1997. godine u Banjoj Luci. Nižu muzičku školu "Vlado Milošević" u Banjoj Luci završila je 1994. godine. Na Medicinskom fakultetu u Banjoj Luci diplomirala je 2005. godine, sa prosječnom ocjenom 8.06. Na Katedri za bolesti zuba Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci zaposlena je 2006. godine. Postdiplomski studij je završila 2010. godine sa prosječnom ocjenom 10.00, a magistarski rad pod nazivom "Mikrobiološka i klinička istraživanja dubokih karijesnih lezija" odbranila je 2012. godine.

Član je Komore doktora stomatologije RS. U toku rada na fakultetu, učestvovala je na brojnim naučnim skupovima, nekoliko stručnih kurseva te je objavila nekoliko radova iz oblasti bolesti zuba.

**UNIVERZITET U BANJOJ LUCI**  
**PODACI O AUTORU ODBRANJENE DOKTORSKE DISERTACIJE**

Ime i prezime autora disertacije: Irena Kuzmanović Radman

Datum, mjesto i država rođenja autora: 7.08.1978., Banja Luka, Bosna i Hercegovina

Naziv završenog fakulteta i godina diplomiranja: Medicinski fakultet u Banjoj Luci, 2005.

Datum odbrane magistarskog rada: 26.04.2012.

Naslov magistarskog rada autora: "Mikrobiološka i klinička istraživanja dubokih karijesnih lezija"

Akademска titula koju je autor stekao odbranom magistarskog rada: magistar stomatoloških nauka

Akademска titula koju je autor stekao odbranom doktorske disertacije: doktor stomatoloških nauka

Naziv fakulteta na kome je doktorska disertacija odbranjena: Medicinski fakultet u Banjoj Luci

Naziv doktorske disertacije i datum odbrane: Uticaj olova na distribuciju medijatora odontogeneze u dijabetesom izmjenjenoj pulpi zuba

Naučna oblast disertacije prema CERIF šifarniku: B 730

Imena mentora i članova komisije za odbranu doktorske disertacije:

Mentor: Prof. dr Slavoljub Živković

Članovi komisije:

Predsjednik komisije: doc. dr Aleksandra Đeri

Član komisije: prof. dr Radoslav Gajanin

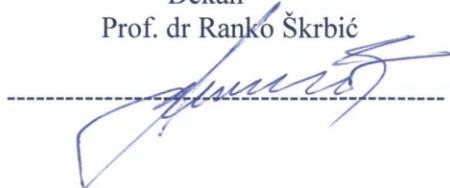
Član komisije: prof. dr Slavoljub Živković

Član komisije: doc. dr Sanja Gnjato

Član komisije: doc. dr Nataša Knežević

Dekan  
Prof. dr Ranko Škrbić

U Banjoj Luci, jul 2017.



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ:



**ИЗВЈЕШТАЈ**  
*о оцјени урађене докторске дисертације*

**І ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ**

Наставно-научно вијеће Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци, на сједници одржаној 14.03.2017. године, донијело је Одлуку број:18/3.241/2017. о именовању Комисије за оцјену и одбрану урађене докторске дисертације мр сц. Ирене Кузмановић Радман под називом „Утицај олова на дистрибуцију медијатора одонтогенезе у дијабетесом измеђеној пулти зуба пацова”.

Именована је комисија у слједећем саставу:

1. Предсједник:  
Доц.др Александра Ђери  
Звање: доцент  
Ужа научна област: Болести зуба  
Институција: Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет
2. Члан:  
Проф. др Славољуб Живковић  
Звање: редовни професор  
Ужа научна област: Болести зуба  
Институција: Универзитет у Београду, Стоматолошки факултет, ментор и члан
3. Члан:  
Проф. др Радослав Гајанин  
Звање: редовни професор  
Ужа научна област: Патологија  
Институција: Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет.
4. Члан:  
Доц. др Наташа Гајић  
Звање: доцент  
Ужа научна област: Болести зуба  
Институција: Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет, члан
5. Члан:  
Доц. др Сања Гњато

Звање: доцент

Ужа научна област: Протетика

Институција: Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет, члан

Након детаљног прегледа урађене докторске дисертације кандидата мр сц. Ирене Кузмановић Радман чланови Комисије подносе Наставно-научном вијећу Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци и Сенату Универзитета у Бањој Луци слједећи извјештај:

## II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

Иrena (Звонимир) Кузмановић Радман.

