

Univerzitet u Beogradu  
Stomatološki fakultet

Marko Z. Magić

Uticaj različitih modifikacija površine titana  
fizičkim i hemijskim metodama na njegovu  
citokompatibilnost i imunomodulacijska  
svojstva

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

Belgrade University  
School of Dental Medicine

Marko Z. Magić

Influence of different physical and chemical  
modifications of titanium surface on its  
citocompatibility and immunomodulatory  
properties

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

**Mentor:**

**Prof. dr Snježana Čolić**

Redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

Klinika za oralnu hirurgiju

**Komentor:**

**Prof. dr Dejan Marković**

Redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

Klinika za dečju i preventivnu stomatologiju

**Članovi komisije:**

**Prof. dr Aleksa Marković**

Redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

Klinika za oralnu hirurgiju

**Akademik Miodrag Čolić**

Profesor emeritus

Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane u Beogradu

**Dr Božana Čolović**

Naučni saradnik

Institut za nuklearne nauke Vinča

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

## **Uticaj različitih modifikacija površine titana fizičkim i hemijskim metodama na njegovu citokompatibilnost i imunomodulacijska svojstva**

### **SAŽETAK**

*Uvod:* Titan i njegove legure se upotrebljavaju kao materijali za dentalne implantate zbog pokazane biokompatibilnosti titana i dobrih fizičkih i mehaničkih svojstva. Korozivna svojstva titana i njegovih legura u kiselim i baznim rastvorima, i u biološkim fluidima nisu zadovoljavajuća što je moguće prevazići modifikacijom njihove površine. Biofunktionalnost modifikovanih površina titana zavisi od tehnika kojima se sprovode modifikacije. Postoje brojne metode modifikacije površine titana, kao hemijske metode koje zajedno sa naknadnim termičkim tretmanom obezbeđuju formiranje titan-oksidnog sloja ili fizičke metode nanošenja prevlaka hidroksiapatita (HAP). Dentalni implantati mogu dovesti do povećane produkcije citokina i hemokina sa proinflamacijskim delovanjem.

*Cilj istraživanja:* Ispitivanje efekta modifikacije površine titanove legure (Ti6Al4V) hemijskom obradom i naknadnim termalnim tretmanom, i nanošenjem prevlake hidroksiapatita, na biokompatibilnost merenu pomoću određivanja citotoksičnosti *in vitro*, kao i na imunomodulacijsko delovanje titana *in vitro*.

*Materijal i metode:* Citotoksičnost je ispitivana *in vitro*, primenom testova direktnog kontakta uzoraka titanovih legura sa L929 ćelijama ili indirektno, ispitivanjem metaboličke aktivnosti L929 ćelija u prisustvu različitih razblaženja kondicioniranog medijuma (KM). Korišćena je ćelijska linija mišijih fibroblasta (L929). Metabolička aktivnost je merena MTT testom, ćelijska proliferacija je merena testom ugradnje  $^3\text{H}^+$ -timidina, dok je produkcija slobodnih radikala kiseonika (ROS) određivana protočnom citofluorimetrijom nakon obeležavanja sa dihloro-dihidro-fluorescin diacetatom (DCFH-DA). Nekroza i apoptoza su merene bojenjem ćelija sa propidijum jodidom, merenjem produkcije laktatdehidrogenaze (LDH), kao i analizom ekspresije gena za mišje kaspaze 3, 8 i 9 metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (Real-Time PCR). Ćelijski rast i morfološka analiza L929 ćelija je procenjivana fazno kontrastno svetlosnom mikroskopijom, dok je vijabilnost određivana pomoću tripan plavog. Imunomodulacijski efekat modifikovanih površina titana

je ispitivan na modelu fitohemaglutininom (PHA) aktiviranih humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMNC), Produkcija pro-inflamacijskih (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ), anti-inflamacijskih (IL-10) i citokina Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4, IL-5) i Th17 (IL-17) profila je određivana u supernatantima kultura PHA-stimuliranih PBMNC nakon kultivacije u prisustvu kondicioniranog medijuma testiranih uzoraka, primenom protočne citofluorimetrije ili primenom komercijalnih ELISA testova.

*Rezultati:* Rezultati merenja citotoksičnosti modifikovanih površina titanovih legura su pokazali da se nemodifikovana legura (Ti), legura modifikovana hemijskim tretmanom (Ti-Ca) i legura na koju je jednostrano naneta prevlaka HAP-a (Ti-HAP) mogu okarakterisati kao ne-citotoksične. Legura na koju je dvostrano naneta prevlaka HAP-a (Ti-HAP2) je klasifikovana u kategoriju blago-umereno citotoksične. Pokazano je da kondicioniranje u medijumu u trajanju od 24 sata značajno smanjuje citotoksični efekat jednostrano ili dvostrano HAP-modifikovanih legura dovodeći ih na prihvatljiv nivo. Kultivacija L929 ćelija sa Ti, Ti-Ca i Ti-HAP je dovela do aktivacije gena za sve tri ispitivane kaspaze. Transkripcija gena za kaspazu 8 je statistički značajno viša nakon izlaganja Ti-HAP-u. Pokazano je statistički značajno inhibitorno delovanje kondicioniranog uzorka Ti-HAP-KM na proliferaciju PBMNC u poređenju sa kontrolama i kondicioniranim Ti-Ca-KM. Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM statistički značajno inhibiraju produkciju IL-1 $\beta$ . Kondicionirani medijum nemodifikovane legure (Ti-KM) indukuje statistički značajno višu produkciju TNF- $\alpha$  u odnosu na kontrolni KM, Ti-HAP-KM i Ti-Ca-KM. Trodnevno kondicionirani uzorci Ti-KM, Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM statistički značajno inhibiraju produkciju IL-10. Ti-KM deluje stimulatorno na produkciju IL-2.

*Zaključak:* Modifikovane legure Ti-Ca i Ti-HAP se mogu okarakterisati kao ne-citotoksične. Citotoksičnost Ti-HAP2 legure se može znatno smanjiti do necitotoksičnog nivoa prethodnim kondicioniranjem u medijumu za kultivaciju ćelija ili drugim vodenim rastvorima. Rezultati *in vitro* ispitivanja na PHA-stimuliranim PBMNC svrstavaju ovako pripremljene legure u kategoriju materijala koje bi trebalo dodatno istražiti u *in vivo* modelima. Inhibicija produkcije IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  pod uticajem Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM dobijena u ovom istraživanju, može ukazivati na veću stopu preživljavanja ovako modifikovanih površina implantata *in vivo*.

**Ključne reči:** citotoksičnost, imunomodulacija, legure titana, hidroksiapatit, površina implantata, citokini, kaspaze

**Naučna oblast:** Medicinske nauke – Stomatologija

**Uža naučna oblast:** Kliničke i bazične stomatološke nauke

**UDK broj:** 669.295:616.314-089.843(043.3)

# **Influence of different physical and chemical modifications of titanium surface on its biocompatibility and immunomodulatory properties**

## **ABSTRACT**

*Introduction:* Titanium and its alloys are being used as dental implant materials due to its biocompatibility and solid physical and mechanical properties. Corrosion properties of titanium and its alloys in acid and alkaline solutions and biological fluids are not satisfying and can be surpassed by modifying its surface area. Biofunctionality of the modified surface depends on the techniques being used. There are many methods to modify titanium surface such as chemical methods that, together with subsequent thermal treatment, provide the formation of a titanium oxide layer, or physical methods, such as deposition of a hydroxyapatite coatings (HAP). Dental implants can increase production of cytokines and chemokines with proinflammatory properties.

*Aim:* Investigation of the effect of the titanium alloy (Ti6Al4V) surface modification by chemical treatment and subsequent thermal treatment, and deposition of a hydroxyapatite coating, on biocompatibility, assessed by cytotoxicity evaluation *in vitro*, and on the immunomodulatory action of titanium *in vitro*.

*Material and methods:* Cytotoxicity was determined by using *in vitro* test of direct contact of titanium alloy samples with L929 cells or indirectly, by determining metabolic activity of L929 cells in the presence of different solutions of conditioned medium (KM). Mouse fibroblast (L929) cell line was used. Metabolic activity was determined with MTT test, cell proliferation was measured with  $^3\text{[H}^+]$ -thymidine test, while reactive oxygen species (ROS) production was determined by flow cytometry after labeling with dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA). Necrosis and apoptosis were measured with propidium iodide (PI) cell staining, measuring lactate dehydrogenase (LDH) production, and by analyzing gene expression of mice caspases 3, 8 and 9 with Real Time PCR method. Cell growth and morphological analysis of L929 cells were determined with phase contrast light microscopy, while viability was determined with Trypan Blue. Immunomodulating effect of the modified titanium surfaces was measured on phytohemagglutinin (PHA) model of

peripheral blood mononuclear cells (PBMNC). Production of the proinflammatory (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ), anti-inflammatory (IL-10) and cytokines of Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4, IL-5) and Th17 (IL-17) profiles was determined in supernatants from PHA stimulated PBMNCs after being cultivated in the presence of conditioned medium of tested samples, using FlowCytomix or commercial ELISA tests.