Рођена 07.08.1978. године у Бањој Луци, Република Српска, Босна и Херцеговина. Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет, Студијски програм стоматологија, кандидаткиња је завршила 2005. године са просјечном оцјеном 8,06, те стекла звање доктора стоматологије.

Кандидаткиња је уписала постдипломски студиј на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци 2007. године и успјешно га завршила са просјечном оцјеном 9,80. На Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци у априлу 2012. године успјешно је одбранила магистарски рад под називом: „Микробиолошка и клиничка истраживања дубоких каријесних лезија”, и тиме стекла звање магистра стоматолошких наука из области Болести зуба.

## III УВОДНИ ДИО ОЦЛЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов докторске дисертације мр сц. Ирене Кузмановић Радман је:

„Утицај олова на дистрибуцију медијатора одонтогенезе у дијабетесом измијењеној пулпи зуба пацова”.

Тема докторске дисертације је прихваћена од стране Наставно-научног вијећа Медицинског факултета, Универзитета у Бањој Луци Одлуком број: 18/3.107/2016 од 10.02.2016. Сенат Универзитета у Бањој Луци Одлуком број: 02/04-3.536-78/16 од 2.03.2016. године дао је сагласност на Извјештај о оцјени услова и подобности теме за израду докторске дисертације на Медицинском факултету у Бањој Луци кандидаткиње мр сц. Ирене Кузмановић Радман под називом „Утицај олова на дистрибуцију медијатора одонтогенезе у дијабетесом измијењеној пулпи зуба пацова”.

Садржај докторске дисертације је изложен у слједећим поглављима:

- 1) Увод (стр. 1-36),
- 2) Хипотеза (стр. 37),
- 3) Циљ рада (стр. 38),
- 4) Материјал и методе (стр. 39-46),
- 5) Резултати истраживања (стр. 47-73),

- 6) Дискусија (стр. 74-88),
- 7) Закључак (стр. 89-90) и
- 8) Литература (стр. 91-100).

Докторска дисертација је написана латиничним писмом, фонтом *Times New Roman*, величина 12. Дисертација је написана на укупно 101 страница, формата А4. На почетку дисертације налази се 8 страна које нису нумерисане, а односе се на наслов дисертације, резиме (на српском и на енглеском језику), захвалницу и на садржај докторске дисертације. Дисертација садржи 18 табеле и 28 слика. Укупан фонд кориштене литературе чини 112 литерарна извора.

**У првој целини** (стр.1-36) истакнут је разлог због којег је ово истраживање предузето. Укратко је представљен предмет истраживања и истакнута је изложеност олову у животној средини којој се данас се сматра главном здравственом темом јер је то један од најштетнијих токсина, укључујући анемију, хипертензију, патологију костију и зуба подразумевајући и каријес тврдих зубних ткива. Чврста ткива зуба се разликују по својим ограниченим способностима да ослобађају акумулисане елементе у системске течности, па зато представљају идеалне структуре за процјену дугорочних ефеката излагања токсичним металима. Такође, истакнуто је да чврста зубна ткива се састоје од неколико различитих минерала који са калцијумом представљају главни макро-минерал. Физиолошки важни минерали као и неки токсични метали се током времена могу акумулирати у калцификованим ткивима (зубу и костима). Чврста ткива зуба због ограничених могућности ослобађања ових акумулисаних елемента. Зато представљају идеална ткива за процјену дугорочних ефеката излагања организма токсичним металима. Један од таквих токсичних тешких метала је олово, које се везује за зуб, али и остаје у динамичном балансу са нормалним саставом зубне супстанце.

**У другој целини** (стр.35) представљена је хипотеза спроведеног истраживања која указује да се олово интензивно одлаже у глеђи и дентину зуба пацова. Олово утиче на експресију медијатора одонтогенезе-фибректина, тенасцина и ТГФ- $\beta$ 1 у пулпи. Дијабетес значајно мијења експресију медијатора одонтогенезе-фибректина, тенасцина и ТГФ- $\beta$ 1.

Циљеви истраживања су дати у  **трећој целини** (стр.38). Циљеви истраживања су прецизно постављени како би се испитала концентрација олова у тврдим зубним ткивима и утицај олова на медијаторе одонтогенезе у пулпи зуба експерименталних животиња.

**У четвртој целини** (стр.39-46) представљена је основна методологија истраживања. У овом дијелу детаљно је описан прикупљени узорак као и критеријуми за њихов избор, кориштени материјал и детаљна методологија рада током истраживања.