*Results:* Results obtained by measuring cytotoxicity of modified titanium alloy surface areas showed that unmodified alloy (Ti), alloy modified by chemical treatment (Ti-Ca), and the alloy coated on one side with HAP (Ti-HAP) can be characterized as non-cytotoxic. Alloy coated on two sides with HAP (Ti-HAP2) was classified as mildly toxic. It was showed that conditioning in the medium for 24 hours significantly reduced cytotoxic level of one or two sided HAP-modified alloy. Cultivating L929 cells with Ti, Ti-Ca and Ti-HAP produced gene activation for all three tested caspases. Gene transcription for caspase 8 was statistically significantly higher after being exposed to Ti-HAP. Statistically significant inhibitory effect of conditioned Ti-HAP-KM on PBMNC proliferation in comparison to control group and conditioned Ti-Ca-KM sample was showed. Ti-Ca-KM and Ti-HAP-KM demonstrated statistically significant inhibitory effect on IL-1 $\beta$  production. Conditioned unmodified alloy (Ti-KM) showed statistically significant higher production of TNF- $\alpha$  in comparison to control KM, Ti-HAP-KM and Ti-Ca-KM. Three-day conditioned samples Ti-KM, Ti-Ca-KM and Ti-HAP-KM demonstrated statistically significant inhibition of IL-10 production. Ti-KM had stimulatory effect on IL-2 production.

*Conclusion:* Modified alloys Ti-Ca and Ti-HAP alloys can be characterized as non-cytotoxic. Cytotoxicity of Ti-HAP2 alloy can be significantly reduced to non-cytotoxic level by conditioning in cell cultivating media or other water solution. Results of *in vitro* experiments using PHA stimulated PBMNC categorized these alloys as materials that should be additionally examined in *in vivo* models. Inhibition of production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  by Ti-Ca-KM and Ti-HAP-KM samples obtained in this study can indicate higher survival rate of these modified surfaces *in vivo*.



**Keywords:** citotoxicity, immunomodulation, titanium alloys, hydroxyapatite, implant surface, cytokines, caspases

**Scientific field:** Medical Sciences – Dentistry

**Specific scientific field:** Clinical and Basic Dental Sciences

**UDC:** 669.295:616.314-089.843(043.3)

*Duboku zahvalnost na podršci i ukazanom poverenju, dugujem mojoj mentorki, profesorki Snježani Čolić, koja me je uvela u svet oralne hirurgije i naučno istraživačkog rada. Naučila me je da jedino stalnom potragom za novim naučnim saznanjima mogu unaprediti svoj klinički rad.*

*Zahvaljujem se mom komentoru, profesoru Dejanu Markoviću, koji je otvorio vrata potpuno novog poglavlja u mojoj karijeri, istraživanju stomatoloških materijala.*

*Saradnicima sa Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ dugujem veliku zahvalnost. Naučnom savetniku dr Vukomanu Jokanoviću, hvala na sveobuhvatnoj pomoći u otkrivanju biomaterijala, kao i velikom stprljenju, bezrezervnoj podršci i aktivnom učešću u mom naučnom radu. Naučnom saradniku dr Božani Čolović hvala na korisnim sugestijama koje mi je davala pri pisanju ove doktorske disertacije.*

*Veliko hvala profesoru Saši Vasilijiću na nesebičnoj pomoći u izvođenju ovog istraživanja i mentorstvu u laboratorijskom radu.*

*Profesorki Dragani Vučević ću uvek biti zahvalan na stručnoj pomoći i korisnim savetima vezanim za izradu ove disertacije.*

*Hvala profesorki Gordani Šupić na pomoći i odličnoj saradnji u oblasti genetike.*

*Posebnu zahvalnost na ogromnoj podršci i pomoći dugujem akademiku Miodragu Čoliću, koji me je svojim savetima usmeravao ka cilju i pomogao da prevaziđem mnoge poteškoće sa kojima sam se susretao u toku izrade doktorske disertacije.*

*Kolektivu Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske Akademije hvala na pruženoj pomoći i kolegijalnosti.*

*Profesoru Zoranu Laziću, koji od početka budno prati moje stručno sazrevanje, zahvalan sam na tome što je bio velika inspiracija i verovao u mene.*

*Hvala mojim roditeljima, Mirjani i Zvonku, bez njihove podrške tokom mog školovanja, nikada ne bih uspeo da stignem do ovde.*

*Supruzi Ani, veliko hvala na razumevanju, brizi i strpljenju tokom svih ovih godina. Njena ljubav mi je uvek davala snagu da idem dalje.*

*Marko Magić*

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Biokompatibilnost.....	1
1.1.1. Kaspaze.....	3
1.2. Oseointegracija.....	6
1.3. Titan u oralnoj implantologiji.....	11
1.4. Obrada površine implantata.....	14
1.5. Imunomodulacijski efekti biomaterijala.....	20
<b>2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>24</b>
2.1. Radna hipoteza .....	24
2.2. Ciljevi istraživanja.....	24
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>25</b>
3.1. Ispitivani uzorci.....	25
3.1.1. Modifikacija površine Ti legure alkalnim nagrivanjem, jonskom izmenom i dodatnim termičkim tretmanom uvazdušnoj atmosferi.....	26
3.1.2. Modifikacija površine titana nanošenjem hidroksiapatitnog sloja.....	26
3.1.3. Fizičko-hemijska karakterizacija modifikovanih Ti legura korišćenih u istraživanju.....	27
3.1.4. Priprema kondicioniranog medijuma.....	28
3.1.5. Kondicioniranje ispitivanih legura.....	29
3.2. Ispitivanje citotoksičnosti .....	29
3.2.1. Priprema uzoraka Ti legure za <i>in vitro</i> ispitivanja.....	29
3.2.2. Priprema L929 ćelija.....	30
3.2.3. Ispitivanje morfologije L929 ćelija u kulturi.....	30
3.2.4. Ispitivanje vijabilnosti L929 ćelija u kulturi.....	31
3.2.5. Merenje metaboličke aktivnosti L929 ćelija.....	31

3.2.6. Merenje proliferacije L929 ćelija.....	32
3.2.7. Merenje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta.....	32
3.2.8. Određivanje apoptoze i nekroze protočnom citofluorimetrijom.....	33
3.2.9. Određivanje apoptoze morfološkom analizom.....	33
3.2.10. Merenje produkcije laktat dehidrogenaze.....	33
3.2.11. Merenje apoptoze preko aktivacije gena za kaspaze.....	34
3.2.11.1. Izolacija RNK.....	34
3.2.11.2. Reverzna transkripcija.....	35
3.2.11.3. Kvantifikacija Real-Time PCR metodom pomoću <i>SYBR Green</i> boje.....	35
3.3. Ispitivanje imunomodulacijskog efekta.....	38
3.3.1. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi.....	39
3.3.2. Merenje proliferacije PBMNC.....	39
3.3.3. Merenje produkcije citokina.....	40
3.4. Statistička analiza.....	40
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>41</b>
4.1. Fizičko-hemijska karakterizacija modifikovanih Ti legura.....	42
4.2. Ispitivanje citokompatibilnosti Ti legura – direktan efekat.....	44
4.2.1. Efekat Ti legura na metaboličku aktivnost L929 ćelija.....	44
4.2.2. Efekat Ti legura na proliferaciju L929 ćelija.....	45
4.2.3. Efekat Ti legura na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta L929 ćelija.....	46
4.2.4. Efekat Ti legura na nekrozu L929 ćelija.....	48
4.2.5. Efekat Ti legura na apoptozu preko aktivacije gena za kaspaze.....	50
4.3. Ispitivanje citokompatibilnosti Ti legure na koju je obostrano naneta prevlaka HAP-a – direktan i indirektan efekat.....	54
4.3.1. Efekat Ti-HAP2 na metaboličku aktivnost L929 ćelija.....	54
4.3.2. Efekat kondicionirane legure Ti-HAP2 na nekrozu i apoptozu L929 ćelija.....	57

4.3.3. Efekat kondicionirane legure Ti-HAP2 na metaboličku aktivnost L929 ćelija.....	61
4.3.4. Uloga jona Ca <sup>2+</sup> u citotoksičnom delovanju HAP-modifikovanih Ti legura.....	66
4.4. Ispitivanje citokompatibilnosti Ti legura – indirektan efekat.....	67
4.4.1. Efekat KM Ti legura na metaboličku aktivnost stimulisanih humanih PBMNC.....	68
4.4.2. Efekat KM Ti legura na proliferativnu aktivnost stimulisanih humanih PBMNC.....	69
4.4.3. Efekat KM Ti legura na nekrozu i apoptozu stimulisanih humanih PBMNC.....	71
4.5. Ispitivanje imunomodulacijskih svojstava Ti legura.....	73
4.5.1. Efekat KM Ti legura na produkciju citokina od strane Stimulisanih PBMNC.....	73
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>85</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>102</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>104</b>

## 1. UVOD

Oralna implantologija je najmlađa grana stomatologije koja je jedinstvena po tome što se u njoj prepliću znanja i veštine iz više različitih oblasti stomatologije, kao što su: oralna hirurgija, parodontologija, stomatološka protetika, radiologija, ali i nauka o biomaterijalima.

Većina implantoloških pacijenata u kliničkoj stomatološkoj praksi je u starosnoj dobi od 50 do 60 godina, a očekuje se da će u narednim godinama upotreba titanovih dentalnih implanata biti u velikom porastu. Mnogi od ovih pacijenata imaju sistemske bolesti u čijoj osnovi su često i poremećaji imunskog sistema. Klinička upotrebljivost i uspešnost implantata zavise upravo od ravnoteže između implantata kao stranog tela i imunskog sistema organizma domaćina. Drugim rečima, nije važno razmatrati samo kako da se poboljša funkcija implantata kao mehaničkog sredstva već i kako da se utiče na njegov sistemski efekat. Modifikacije površine implantata mogu da utiču na njegovu biokompatibilnost i reakcije imunskog sistema domaćina. Zbog toga je u cilju indukovanja željenog biološkog odgovora implantata *in vivo* važno identifikovati postupak modifikacije površine implantata od titana koji će ispoljiti bolji efekat najpre u *in vitro* ispitivanjima citotoksičnosti i imunomodulacije a kasnije i u kliničkoj praksi.

### 1.1. Biokompatibilnost

Biokompatibilnost materijala za implantaciju predstavlja prvi neophodni preduslov za uspešnu proceduru postavljanja stranog materijala u živi sistem [1]. Biokompatibilnost materijala koji se koriste u stomatologiji može se definisati kao njihova sposobnost da nakon aplikacije obavljaju svoju funkciju u organizmu, ne izazivajući neželjeni odgovor tkiva domaćina. Biokompatibilnost, samim tim, podrazumeva udruženu interakciju tkiva

domaćina i primenjenog materijala pri čemu reakcija tkiva domaćina ostaje u granicama tolerancije. Interakcije ćelija i tkiva sa biomaterijalima su uslov njegove funkcije i opstanka u organizmu [2].

Veličina, oblik, fizičke i hemijske karakteristike biomaterijala mogu biti odgovorne za varijacije u intenzitetu i trajanju inflamatornih i reparativnih procesa na mestu ugradnje implantata. Karakteristike površine implantata utiču i na homeostazu tkiva oko implantata, i imaju ključnu ulogu u oseointegraciji [3].

Odgovor domaćina prema implantatu može limitirati performanse materijala, i često rezultovati inflamacijom, fibroznom inkapsulacijom implantata i lošom integracijom sa okolnim tkivima. Slaba prihvaćenost i loš učinak ranijih biomaterijala su ukazali na to da je njihova interakcija sa tkivima domaćina kompleksan problem koji zahteva razvoj prefinjenijih proizvoda. To je dovelo do zaključka da inertnost (ne izazivanje odgovora primaoca) nije garant biokompatibilnosti. Upravo 1986. godine na Konsenzus Konferenciji Evropskog Društva za Biomaterijale (ESB) date su široko prihvaćene definicije biomaterijala i biokompatibilnosti, koje su uzele u obzir interakcije između implantiranog materijala i bioloških sistema. Prema ovim definicijama, biomaterijal je „nevijabilni materijal korišćen u medicinskom sredstvu namenjen za interakciju sa biološkim sistemima“, dok je biokompatibilnost definisana kao „sposobnost materijala da obavi ulogu za koju je namenjen uz odgovor domaćina koji je odgovarajući u specifičnoj situaciji“. Tada su po prvi put naučnici, koji se bave razvojem materijala, i kliničari, koji ih upotrebljavaju, napravili dogovor oko toga šta materijal namjenjen za implantaciju treba da pruži [4,5]. Iz prethodne definicije biokompatibilnosti se nameće potreba da se naglasi specifična aplikacija materijala, kada se govori o njegovoj biokompatibilnosti. Biokompatibilnost predstavlja kompleksnu karakteristiku čitavog sistema materijal – biološki sistem domaćina, a ne samog materijala [6].

Sa razvojem nauke i tehnologije postavljaju se sve viši standardi koje svako medicinsko sredstvo mora da ispuni pre kliničke upotrebe. Novo medicinsko sredstvo mora



da prođe sve strožije testove biokompatibilnosti, u skladu sa standardima Internacionalne Organizacije za Standardizaciju (ISO) [7]. U ove testove, između ostalih, spadaju: test citotoksičnosti, senzibilizacija, intradermalna iritacija, akutna sistemska toksičnost. Među testovima biokompatibilnosti, citotoksičnost se ističe kao važan indikator za dalju evaluaciju materijala zbog svoje jednostavnosti, brzine sprovođenja i visoke senzitivnosti. Testom citotoksičnosti, koji predstavlja jedan od najvažnijih metoda za biološku evaluaciju materijala, ispituju se reakcije kulture ćelija na testirani materijal *in vitro* i posmatraju se ćelijski rast, deoba, kao i morfološki efekti materijala na kulturu ćelija [8].

Sa aspekta biokompatibilnosti materijala koji se upotrebljavaju u oralnoj implantologiji, faktori na koje može da se utiče su karakteristike same površine implantata, odnosno mikrodizajn implantata. Polazeći od navedenih saznanja, jasno je zašto je jedan od ključnih ciljeva u izradi modernih biomaterijala „konstruisanje“ površine materijala koja će ograničiti interakciju sa imunskim ćelijama i na taj način, u kontekstu imunomodulatornog delovanja, smanjiti inflamaciju i imunski odgovor.

Idealni materijal za implantat bi trebalo da ima hemijski dinamičnu površinu, koja izaziva histološku reakciju sličnu onoj koja se dešava u odsustvu implantata. U širem smislu, biokompatibilnost predstavlja sposobnost materijala da bezbedno međusobno interaguje sa domaćinom nakon aplikacije. Biomaterijali treba da imaju optimalan kvalitet u pogledu mehaničkih svojstava, fizičko-hemijske stabilnosti, odsustva toksičnosti i imunogenosti, i ni pod kojim uslovima ne bi smeli da remete normalan tok zarastanja tkiva. U užem smislu, biokompatibilnost je “eksploatacija“ proteina i ćelija domaćina od strane materijala, u cilju dobijanja maksimalnog specifičnog tkivnog odgovora [9].

### **1.1.1. Kaspaze**

Intracelularni mehanizmi koji su odgovorni za apoptozu (programirana ćelijska smrt) su slični u svim ćelijama humanog i animalnog porekla. Ti mehanizmi uključuju familiju

proteaza sa citozinom na aktivnom mestu i asparaginskom kiselinom kao ciljem. Iz tog razloga ovi enzimi su nazvani kaspaze (*caspase*, *c* za cistein i *asp* za asparaginsku kiselinu; *C asp ase* – *Cytosolic Aspartate Specific Protease*). Kaspaze se u ćelijma sintetišu u neaktivnom obliku, kao inaktivni prekursori ili *prokaspaze*. Prokaspaze se aktiviraju proteolitičkim isecanjem. Isecanje prokaspaza je katalizovano drugim, već aktivnim kaspazama, i dešava se na jednom od dva mesta sa asparaginskom kiselinom. Prokaspaza se deli na veliku i malu subjedinicu koje formiraju heterodimer, i dva takva heterodimera se spajaju i grade aktivni tetramer. Kada je jedanput aktivirana, kaspaza iseca i aktivira druge prokaspaze i na taj način amplifikuje proteolitičku kaskadu.

Prva kaspaza koje je identifikovana kod čoveka nazvana je interleukin-1 konvertujući enzim (*ICE*, *interleukin-1-converting enzyme*) i više je uključena u inflamatorni odgovor nego u procese ćelijske smrti. *ICE* iseca proinflamatorni citokin IL-1 (interleukin-1) iz većeg prekursora i na taj način se uključuje u inflamatorni odgovor. Tek kasnije, identifikovan je funkcionalni i strukturni analog *ICE* kod *C. Elegans* pružajući po prvi put dokaze da su proteoliza i kaspaze uključeni u procese apoptoze. Sada je potpuno jasno da je većina kaspaza uglavnom uključena u proces apoptoze, da je taj proces delimično reverzibilan za razliku od ranijeg uverenja da je taj proces ireverzibilan.