**Садржај пете целине** (стр. 47-73). У оквиру овог дијела дисертације приказани су резултати по фазама истраживања. Детаљно су приказани добијени резултати имунохистохемијске анализе и EDS анализе зуба пацова који су добијали олово у периоду од 14 и 30 дана.

**Шеста целина** у овој докторској дисертацији (стр. 74-88) представљена је дискусијом добијених резултата истраживања и њиховом компарацијом са већ постојећим сличним истраживањима у овој научној области. Представљени су и образложени доприноси овог рада, постојећим сазнањима о утицају олова на одонтогенезу.

**У седмој целини** (стр. 89-90) ове дисертације, кандидаткиња је на јасан и систематичан начин представила синтезу сазнања и научних чињеница изнесених у оквиру дисертације, добијених на основу резултата истраживања и тестирања

хипотезе.

**Осма цјелина** (стр. 91-100) ове дисертације представља списак кориштене литературе у оквиру спроведеног истраживања, а у оквиру израде ове дисертације.

#### IV УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

##### **IV 1. Разлог због којег је истраживање предузето, проблем, предмет, циљеви и хипотеза истраживања**

У оквиру увода и прегледа литературе докторске дисертације јасно су и логичким редослиједом описаны основни појмови о *проблему* који се истражује, почев од појма општег стање пацијената у подручјима загадјеним оловом и његове дистрибуције у глеђи и дентину зуба што представља *предмет* овог истраживања. Детаљно су описане велике промјене на зубима код одраслих, а посебно код дјеце која су била изложена интоксикацији оловом. У једној од многих студија утврђено је, употребом пламене атомске апсорpcione спектрофотометрије да се олово највише акумулирало у млијечним зубима и то више код болесне него код здраве дјеце и да су токсични тешки метали, који су се дистрибуисали у зубе остали у динамичном балансу са нормалном грађом зуба, тј. били су замијењени калцијумом у хидроксилапатитним кристалима. Кандидат указује на опасност олова у загађеним подручјима и детаљно описује како повећане концентрације олова могу дјеловати на нормалан развој дјеце и на ресорпцију калцијума, селена, бакра, жељеза и магнезијума и на смањену активности различитих ћелијских ензима што представља и *разлог* због којег је истраживање предузето. Истакнуто је да се олово највише накупља у бubreзима, јетри, костима и зубима. Продукти који елиминишу олово из тијела укључују витамин С и Е, селен, жељезо и амино киселине, као сто су метионин и цистеин. Загађење околине тешким металима, доводи до тога, да их тијело апсорбује.

Основни циљ истраживања био је да се испита концентрација олова у тврдим зубним ткивима и утицај олова на медијаторе одонтогенезе у пулпи експерименталних животиња.

Ближи *циљеви* истраживања били су :

- Да се СЕМ/ЕДС анализом одреди концентрација олова у тврдим зубним ткивима пацова са експериментално изазваним дијабетесом, након 14 дана излагања животиња олову.
- Да се СЕМ/ЕДС анализом одреди концентрација олова у тврдим зубним ткивима пацова са експериментално изазваним дијабетесом, након 30 дана излагања животиња олову.
- Да се имунохистохемијском анализом одреде експресије медијатора одонтогенезе фибронектина, тенасцина и ТГФ- $\beta 1$  фактора у пулпи зуба пацова са експериментално иззваним дијабетесом након излагања олову 14 дана.
- Да се имунохистохемијском анализом одреде експресије медијатора одонтогенезе фибронектина, тенасцина и ТГФ- $\beta 1$  фактора у пулпи зуба пацова са експериментално иззваним дијабетесом након излагања олову 30 дана.
- Да се формира скала експресије медијатора фибронектина, тенасцина и ТГФ- $\beta 1$ , код здравих животиња код којих пулпа није стимулисана.

*Хипотезе* овог истраживања су:

- Олово се интензивно одлаже у глеђи и дентину зуба пацова.

- Олово утиче на експресију медијатора одонтогенезе-фибронектина, тенасцина и ТГФ- $\beta$ 1 у пулпи.
- Дијабетес значајно мијења експресију медијатора одонтогенезе-фибронектина, тенасцина и ТГФ- $\beta$ 1.

#### **IV 2. Преглед претходних истраживања**

Дошло се до резултата да се у дентална ткива уграђује олово у току развоја зуба, као што су очене и хипоплазије глеђи, абразије и дисколорације на зубима у загађеним подручјима и то би могли бити показатељи, а да се глеђ мијења под утицајем олова. Зуби су корисна, дуготрајна евиденција о дистрибуцији олова, о чему говоре многа епидемиолошка истраживања истичући да олово утиче на настанак каријеса и да дјеца интоксицирана оловом, имају веома висок ниво олова угађеног у дентин, у близини пулпе [1,2].