Kaspaze koje učestvuju u apoptozi tako da započinju proteolitičku kaskadu nazivaju se inicijatorne kaspaze. Nakon što su aktivirane inicijatorne kaspaze, aktiviraju nizvodni put u kome su aktivne efektorske (egzekutorske) kaspaze koje dalje osim proteolize drugih efektorskih prokaspaza, započinju proteolizu specifičnih target proteina, kao što su nuklearni lamin, polimeraza poli-ADP-riboza (PARP), histoni, Rb protein, proteini inhibitori endonukleaza, proteini koji učestvuju u međućelijskim vezama, proteini citoskeleta (aktinski filamenti, dezminski filamenti, fodrin) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Podela humanih kaspaza prema osnovnim funkcijama

HUMANE KASPAZE	
○ Kaspaze uključene u INFLAMACIJU	<b>KASPAZA 1</b> ( <i>ICE- interleukin-1<math>\beta</math> konvertujući enzim</i> ) <b>KASPAZE 4 i 5</b>
○ INICIJATORNE kaspaze	<b>KASPAZE 2, 8, 9 i 10</b> Blisko povezane sa pro-apoptotskim signalima, učestvuju u međusobnoj aktivaciji
○ EFEKTORSKE (egzekutorske) kaspaze	<b>KASPAZE 3, 6 i 7</b> Razlažu citoskeletne i jedarne proteine, indukuju apoptozu

Poslednjih godina sve je veći broj podataka u literaturi koji ukazuju na mnogo svestraniju ulogu kaspaza u različitim ćelijskim procesima u odnosu na ranija uverenja i znanja. U nekim slučajevima, kaspaze mogu simultano da imaju apoptotsku i mitogenu ulogu, tako da dok promovišu apoptozu jednih ćelija mogu da indukuju proliferaciju susednih ćelija. Ovaj mehanizam je dragocen za kompenzaciju izgubljenih ćelija [10]. U drugim situacijama, ćelija može da toleriše određeni nivo aktivacije kaspaza bez da ugrozi svoju vijabilnost. U ovom slučaju, ista ćelija u koja je aktivirala ovaj letalni enzim može dobiti signal da se deli [11].

Prema poslednjim saznanjima, ne-apoptoske funkcije kaspaza su značajne za proliferaciju ćelija, razvoj i regeneraciju tkiva (srce, jetra). Interesantni su nalazi da kaspaze egzekutori imaju presudnu ulogu tokom razvoja kostiju [12]. Miura i saradnici su pokazali da miševi sa deficitarnom kaspazom 3 imaju značajne defekte skeleta zbog smanjene proliferacije i osteogene diferencijacije stromalnih ćelija kostne srži [13]. Slična funkcija je opisana i za kaspazu 7 [12].

Sa razvojem molekularne biologije došlo se do novih metoda za analizu biokompatibilnosti koje su evaluaciju citotoksičnosti ili apoptoze biomaterijala sa ćelijskog nivoa spustile na molekularni nivo. Najčešće se koriste metode RT-PCR i Real-Time PCR uz pomoć kojih je moguće pratiti promene u ekspresiji gena čiji su produkti uključeni u procese apoptoze [14]. U svom radu [15], Jia i saradnici su ispitivali uticaj pet različitih dentalnih legura na ekspresiju gena za mišje kaspaze 3, 8 i 9 u L929 ćelijama nakon 48-satne kultivacije sa medijumom u kome su bile ispitivane legure (indirektni metod). Ekspresiju gena su merili RT-PCR-om i pokazali su da je ekspresija gena osetljiviji pokazatelj uticaja legura na ćeliju od MTT testa. U ovoj disertaciji meren je efekat ispitivanih legura na ekspresiju gena za mišje kaspaze 3, 8 i 9 u L929 ćelijama nakon 24-satne kultivacije ćelija u direktnom kontaktu sa legurama.

## **1.2. Oseointegracija**

Oseointegracija implantata predstavlja funkcionalnu vezu koja nastaje između kosti i površine opterećenog implantata. Danas se oseointegracija posmatra u svetlu reakcije organizma na strano telo (biomaterijal), i predstavlja složen proces zarastanja nakon ugradnje implantata u koji su uključene brojne ćelije i medijatori zapaljenske i imunske reakcije. Krajnji cilj ovog procesa je integrisanje stranog materijala u organizam [16].

Još 1952. godine Per Ingvar Branemark je započeo svoja istraživanja o interakciji titanovih implantata i kosti, da bi 1968. godine uveo pojam oseointegracije. Definisao je oseointegraciju kao direktnu strukturalnu i funkcionalnu vezu između žive kosti i površine implantata [17]. Šreder i saradnici su 1976. godine dali svoju definiciju oseointegracije kao intimnog kontakta kosti i implantata, nazivajući je i funkcionalnom ankilozom [18]. Američka Akademija za Oralnu Implantologiju (AAID) je dala svoju definiciju, prema kojoj

je oseointegracija kontakt normalne i remodelovane kosti sa površinom implantata bez interponiranja ne-koštanog i vezivnog tkiva [19].

Definisanje pojma oseointegracije je uvelo revoluciju u nadoknadi zuba koji nedostaju i dala podstrek novom naučnom i kliničkom polju, oralnoj implantologiji. Usled povećane potrebe za boljim razumevanjem procesa koji su u osnovi novog modaliteta lečenja, stomatološka stručna i naučna javnost je usmerila istraživanja u pravcu biologije koštanog tkiva i njegove interakcije sa različitim materijalima. Tako je nauka o biomaterijalima zauzela izuzetno važno mesto u oralnoj implantologiji [20].

Ugradnja implantata počinje preparacijom ležišta za implantat što dovodi do prekida krvnih sudova, uništavanja koštanog tkiva i sledstvenog oivičavanja nastalog defekta nekrotičnom zonom. Dva moguća scenarija prate ugradnju implantata. Prvi je razvoj reakcije na strano telo koju karakteriše hronični inflamatorni odgovor kada dolazi do oivičavanja implantata slojem kosti koji se postepeno kondenzuje. Sa druge strane, iz razloga koji nisu još uvek potpuno razjašnjeni, odgovor na strano telo rezultuje inkapsulacijom implantata u meko tkivo što dovodi do primarnog kliničkog neuspeha. Navedeni događaji mogu poći jednim od dva puta: ekvilibrijum stranog tela sa umerenom hroničnom inflamacijom koji zovemo oseointegracija (Slika 1) ili ranim disbalansom gde koštana resorpcija dominira nad koštanom formacijom. Jačinu hroničnog inflamatornog odgovora pri ugradnji dentalnog implantata određuju hemijske karakteristike površine materijala, njegovo fizičko stanje i elektrohemijski potencijal [21].



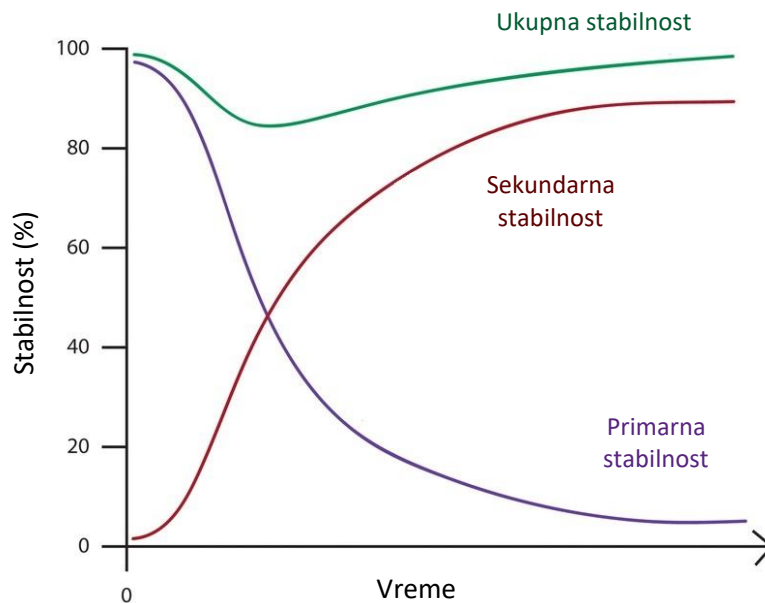
**Slika 1.** Oseointegriran dentalni implantat. Preuzeto iz [21].

Faktori koji utiču na oseointegraciju dentalnih implantata su: biokompatibilnost materijala, dizajn implantata, površina implantata, stanje ležišta za implantat (u pogledu zdravlja, morfologije i kvaliteta kosti), hirurška tehnika, neometana faza zarastanja kao i dizajn protetske nadoknade i dugoročno pravilno opterećenje [1].

Oseointegracija je dinamični proces u toku kojeg primarna stabilnost implantata biva zamenjena sekundarnom stabilnošću. Primarna stabilnost predstavlja mehaničku fiksaciju implantata, i priroda ove veze nije biološka već mehanička. Određuje je makro dizajn implantata u odnosu na preparaciju koštanog ležišta za implantat, vertikalna pozicija implantata u odnosu na koštani greben, morfologija površine implantata i njena hrapavost, kao i kvalitet koštanog tkiva [22]. Pod makro dizajnom implantata podrazumevaju se: oblik tela, dijametar, dužina, hod i oblik navoja. Na slici 2 mogu se videti dentalni implantati različitog makro dizajna. Uspostavljanje sekundarne stabilnosti počinje sa prvom apozicijom novostvorenog koštanog tkiva na površinu implantata, i priroda ove veze je biološka. Dinamika apozicije koštanog tkiva na implantat je određena karakteristikama same površine implantata – mikro dizajna implantata. Primarna stabilnost implantata (mehanička) opada tokom vremena, dok sekundarna (biološka) raste (Slika 3). Zbir primarne i sekundarne stabilnosti čini ukupnu stabilnost implantata. Brz proces oseointegracije može redukovati dužinu faze u kojoj dolazi do pada stabilnosti implantata, kada primarna pada, a sekundarna još uvek nije dostigla svoj maksimum, i omogućiti brže opterećenje implantata i rehabilitaciju pacijenta [23].



**Slika 2.** Dentalni implantati različitog makro dizajna



**Slika 3.** Prelazak iz primarne u sekundarnu stabilnost

Svi materijali koji dolaze u kontakt sa živim tkivima će biti prepoznati kao strano telo i aktivirati odgovor imunskog sistema. U specifičnom slučaju dentalnih implantata nekoliko događaja prati hiruršku intervenciju ugradnje implantata. Iako je imunski odgovor važan u upravljanju inflamatornim procesima nakon ugradnje implantata, traumatska priroda same procedure istovremeno dovodi do procesa zarastanja oštećenih tkiva. Ovi procesi, kombinovani sa individualnim, genetski određenim karakteristikama pacijenta, rezultuju kliničkim ishodom koji može da bude uspešna oseintegracija materijala. Dobro razumevanje i poznavanje bioloških mehanizama, u kojima dolazi do kontakta živih tkiva sa biomaterijalima u imunološki aktivnom okruženju, omogućava nam da razvijemo nove strategije modulacije inflamatornog odgovora sa krajnjim ciljem povećanja kliničkog uspeha i smanjenja procenta komplikacija u implantologiji [16].

U stomatologiji prevlađuje stav da su titanovi dentalni implantati inertni. Pojam inertno se odnosi na materijal koji nema, ili ima minimalnu, mogućnost izazivanja reakcije. Polazeći sa ovog stanovišta, titanovi dentalni implantati bi se, nakon ugradnje u živo tkivo,

ponašali kao inertni i integrisali bi se kroz jednoličan proces zarastanja rane. Međutim, sa pozicije ćelija imunskog sistema ovo je malo verovatno, jer sve što je strano organizmu imunski sistem momentalno prepoznaje i može pokrenuti kaskadu reakcija u toku reparacije tkiva. Ako su dentalni implantati od titana hemijski i biološki inertni onda je oseointegracija proces koji je predstavlja običan fenomen zarastanja rane. Ako, sa druge strane, bilo koji materijal koji prodire kroz tkiva aktivira imunski sistem, u kojem god obimu, onda oseointegracija takođe mora da se posmatra kao imunomoduliran zapaljenski proces, gde je lokalni imunski odgovor manje ili više izražen, značajno utičući na čitav proces zarastanja [16].

Inertnost nije sinonim za biokompatibilnost, što je i potvrđeno na Konzensus Konferenciji Evropske Asocijacije za Biomaterijale 1986. godine [4]. Za razliku od titanovih dentalnih implantata, u razvoju materijala koji se koriste kao koštani zamenici paradigma se menja od inertnosti ka imunomodulaciji [24]. Albrekston i saradnici su uveli koncept ekvilibrijuma stranog tela primenjenog na oseointegraciju dentalnih implantata od titana [21]. Inflamatorni i imunski procesi koji regulišu reakciju na strano telo su prisutni sve vreme in vivo trajanja implantiranog materijala. Bolje razumevanje ovih procesa moglo bi dovesti do razvoja medicinskog sredstva koje ima potencijal da vodi odgovor tkiva ka povoljnijem ishodu čineći kliničke procedure predvidljivijim i uspešnijim u dugom vremenskom periodu [16]. U polju dentalne implantologije ovakva procedura bi se odnosila na modifikaciju mikrodizajna implantata (površine implantata).

Dentalni implantati koji su opterećeni protetskom nadoknadom su retko u potpunosti prekriveni mineralizovanom kosti, već se na kontaktu implantata i kosti mogu primetiti makrofagi i džinovske ćelije oko stranog tela. Ove ćelije, kao i osteociti, su pod konstantnim uticajem faktora rasta, biosintetski su aktivne, a mogu biti aktivirane i pod uticajem različitih lokalnih i sistemskih faktora. Nameće se zaključak da je oseointegracija pre dinamični fenomen nego statični događaj [16], u kojem imunski sistem sve vreme ima značajnu ulogu.



Oseointegracija se u eksperimentalnim uslovima definiše kao blizak kontakt između kosti i implantiranog materijala u histološkim presecima. U kliničkom smislu oseointegracija se definiše kao stabilnost i ankiroza implantata u kosti. Hirurška trauma koja nastaje ugradnjom implantata uzrokuje oksidativni stres, koji rezultuje hiperprodukcijom slobodnih radikala i oksigenisanih derivata na površini titana, koji dovode do zadebljanja površnog sloja titan dioksida ( $\text{TiO}_2$ ). Joni kalcijuma i fosfora iz koštanog matriksa bivaju inkorporisani u porozni sloj  $\text{TiO}_2$  čineći odnos implantata i kosti vrlo dinamičnim [25]. Ovaj fenomen nastavlja da se dešava tokom čitavog života implantata. Kontaminacija ili destrukcija oksidnog sloja može dovesti do patološkog gubitka oseointegracije, nazvanog peri-implantitis [9].

### **1.3. Titan u oralnoj implantologiji**

U poslednjih pedeset godina primena titana i njegovih legura u stomatologiji i medicini postaje sve učestalija. Pored razvoja novih materijala, titan danas predstavlja materijal izbora u oralnoj implantologiji i ortopediji, gde vrlo često dolazi u direktni kontakt sa koštanim tkivom i tkivnim ćelijama. Titan i njegove legure su izrazito reaktivni, pa izloženi tečnom medijumu ili vazduhu brzo razvijaju sloj titan-oksida ( $\text{TiO}_2$ ). Ovaj sloj oksida formira vezu na mestu dodira između biološkog medijuma i metalne strukture, određujući biološki odgovor na metal [26]. Godine 1954. u SAD je otkrivena legura  $\text{Ti6Al4V}$  koja zahvaljujući optimalnim svojstvima, prvenstveno dobrim mehaničkim svojstvima, i danas predstavlja standardno terapijsko sredstvo kako u ortopediji, tako i u stomatologiji. Titan je rendgenski transparentan, što je izuzetno bitno kod postavljanja ovog materijala u koštano tkivo jer omogućava jednostavnu kontrolu pozicije.

Tačka topljenja titana je izuzetno visoka, i iznosi čak  $1670^\circ\text{C}$ . Zavisno od temperature menja se i struktura titana. Na niskim temperaturama, struktura je gusto složena

heksagonalna, i naziva se faza  $\alpha$ . Na višim temperaturama titan menja svoju rešetku u prostorno centriranu kubnu strukturu, poznatu kao  $\beta$  faza, koja ostaje stabilna sve do temperature topljenja. Alotropna transformacija čistog titana iz  $\alpha$  u  $\beta$  fazu se dešava na temperaturi od 882°C. Na osnovu ovih različitih faza izvršena je i podela titana na  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\alpha+\beta$  tip [27]. Na temperaturu transformacije utiče čistoća metala, odnosno prisustvo intersticijskih i supstitucijskih elemenata. Čvrstoća titana se može povećati dodavanjem legirajućih elemenata, a zavisno od toga da li povećavaju ili smanjuju temperaturu transformacije legirajući elementi se klasifikuju na one koji stabilizuju  $\alpha$  fazu, i one koji stabilizuju  $\beta$  fazu. U  $\alpha$  stabilizatore spadaju: aluminijum, galijum i bor kao supstitucijski i kiseonik, azot i ugljenik kao intersticijski elementi. Aluminijum je jedini metal koji povišava temperaturu prelaska  $\alpha$  u  $\beta$ , i on povećava modul elastičnosti, čvrstoću ali i vatrootpornost. Elementi koji stabilizuju  $\beta$  fazu su vanadijum, niobijum, molibden, hrom, kobalt, gvožđe, silicijum, nikel i bakar. Oni snižavaju temperaturu transformacije  $\beta$  u  $\alpha$ . Plastična deformacija lakše nastaje u prostorno centriranoj kubnoj strukturi nego u heksagonalnoj, tako da je duktilnost  $\beta$  faze bolja u odnosu na  $\alpha$  [26]. Većina biomedicinskih legura pripada grupi  $\alpha+\beta$ . Upravo ove legure su najčešće korišćene u ortopediji i oralnoj implantologiji. Ti6Al4V legura koja je najpoznatija u medicinskoj primeni, i na kojoj je vršeno ovo istraživanje, spada u grupu  $\alpha+\beta$  legura. Stabilnom je čini zagrevanje tokom sinterovanja  $\alpha$  faze, koju stabilizuje Al, dok  $\beta$  faza koju stabilizuje V, leguru čini tvrdom i čvrstom [27].