Бројни истраживачи су успјешно култивисали фибробласте из пулпе дентина и доказали да фибробласти имају способност трансформације у одонтобласте, који формирају дентин као одговор на повреду. Додатно су испитивали и ефекат олова на проколагени тип и производњу остеокалцина, а резултати су показали да олово при концентрацији 10-5 – 10-7M повећава размножавање пулпних ћелија код људи IN VITRO [3-5]. У овом поглављу кандидат описује медијаторе одонтогенезе :

Репаративна дентиногенеза је сложен процес, који прије секреције дентина, обухвата читав низ догађаја тј. ћелијску диобу прогенитора, хемотаксу, ћелијску миграцију, адхезију и диференцијацију у ћелије сличне одонтобластима. Нарочито велике недоумице постоје у дефинисању иницијативне фазе у диференцијацији нових одонтобласта, који треба да замијене регуларне одонтобласте, уништене дејством иритативних фактора, и започну са дентиногенезом. У вези са овом проблематиком, спроведена су бројна истраживања те се иницијативни утицај за диференцијацију нових одонтобласта, приписивао коштаном сијалопротеину, јону калцијума, екстрацелуларном матриксу, фактору раста, цитокинима. Јако су реакције пулпо-дентинског комплекса на ноксе давно објашњене, њихови ћелијски и молекуларни механизми још нису у потпуности истражени. Сигнални молекули ових процеса су ткивни фактори раста, тенасцин, фибронектин и др. Повећана експресија хормона раста је пронађена у ћелијама пулпе током терцијарне дентиногенезе и утврђена је улога овог фактора раста на диференцијацију специфичних ћелија пулпе неопходних у репараторном одговору. Студије су показале да ткивни фактори раста могу да изазову трансдентинску стимулацију одонтобласта IN VIVO и да утиче на васкуларне реакције неопходне у реaktivnoј дентиногенези [6,7].

Тенасцин-ц је ектраћелијски, протеин матрикса, У студијама, које су најчешће рађене на пацовима и мишевима, видљива је привремена заступљеност тенасцина на пулпи. Уочена је смањена вриједност тенасцина у одонтобластима. Истраживање на мишевима такође је показало да је тенасцина изражен у ћелијама пулпе дентина IN VITRO и да се његово дејство знатно повећало под утицајем TGF- $\beta$ 16, HGF, и RA у mRNA и протеинима. Доказано је да тенасцин кочи (успорава) спајање ћелија помоћу фибронектина како би се смањило спајање у току развоја зуба. Биолошке функције тенасцин-ц су још увијек недовољно разумљиве[8-10].

Фибронектин је екстрацелуларни гликопротеин матрикса и доказано је, да су молекули фибронектина уплетени у различите ћелијске функције укључујући адхезију, миграцију и диференцијацију [11-15]. Током развоја зуба, диференцијација одонтобласта је контролисана од стране специфичне базалне мембрane и нека истраживања указују на присуство и везу фибронектина и ове базалне мембрane, који имају важну улогу у диференцијацији одонтобласта. Сматра се да фибронектин и базална мембра на посредују у издуживању и поларизацији

одонтобласта, трансмембранском интеракцијом. Ова сазнања указују на могућу улогу фибронектина у секундарној иницијацији диференцијације одонтобластоидних ћелија [17-20].

#### Литература цитирана у IV 2.

- [1] Orzechowska-Wylegała B, Obuchowicz A, Malara P, Fischer A, Kalita B. Cadmium and lead accumulate in the deciduous teeth of children with celiac disease or food allergies. *Int J Stomatol Occlusion Med.* 2011;4(1):28-31. Epub 2011.
- [2] Abdullah M, Rahman FA, Gnanasegaran N, Govindasamy V, Kasim NHB, Musa S. Diverse Effects of Lead Nitrate on the Proliferation, Differentiation, and Gene Expression of Stem Cells Isolated from a Dental Origin. *The Scientific World Journal* 2014;12p.
- [3] Er F, Koparal M, Deveci E, Irtegün S. Immunohistochemical and histopathological changes in the teeth of rats after lead acetate application. *Anal Quant Cytopathol Histopathol.* 2015;37(2):109-114.
- [4] Moradi S, Saghravanian N, Moushekhan S, Fatemi S, Forghani. Immunohistochemical Evaluation of Fibronectin and Tenascin Following Direct Pulp Capping with Mineral Trioxide Aggregate, Platelet-Rich Plasma and Propolis in Dogs' Teeth. *Iran Endod Journal* 2015;10(3):188-92.
- [5] Abbas Mesgarani, Sina Haghifar, Narges Eshkevari, Maryam Ehsani, Soraya Khafri, Shima Nafarzade, Zahra Damankesh, Frequency of odontogenic periradicular lesions in diabetic patients, *Caspian J Intern Med.* 2014 Winter; 5(1): 22–25.
- [6] Honore SM, Zelarayan LC, Genta SB, Sanchez SS. Neuronal loss and abnormal BMP/Smad signaling in the myenteric plexus of diabetic rats. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical* 2011;164(1-2):51-61.
- [7] Zarabi MH, Javidi M, Jafarian AH, Joushan B. Immunohistochemical expression of fibronectin and tenascin in human tooth pulp capped with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. *J Endod.* 2011;37(12):1613-8.
- [8] Leites AB, Baldissera EZ, Silva AF, Tarquinio S, Botero T, Piva E, Demarco FF. Histologic response and tenascin and fibronectin expression after pulp capping in pig primary teeth with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *Oper Dent.* 2011;36(4):448-56.
- [9] Bostrom KI, Jumabay M, Matveyenko A, Nicholas SB, Yao YC. Activation of Vascular Bone Morphogenetic Protein Signaling in Diabetes Mellitus. *Circulation Research* 2011;108:446-457.
- [10] Tabatabaei FS, Torshabi MJ Effects of Non-Collagenous Proteins, TGF- $\beta$ 1, and PDGF-BB on Viability and Proliferation of Dental Pulp Stem Cells *Oral Maxillofac Res.* 2016;31;7(1):e4.
- [11] Bal C, Oztas N, Cincik M, Baris E. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in rat molar teeth after pulp capping with Mineral trioksid agregat and Calcium hydroxide. *NY State Dent J* 2011;77(6):36-42
- [12] Šubarić Lj, Mitić A, Matvijenko V, Živković M, Živković D, Jovanović R, Perić D, Mitić A, Veselinović J. Promene na pulpi i dentinu nakon direktnog i indirektnog prekrivanja alkalnim cementom. *Praxis medica* 2013;42(3):23-3.
- [13] Issa Mardegan , Tocchini de Figueiredo F.A, Ramos J, Gerlach RF, Reiko Hashimoto Kawakita E. Tooth lead signal obtained by SEM-EDS may be useful for detection of environmental contamination with this metal. *Forensic Sci Int* 2012;214(1-3):96-104.
- [14] Berkan O. et al. Pulpal Progenitors and Dentin Repair. *Advances in Dental Research* 2011;23:307-312
- [15] Hwa-Yen L, Jiunn-Hsing C, Chun-Yu C, Hung-Lin C, Chung-Wei Y, Yuh-Chang S. Study of P, Ca, Sr, Ba and Pb Levels in Enamel and Dentine of Human Third Molars for

Environmental and Archaeological Research. Advances in Anthropology 2013;3(2):71-77.

- [16] Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Marchlewicz M, Noceń I, Czupryńska K, Olszewska M, Skotnicka E, Jach M, Wiszniewska B, Chlubek D. The Effect of Melatonin Supplementationon Lead, Calcium and Magnesium Distributionin the Tissues of Lead-Exposed Rats, Polish J. of Environ. Stud. 2008;17(2):181-188.
- [17] Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. Brazilian Dental Journal 2011;22(1):3-13.
- [18] Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. Journal of Dentistry 2010;38(9):687-697
- [19] Vulović M, Beloica D, Gajić M, Carević M, Stevanović R, Ivanović M, Vulićević Z, Marković D. Beograd: Elit-Medica; 2002
- [20] Katanzaro Catalano P, Benassi V, Caldarini C, Cianfriglia,L, Mosticone R, Nava A, Pantano W, Porreca F. Health status and life style in Castel Malnôme (Rome, I-II cent. A.D.). Med Secoli 2010;22:111–128.