Titan je prelazni metal koji pripada grupi IVB periodnog sistema elemenata i u poslednjem elektronskom sloju nema dovoljno elektrona za stabilnost zbog čega stvara čvrste rastvore sa većinom supstitucijskih elemenata. Čist titan je dostupan je u četiri stepena ili tipa (I – IV), zavisno od procenta kiseonika, azota, vodonika, gvožđa i ugljenika, sa čijim porastom se povećavaju zatezna čvrstoća i tvrdoća, dok se granica loma smanjuje. Titan petog stepena predstavlja leguru Ti6Al4V. Optimalna svojstva titana i njegovih legura postižu se toplotnom obradom, modifikacijom izgleda i sastava njegove površine mehaničkim, hemijskim i toplotno-hemijskim postupcima [26].

Implantati koji su danas u kliničkoj upotrebi su uglavnom izrađeni od titana koji je većinski zastupljen, ili od cirkona koji je zastupljen u mnogo manjem obimu. Obično se upotrebljava titan četvrtog i petog stepena zbog svojih odličnih hemijskih i mehaničkih osobina. Titan četvrtog stepena se naziva komercijalno čist titan, i ima manje od 1% nečistoća. Titan petog stepena (Ti6Al4V) je legura titana koja uključuje 6% aluminijuma i 4% vanadijuma [25]. Legure titana kao Ti6Al4V i titan cirkon (TiZr) poseduju bolje mehaničke karakteristike od komercijalno čistog titana ili cirkona [22].

Titan pokazuje izuzetno visoku stabilnost *in vitro*, ali akumulacija jona titana u tkivima neposredno uz sam implantat, kao i osetljivost na titan iz pejsmejкера ukazuju na oslobađanje jona titana i koroziju *in vivo*. Alergijske reakcije na titan kao materijal za izradu dentalnih implanata su dokazane ali izuzetno retke [28]. Otporan je na hloride, azotnu kiselinu, kao i na većinu organskih kiselina pri sobnoj temperaturi. Zagrevanjem se otapa u razređenoj hlorovodoničnoj, sumpornoj i azotnoj kiselini, dok ga fluorovodonična kiselina nagriza. Upravo ove kiseline se i koriste u svrhu modifikacije površine titana za izradu dentalnih implantata. U dodiru sa vazduhom, vodom i tkivnim tečnostima titan spontano oblikuje zaštitni površinski sloj debljine 15 do 50  $\mu\text{m}$  koji se sastoji od nekoliko oksida, od kojih je najstabilniji  $\text{TiO}_2$ , koji pokazuje specifičnu kristalnu arhitekturu.  $\text{TiO}_2$  se može naći u amorfnoj fazi ili u tri glavna kristalna stanja (anatase, rutil, brukit), u veoma različitim odnosima. Rutil forma je najčešća i najstabilnija, ali obrada površine značajno utiče na kristalnu kompoziciju i strukturu površine (13). Ovaj oksidni sloj osigurava korozionu stabilnost titanu. Usled dužeg stajanja nakon implantacije ovaj sloj može dostići debljinu od 200 do 300  $\mu\text{m}$ . Upravo debljina oksidnog sloja a ne sastav implantata štiti ćelije okolnog tkiva od toksičnih komponenata i diktira odgovor ćelije [29]. Korozijska postojanost legura je manja od korozijske otpornosti titana, ali legure imaju bolja mehanička svojstva.

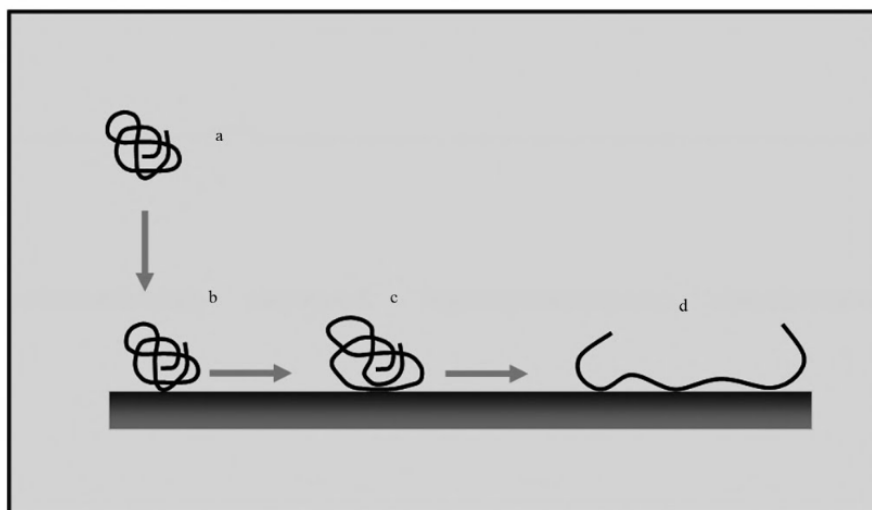
Jedan od osnovnih razloga odlične biokompatibilnosti titana predstavlja njegova sposobnost oksidacije. Titan oksid može da umiri agense koji deluju destruktivno na tkivo domaćina odmah nakon hirurške traume koja prati ugradnju implantata. Prirodni oksidoredukcioni potencijal titana je ubedljivo najniži od svih legura korišćenih u stomatologiji, ali

postavljen u organizam, u kontaktu sa bazama, kiselinama, enzimima i bakterijama, postaje legura koja najteže korodira [9].

#### 1.4. Obrada površine implantata

Upotreba titana i njegovih legura kao materijala za dentalne implantate je opšte prihvaćena već dugi niz godina, s obzirom na pokazanu biokompatibilnost titana, kao i dobra fizička i mehanička svojstva koje poseduje [30]. Međutim, koroziona svojstva titana u kiselim i baznim rastvorima, ali i u biološkim fluidima nisu zadovoljavajuća. Titan i njegove legure pokazuju nisku otpornost na habanje *in vivo*, što direktno utiče na njegovu primenu u stomatologiji [31]. Ove nedostatke je moguće prevazići modifikacijom površine titana. Modifikacija površine dentalnog implantata se sprovodi da bi se poboljšala biokompatibilnost, povećala površina za povezivanje implantata i kosti, poboljšao stepen oseintegracije implantata i smanjili negativni efekti implantata na okolno tkivo. U idealnom slučaju, modifikacija površine titana treba da poboljša kliničke performanse implantata – da podstakne oseintegraciju i ubrza fazu zarastanja nakon ugradnje implantata.

Površina biomaterijala u kontaktu sa krvlju i pljuvačkom ne može da izbegne interakciju sa proteinima i drugim molekulima koji se nalaze u telesnim tečnostima. To za posledicu ima brzo prekrivanje površine implantata biofilmom, koji maskira površinu materijala i diktira odgovor domaćina. Odgovor domaćina na ugrađeni implantat je neizbežan zbog trenutnog taloženja proteina na površinu materijala. U kontaktu sa površinom materijala proteini menjaju svoju konformaciju i pretvaraju se u organizmu strane molekule, antigene, koji izazivaju reakciju na strano telo (Slika 4). Jasno je da kao rezultat ovih procesa nijedan biomaterijal ne može da se smatra u potpunosti inertnim. Naučna javnost poslednje dve decenije teži razvoju i sintezi nove generacije biomaterijala, koji su sposobni da kontrolišu procese apsorpcije proteina kao i tkivnu regeneraciju oko implantata. [4]



**Slika 4.** Denaturacija proteina nakon apsorpcije na površinu materijala. a) protein prilazi površini materijala; b) protein apsorbovan na površinu materijala; c) promena konformacije proteina usled interakcije sa površinom materijala; d) protein dobija konformaciju antigena  
Preuzeto iz [4].

Biofunktionalnost modifikovanih površina titana zavisi od tehnika kojima se sprovode modifikacije kao i faktora koji utiču na oseointegraciju – hrapavosti površine, debljine modifikovanog sloja i nanotopografije modifikovane površine [32]. U ove svrhe se danas koriste mnoge metode među kojima i nanošenje prevlaka na površinu titana, ili metode kojima se hemijskom obradom površine titana modifikuje oksidni sloj.

Legure titana se ne smatraju bioaktivnim i zahtevaju dodatnu površinsku obradu koja povećava biofunktionalnost. Površina titana koja dolazi u dodir sa biološkim tkivima odgovorna je za biološku reakciju, a svojom topografijom utiče na mehaničku stabilnost međuspoja implantat-kost [26]. Pretvaranje glatke u hrapavu površinu se može izvesti različitim tehnikama. Neke od njih dodaju materijal na glavni deo implantata, tako da dobijamo površinu sa ispupčenjima koja ima konveksni profil. Suprotno od njih su tehnike gde se površina erodira, čestice se odvajaju od površine, stvarajući pore ili jamice na površini. Ovako obrađena površina ima konkavni profil [33]. Modifikovane porozne površine implantata omogućavaju uspešno urastanje koštanog tkiva.