#### **IV 3. Допринос тезе у ријешавању изучаваног предмета истраживања**

На овим подручјима је јако мало број експерименталних студија која се баве фундаменталним истраживањима и које користе сличну методологију рада, и у укупној свјетској литератури постоји веома мали број радова који се баве проблемом ћелијских механизама репаративне дентиногенезе и експресијом медијатора одонтогенезе у пулпама, код особа изложених тровањем оловом и код особа оболјелих од дијабетеса, већ су углавном базирани на здраву популацију. Управо због тога је у овој дисертацији мр сц. Ирена Кузмановић Радман дала *допринос* својом студијом која се бавила испитивањем концентрација олова у тврдим зубним ткивима и утицајем олова на медијаторе одонтогенезе у пулпама експерименталних животиња. Или боље речено, анализа резултата је обухватала спектрофотометријску анализу концентрације олова у пресјечима зуба, затим патохистолошку анализу грађе глеђи и дентина у условима интоксикације оловом као и имунохистохемијску анализу ослобађања медијатора одонтогенезе (фибронектина, тенасин и ТГФ бета 1) у зуба пацова са експериментално изазваним ДМ-ом, у условима интоксикације оловом.

#### **IV 4. Научни и прагматични допринос дисертације**

Студије новије савремене литературе указују да зуби пружају корисну и дугорочну евиденцију о утицају олова на човјека и да је излагање олову повезано са утицајем на опште здравље, укључујући анемију, хипертензију, патологију кости и зуба подразумјевајући и каријес тврдих зубних ткива зако да спроведено истраживање има значајан *научни* допринос. Такође се интензиван метаболизам пулпе, доказано успорава у неким метаболичким оболењима као што је дијабетес, поготово у условима интоксикације оловом.

Резултати ове студије дају *прагматичан* допринос за унапређење протокола директног и индиректног прекривања пулпе зуба код пацијената са поремећајем метаболизма пулпе.

Уколико се зна да број оболјелих од дијабетеса у свијету има сталну тенденцију раста ( данас постоји скоро 250 милиона људи са дијабетесом у свијету и сматра се да ће за 20 година овај број порasti на 380 милиона) и да је број људи изложених тровањем оловом у порасту (бензинске пумпе, штампарије), јасно је зашто је кандидат као циљну групу одабрао баш ову приоритетну скupину пацијената. Важно је истаћи и да је циљна група корисника добијених резултата немјерљива. Очекивани резултати се могу уградити у протоколе лијечења зуба у домовима

здравља, поликлиникама као и у протоколе у високошколским установама које у оквиру наставе примају пациенте и пружају стоматолошке услуге. Анализа концентрације олова у тврдим зубним ткивима се може користити и у форензичке сврхе те резултати студије могу бити примјенљиви и у тој области, те дати свој прагматични допринос.

## V МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

### V 1.Материјал и критеријуми

За узорак су одабрани пацови Wistar соја, због велике сличности у физиологији пулпе зуба пацова са физиологијом пулпе хуманих зуба. Експеримент је обухватао 42 лабораторијска пацова Wistar соја односно 682 зуба. Студија је спроведена у виваријуму Природно-математичког факултета у Бањалуци (одобрено од стране Етичког комитета Завода за стоматологију). Животиње су биле старе два мјесеца а тјелесна тежина им је износила од 150-200 г. Пацови су држани у групним плексиглас кавезима, на 12 часовном режиму свјетлости (07.00-19.00) при температури ваздуха 22°Ц ( $\pm 2$ ) и влажност 60%  $\pm 10\%$ , где су имали слободан приступ храни и води током трајања експеримента. Почетком експеримента индивидуе су одвојене у одговарајуће тестне и контролне групе. Омогућен им је период адаптације у трајању од 15 дана, након чега је започет третман.

### V 2. Кратак увид у метод истраживања

Експерименталне животиње су извагане и забиљежена је њихова тјелесна тежина. Свакој животињи је одређен ниво шећера у крви прије почетка експеримента. Гликемија је мјерена апаратом за мјерење гликемије из крви репне вене. Раствор Аллохана-а је добијен растварањем 100mg праха у 10 ml физиолошког раствора и потом апликован интраперитонеално у дози 100 mg на килограм тјелесне тежине пацова. Протокол је понављан све док измјерена вриједност гликемије није прешла 200mg/dcl (животиња у хипергликемији). Аллохан дјелује на циљне ћелије (β ћелије панкреаса) токсично и уништава их. Међутим, ова оштећења панкреаса, код пацова, су реверзибилна због изузетне регенеративне способности ћелија панкреаса па је неопходна контрола вриједности глукозе у крви пацова. Постигнута хипергликемија је контролисана редовним мјерењем. За хистолошку анализу, попречни пресјеци молара добијени у нивоу зубне пулпе су сакупљани на одговарајућа предметена стакалца и сушени на 60°C. У процесору за аутоматско бојење (Leica ST4040) ткивни пресјеци су депарафинисани, рехидрирани и испирани у дестилованој води. Након тога су обојени стандардном методом хематоксилин - еосин (ХЕ). Дефинитивни препарати су анализирани свјетлосним микроскопом.

*Промјена у односу на план истраживања који је представљен у пријави ове докторске дисертације се односила на повећање узорка пацова који су добијали олово у периоду од 30 дана, и код којих није био индукован дијабетес. Сви испитивани параметри пружају довољно елемената који чине ово истраживање квалитетним.*

*Статистичка обрада података* је била адекватна. Од података прикупљених клиничким и лабораторијским истраживањем формирана је датотека у Microsoft Excel из кога је експортована у статистички програмски пакет IBM SPSS20 уз помоћ којег су подаци анализирани.

Од дескриптивних статистичких метода коришћени су: фреквенција, проценат, аритметичка средина, стандардна девијација, медијана, минимум и максимум. Од аналитичких статистичких метода коришћени су Hi-квадрат тест, Man Witney тест и Spearmanova корелација ранга. Резултати су приказани табеларно и графички.

## VI РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

### VI 1. Резултати истраживања

Добијени резултати ове докторске дисертације приказани су на 21 страници, а анализирани су кроз дискусију на 16 страница. У првој фази истраживања извршена је анализа хистолошких препарата пулпе зуба пацова. На хистолошком приказу пресјека пулпе здравог зуба пацова уочава се трабекуларна грађа дентина са палисадно постављеним одонтобластима дуж унутрашње ивице пулпног ткива, који чине синцитијални слој ћелија. Ћелијска структура у комори пулпе је потопљена у ћелијски матрикс. Здрав зуб представља позитивну контролу у свакој експерименталној групи. Резултати имунохистохемијске анализе су показали да је висока фокална позитивност фибронектина код пацова који су добијали олово у води током 14 дана уочена у 48% случајева, слаба или умјерена фокална и висока дифузна позитивност бу по 24% док је одсуство бојења регистровано у 4% случајева. У групи пацова који су добијали олово у води током 14 дана висока фокална позитивност тенасцина-ц је уочена у 72,0% случајева, слаба или умјерена фокална у 8% и висока дифузна позитивност у 12%, док је одсуство бојења регистровано у 8% случајева. У групи пацова који су добијали олово у води током 30 дана висока фокална позитивност је уочена у 45.5% случајева, слаба или умјерена фокална у 36.4% и висока дифузна позитивност у 33.3% ,док је одсуство бојења није регистровано ни у једном случају. У групи пацова који су добијали олово у води током 14 дана висока фокална позитивност ТГФβ-1 је уочена у 20,0% случајева, слаба или умјерена фокална у 24,0 % и висока дифузна позитивност у 36,0 % , док је одсуство бојења регистровано у 20,0 % случајева Присуство морфолошких промјена било је најчешће у групи пацова која је пила олово у води за пиће 14 дана . У групи пацова које су пиле олово у води за пиће 30 дана присуство морфолошких промјена нађено је у 6 животиња. Ни код једног пацова из контролне групе није забиљежено присуство морфолошких промјена. Такође, резултати ове дисертације су показали разлику у појави пулпитиса, гингвитиса и хиперплазије гингиве код пацова који су добијали олово 14 и 30 дана. У другој фази истраживања рађена је СЕМ ЕДС анализа у три слоја зуба: у глеђи, у глеђно-дентинској граници, у дентину и у пулпи. Овом анализом одређивани су масени удјели елемената у дијеловима зуба, те је утврђено да унос олова утиче на масени удјио поједињих елемената.

### VI 2. Критичност и коректност тумачења резултата

Резултати истраживања су приказани на прегледан начин. Они су јасно и објективно тумачени, а кандидаткиња је показала објективан и критички став у процјени ових резултата, посебно у дијелу који се односи на компарацију са резултатима сличних истраживања. Дискусија резултата показује да је кандидат способан да прикупи, обради, презентује резултате на врло прегледан начин, као и да на јасан и

свеобухватан начин разматра приказане резултате и упореди их с литературним подацима.

### **VI 3. Теоријски и практични допринос дисертације и нови истраживачки задаци**

*Основни теоријски допринос дисертације је слеђећи:*

Уколико се зна да број оболелих од дијабетеса у свијету има сталну тенденцију раста (данас постоји скоро 250 милиона људи са дијабетесом у свијету и сматра се да ће за 20 година овај број порасти на 380 милиона) и да је број људи изложених тровањем оловом у порасту (бензинске пумпе, штампарије), јасно је зашто је кандидат као циљну групу одабрао баш ову приоритетну скупину пацијената. Важно је истаћи и да је циљна група корисника добијених резултата немјерљива. Очекивани резултати се могу уградити у протоколе лијечења зуба у домовима здравља, поликлиникама као и у протоколе у високошколским установама које у оквиру наставе примају пациенте и пружају стоматолошке услуге.