U aditivne postupke spadaju: plazmiranje (titanom ili hidroksiapatitom), anodna oksidacija, taloženje hidroksiapatita elektroforezom i elektrohemijsko katodno taloženje hidroksiapatita. Najčešći postupci erodiranja površine su: peskiranje, nagrizanje i lasersko erodiranje [26].

Na osnovu hrapavosti, površine implantata se mogu podeliti na glatke, minimalno hrapave, umereno hrapave i hrapave (Tabela 2) [34]. Umereno hrapave površine se odlikuju najvišim stepenom kontakta između implantata i kosti i upravo su one najzastupljenije u savremenoj implantologiji [35].

**Tabela 2.** Podela površina dentalnih implanata na osnovu hrapavosti

Površina	$S_a$ – prosečna devijacija u visini hrapave površine u tri dimenzije	Klinička upotreba
<b>Glatka</b>	$< 0.5 \mu\text{m}$	Protetske komponente
<b>Minimalno hrapava</b>	$0.5 - 1.0 \mu\text{m}$	Polirani implantati
<b>Umereno hrapava</b>	$\geq 2.0 \mu\text{m}$	Većina današnjih implantata
<b>Hrapava</b>	$\geq 2.0 \mu\text{m}$	Titan plazma sprej površina Hidroksiapatitom obloženi implantati

Veliki naponi se ulažu u poboljšanje kontakta između implantata i kosti, sa ciljem da se ubrza koštano zarastanje i poboljša depozicija kosti na implantat. U ovu svrhu se obično upotrebljava jedan od dva najzastupljenija pristupa. Prvi pristup podrazumeva poboljšanje kontakta hemijskim metodama, inkorporacijom neorganskih faza, kao što je kalcijum fosfat, u sloj  $\text{TiO}_2$ , ili preko ovog sloja. Ova neorganska hemijska modifikacija

može da stimuliše koštanu regeneraciju, kao i da poveća biohemijsko povezivanje između proteina koštanog matriksa i površine materijala. Biohemijska modifikacija površine je varijanta prvog pristupa i odnosi se na inkorporaciju organskih molekula kao što su proteini, enzimi ili peptidi, sa ciljem da izazovu specifičan ćelijski i tkivni odgovor. Drugi pristup se odnosi na poboljšanje kontakta fizičkim metodama, izmenama arhitekture površinske topografije. Razlog za ovaj pristup je taj što hrapava površina ima veću površinu za vezivanje nego glatka, i zbog toga podstiče vezivanje kosti i pojačava biomehaničko spajanje kosti i implantata, do određenog stepena hrapavosti. Na nanometarskom nivou hrapavost povećava površinsku energiju, i poboljšava adsorpciju proteina, migraciju i proliferaciju koštanih ćelija, kao i oseointegraciju [25].

Problem se javlja i u definisanju toga na koju debljinu perifernog dela implantata se odnosi termin površina. U fizičkom smislu površina može biti definisana kao krajnji spoljašnji sloj, koji je debljine od svega nekoliko nanometara. Kod mnogih implantata debljina  $\text{TiO}_2$  sloja varira od 10 do 100 nm a može porasti i do mikrometra kod implantata modifikovanih anodizacijom. Biološki efekti hemijske strukture površine su povezani uglavnom sa arhitekturom sloja  $\text{TiO}_2$ . Kako je oseointegracija direkto povezana sa dinamičkim zadebljanjem sloja  $\text{TiO}_2$ , implantati sa debelim  $\text{TiO}_2$  slojem, kao što su anodizirani implantati, pokazuju snažan koštani odgovor u kom povećavaju precipitaciju koštanog mineralnog matriksa na površinu implantata. Međutim, i hemijske modifikacije takođe mogu da izazovu snažne koštane odgovore [25]. Cilj prevlačenja neorganskim elementima je da se stimuliše biohemijsko povezivanje koštanog matriksa i sloja  $\text{TiO}_2$  kroz precipitaciju koštanog minerala ili proteina na površinu ćelija.

Prve oseointegrisane površine su proizvedene industrijskom obradom bloka titana, što je dovodilo do stvaranja minimalno hrapave površine sa periodično preostalim mikropukotinama. Iako su se ovako dobijene površine pokazale uspešnim u kliničkoj praksi, razvijani su postupci za poboljšanje površinske mikrotopografije. Originalni *Brånemark* implantati su bili mašinski polirani sa površinom male hrapavosti (0.5 – 1.0  $\mu\text{m}$ ). Kasnije su eksperimentalne studije pokazale veći procenat kontakta između implantata i kosti kod

površina koje su dobijene plazmiranjem titanom. Sledeća generacija implantata je imala površinu koja je bila peskirana, sa ili bez nagrizanja kiselinom. Najveći procenat kontakta između implantata i kosti je primećen kod površina sa hidroksiapatitnom oblogom, kao i kod peskiranih i kiselinom nagriženih [22]. Anodna oksidacija je još jedna klinički široko zastupljena modifikacija površine titana, koju odlikuju: zadebljanje oksidnog sloja, porozna površina i visoki procenat kontakta između implantata i kosti.

Prevlačenje površine različitim vrstama keramike je još jedan od načina za obradu površine. Plazmiranje hidroksiapatitom u sloju debljine od 20 do 50  $\mu\text{m}$  se primenjuje na mikrohrpavu površinu i rezultuje izraženim osteokonduktivnim sposobnostima. Mehanička otpornost veze između prevlake i titana se smatra njihovom slabom tačkom, i u literaturi su zabeleženi neuspesi ovih implantata [36,37]. U cilju poboljšanja hidroksiapatitne prevlake razvijene su brojne tehnike za nanošenje tankog sloja ( $< 5 \mu\text{m}$ ), kao što su sol-gel depozicija, raspršivanje ili depozicija pomoću jonskih zraka. Razvijene su i alternative tankim prevlakama, kao što su inkorporacija nanopartikula kalcijum fosfata upotrebom izolovane kristalne depozicije na dvostruko kiselinom nagriženu površinu ili niska impregnacija kalcijum fosfata u oksidni sloj. Postupci pripreme površina su brojni, a parametri koji definišu svaki proces (temperatura, pritisak, vreme, vrsta i veličina čestica za peskiranje i koncentracija kiselina za nagrizanje) su podložni značajnim izmenama. To nas dovodi do zaključka da je broj različitih površina skoro neograničen, pa ih je teško svrstati po grupama [25].

Nanošenje hidroksiapatitnog sloja na površinu titana poboljšava bioaktivnost implantata i vezu između implantata i kosti, s obzirom na sličnost hidroksiapatita i biološkog apatita [38]. Hidroksiapatit takođe podstiče formiranje koštanog tkiva oko površine implantata, i značajno smanjuje habanje kosti u direktnom kontaktu sa implantatom [32]. Najčešći vid nanošenja hidroksiapatita na površinu titana je metodom raspršivanja plazme. Međutim, prevlaka nanosena ovom metodom pokazuje velike varijacije u jačini veze prevlaka – metal, nehomogenost u odnosu na debljinu i gustinu nanetog sloja, kao i promene u strukturi i hemijskim svojstvima tokom procesa oblaganja [39]. Tokom samog procesa



raspršivanja plazme može da dođe do promene u faznom sastavu hidroksiapatita iz kristalnog u amorfni oblik. Zbog toga, iako su hidroksiapatitne prevlake već dugo u upotrebi u stomatologiji, i dalje se ispituju načini nanošenja hidroksiapatita na titan u cilju postizanja zadovoljavajuće adhezije prevlake za metal, zadržavanja kristalne strukture i bioaktivnosti hidroksiapatita.

Modifikacija površine titana čiji su biološki efekti ispitivani u ovom radu je dobijena korišćenjem hemijskih metoda – nagrivanjem površine titana natrijum hidroksidom, jonskom izmenom natrijuma kalcijumom i termalnom obradom. Na ovaj način dobijaju se gradijentne oksidne površine, koje imaju različit udeo različitih oksidnih faza koje nastaju u tom procesu po različitim debljinama filma. Samim tim, materijal ima znatno bolju adhezivnost, nema ljuštenja zbog prevelikih promena napona po dubini prevlake, a i koroziono je postojan pri kontaktu sa telesnim fluidima. Pored toga, na njemu se lako nukleira biološki apatit, koji poseduje i veoma dobru nanotopologiju i visoku prijemčivost za ćelije koštanog tkiva [40].