*Основни практични допринос дисертације је слеђећи:* Очекује се да ће резултати ове студије бити употребљиви за унапређење протокола директног и индиректног прекривања пулпе зуба код пацијената са поремећајем метаболизма пулпе. Анализа концентрације олова у тврдим зубним ткивима се може користити и у форензичке сврхе те резултати студије могу бити примјенљиви и у тој области.

*Основни правци даљих истраживања:*

Резултати ове дисертације, дају одговоре на постављени проблем истраживања, али и указују на наредне правце истраживања у смислу одређивања прецизног и оптималног протокола за одређивање олова у зубима.

Даља истраживања могу испитивати утицај олова на настанак промјена на глеђи, раст и развој зуба, настанак зубног каријеса, промјена на меким ткивима усне дупље.

## VII ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

Докторска дисертација мр сц. Ирене Кузмановић Радман под називом „Утицај олова на дистрибуцију медијатора одонтогенезе у дијабетесом измеђеној пулти зуба пацова“ израђена је у складу са образложењем које је кандидат приложио приликом пријаве теме.

Докторска дисертација урађена је према правилима и принципима научно-истраживачког рада и резултат је оригиналног научног рада кандидата. Резултати добијени имунохистохемијском анализом и скенирајућом електронском микроскопијом, јасно су указали да олово има велики утицај на промјене на тврдим зубним ткивима као и на медијаторе одонтогенезе пулпе. Кандидаткиња је на основу резултата понудила начин превазилажења проблема и поставила оквир за даља истраживања. Поред тога кандидаткиња је прецизно и логички анализирала предложену тему истраживања и довела податке у везу са постављеном хипотезом. Такође, кандидаткиња је тему ове дисертације, кроз јасно и концизно писање учинила интересантном и корисном и за истраживаче и за практичаре. Дисертација представља оригинални допринос стоматолошкој науци, јер проширује постојећа знања о дејству појединачних поступака за уклањање адхезива на површину глеђи зуба.

Чланови Комисије, на основу укупне оцјене докторске дисертације једногласно дају позитивну оцјену о завршеној докторској дисертацији под називом: „Утицај олова на дистрибуцију медијатора одонтогенезе у дијабетесом измеђеној пулти зуба пацова“ мр сц. Ирене Кузмановић Радман и предлажу члановима Наставно-научног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци и Сенату Универзитета у Бањој Луци да прихвате овај Изјештај и омогуће кандидату да своју докторску дисертацију јавно брани.

## ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Датум: 21.3.2017. године



1.   
Доц. др Александра Ђери, предсједник
2.   
Проф. др Славољуб Живковић, ментор и члан
3.   
Проф. др Радослав Гајанин, члан
4.   
Доц. др Наташа Кнежевић, члан
5.   
Доц. др Сања Гњато, члан

**Izjava 1**

**IZJAVA O AUTORSTVU**

**Izjavljujem  
da je doktorska disertacija**

Naslov rada: Uticaj olova na distribuciju medijatora odontogeneze u dijabetesom izmjenjenoj  
pulpi zuba

Naslov rada na engleskom jeziku: The impact of lead on the distribution of mediators of  
odontogenesis in the teeth pulp amended by diabetes

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da doktorska disertacija, u cjelini ili u dijelovima, nije bila predložena za dobijanje bilo  
koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Banjoj Luci, 5.5.2017.

Potpis doktoranta

Trena Kuzmanovic Radman

## Izjava 2

### **Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom**

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom  
Uticaj olova na distribuciju medijatora odontogeneze u dijabetesom izmjenjenoj pulpi zuba  
koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

Doktorsku disertaciju sa svim prilozima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo

#### **2. Autorstvo – nekomercijalno**

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima.

U Banjoj Luci, 5.5.2017.

Potpis doktoranta  
*Trema Kuzmanović Radonjić*

**Izjava 3**

**Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije**

Ime i prezime autora

Irena Kuzmanović Radman

Naslov rada

Uticaj olova na distribuciju medijatora odontogeneze u dijabetesom  
izmjenjenoj pulpi zuba

Mentor

Prof. dr Slavoljub Živković

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predao/la za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci, 5.5.2017.

Potpis doktoranta

Irena Kuzmanović Radman