Najvažnija prednost hidroksiapatitne prevlake koja je dobijena pomoću inovativne metode raspršivanja plazmom, je visok stepen adhezije hidroksiapatita za podlogu (jačina 60 MPa), što omogućava stabilnost dobijene prevlake [41]. Fazni sastav dobijene prevlake je takođe odgovarajući, jer su kao početni materijal služile granule hidroksiapatita koje zadržavaju svoju kristalnu strukturu. To je omogućeno time što se topljenje tokom raspršivanja plazme dešava samo na površini granula, tako da se samo njen deo transformiše u amorfnu fazu, što ograničava količinu stvorene amorfne faze, i omogućava prevazilaženje nedostataka vezanih za povećanu brzinu rastvaranja uslovljenu nastajanjem amorfne faze kod hidroksiapatitnih prevlaka dobijenih raspršivanjem plazme.

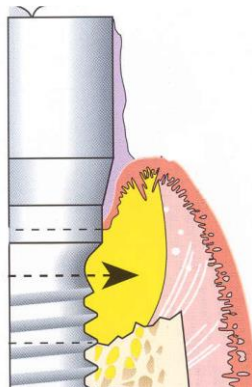
## 1.5. Imunomodulacijski efekti biomaterijala

Interakcije tkiva sa biomaterijalima mogu se podeliti na lokalne i sistemske interakcije, i pridružene komplikacije. Pri ugradnji biomaterijala, glavni problem i dalje ostaje reakcija imunskog sistema na prisustvo stranog tela u organizmu. Odgovor organizma na prisustvo biomaterijala, kao stranog tela, počinje neposredno nakon implantacije i progredira kroz stadijume zapaljenja i zarastanja rane. U ovom dinamičnom procesu učestvuju razni tipovi ćelija. Većina klinički primenljivih biomaterijala tipično izaziva reakciju na strano telo, specijalan vid nespecifičnog zapaljenja u kome glavnu ulogu imaju makrofagi. Aktivisani makrofagi u procesu interakcije sa biomaterijalom, luče citokine koji stimulišu zapaljenjsku reakciju. Treba naglasiti da zapaljenjska reakcija, na mestu ugrađenog implantata, kroz zamenu povređenog koštanog tkiva dovodi do sanacije kosti i vraćanja u fiziološko stanje. Međutim, inflamacijske ćelije, produkcijom citokina i enzima mogu prouzrokovati i štetne lokalne, pa čak i sistemske efekte. Štetni efekti se mogu manifestovati od akutnog bola, preko hronične inflamacije do odbacivanja implantata [42]. U pojedinim slučajevima slaba integracija implantata ili hronična inflamacija mogu prouzrokovati peri-implantitis, osteolizu, aseptični gubitak i gubitak funkcije implantata [43].

Dentalni implantati, iako često bivaju uvršteni u kategoriju inertnih materijala, mogu dovesti do povećane produkcije citokina i hemokina sa proinflamacijskim delovanjem, kao što su IL-1, IL-8 i TNF- $\alpha$ . Prekomerna aktivacija ćelija imunskog sistema, limfocita i antigen prezentujućih ćelija, zabeležena u nekim slučajevima ranog odbacivanja implantata, imala je za posledicu uništavanje peri-implantnih tkiva i stimulaciju osteolitičkih procesa [44].

S obzirom da je poznato da ugradnja implantata izaziva imunski odgovor domaćina koji je posredovan produkcijom različitih citokina, u zavisnosti od primenjenog implantata, cilj je da se dentalni implantat integriše uz minimalne neželjene efekte po okolno tkivo [45]. Nakon ugradnje implantata, dešava se čitav niz reakcija koje pokreću ćelije imunskog sistema nakon interakcije sa površinom implantata. Aktivacija imunskog sistema kontroliše početnu

reakciju na ugrađeni biomaterijal, ali i dugoročni ishod integracije implantata. Solubilni faktori, koje oslobađaju ćelije imunskog sistema u kontaktu sa površinom implantata – interleukini, utiču na mikrookolinu implantata dovodeći do lokalne kontrole imunskog odgovora. Neprekidna aktivacija imunskog sistema može dovesti do hronične inflamacije koja za posledicu može imati oštećenje zdravog tkiva koje okružuje implantat (Slika 5) [46].



**Slika 5.** Peri-implantitis. Destrukcija peri-implantnog mekog i koštanog tkiva

Prilikom ugradnje implantata, neutrofil, trombociti i monociti pristižu iz krvnih sudova na mesto oštećenja tkiva. Na mestu oštećenja ove ćelije proizvode različite faktore rasta, hemokine i citokine, koji podstiču priliv ćelija imunskog sistema na mesto oštećenja tkiva. Tokom adekvatnog odgovora pri zarastanju rane, indukuje se fagocitoza oštećenih ćelija i stimuliše se zarastanje. Makrofagi su odgovorni za inicijalni lokalni imunski odgovor, pojavu inflamacije i održavanje homeostaze. Prepoznata su dva fenotipa makrofaga: pro-inflamatorni M1 i anti-inflamatorni M2 fenotip koji doprinosi zarastanju rane. Pro-inflamatorni M1 fenotip se javlja kao posledica aktivacije makrofaga pomoću  $IFN\gamma$  i lipolisaharida S. M1 fenotip je odgovoran za brzu aktivaciju imunskog sistema u prisustvu patogena ili stranih tela, i karakteriše se visokom produkcijom  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  i  $TNF\alpha$  [47]. Aktivacija M2 fenotipa podstiče zarastanje rane i remodelovanje tkiva. M2 aktivacija je praćena produkcijom anti-inflamatornih citokina  $IL-10$ ,  $IL-4$ ,  $IL-13$  i  $TGF\beta$  [48]. Za adekvatno zarastanje oštećenog tkiva oko implantata i integraciju biomaterijala neophodna je ravnoteža između aktivacije M1 i M2 fenotipa, pri čemu sposobnost biomaterijala, posebno njegove površine, da kontroliše reakciju ćelija imunskog sistema utiče na početni

imunski odgovor na implantat, ali i na definitivnu integraciju implantata [45]. U toku normalnog procesa zarastanja rane uvek postoji inicijalna proinflamatorna faza koju odlikuje dominacija M1 makrofaga, za kojom sledi regenerativna faza, sa prevagom M2 makrofaga. Stoga je važno da biomaterijal ne izaziva zapaljenje i da se M1 fenotip makrofaga u fazi rezolucije zameni M2 fenotipom [22].

Citokini su proteini male molekulske mase, od 6-70 kDa, koji deluju kao posrednici između elemenata imunskog sistema i regulišu međucelijsku komunikaciju, kako u fiziološkim tako i u patološkim stanjima [49]. Ovi solubilni medijatori prenose brojne međucelijske signale koji su potrebni za integrisani odgovor ćelije na različite spoljašnje stimulse. Citokini svoje delovanje ostvaruju vezujući se za odgovarajuće receptore, pri čemu se ciljnoj ćeliji šalje signal koji dovodi do promene funkcije ili fenotipa date ćelije. Mogu ih sintetisati ćelije urođenog i adaptivnog imunskog sistema [50]. Citokine najčešće proizvode leukociti (makrofagi i T ćelije), a oni, sa druge strane, deluju i na aktivnost drugih leukocita, pa se nazivaju interleukinima.

Citokini se mogu svrstati u strukturno slične familije koje ispoljavaju različita biološka dejstva [51]:

- Citokini koji stimulišu nespecifični (urođeni) imunski odgovor. Sintetišu ih mononuklearne ćelije, makrofagi, dendritske ćelije i u manjoj meri i T limfociti. Ovde spadaju IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18.
- Citokini koji stimulišu specifični imunski odgovor. Proizvode ih dominantno T limfociti. Ovde spadaju IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, INF- $\gamma$  (interferon gama), TGF $\beta$  (transformišući faktor rasta beta), LT (limfotoksin).
- Citokini koji stimulišu hematopoezu. Proizvode ih stromalne ćelije kostne srži. Ovi citokini ispoljavaju stimulatorni efekat na rast i diferencijaciju nezrele leukocitarne loze.

Citokini mogu regulisati različite funkcije imunskog sistema. U odnosu na imunske reakcije, citokini regulišu tip, jačinu i trajanje imunske reakcije. Oni mogu biti i pozitivni i negativni regulatori imunskog odgovora. Dejstvo citokina mogu kontrolisati inhibitori koji menjaju biološku aktivnost citokina, kao i odgovor ciljnih ćelija na njihovo dejstvo.

Prema funkciji citokini se mogu podeliti na: pro-inflamacijske (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) i anti-inflamacijske (IL-10, TGF- $\beta$ ). Vrlo često se citokini dele i prema tipu efektorskih T limfocita koji ih proizvode na Th1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, IL-13), Th17 (IL-17) [52–54].

U prethodnoj deceniji, citokini su razmatrani i kao važan dodatak kliničkim parametrima u postavljanju dijagnoze peri-implantitisa. Takođe, oni mogu ukazati i na uspešnost izvedene implantološke intervencije. Imunski i skeletni sistem su usko povezani, deleći brojne citokine, receptore, signalne molekule i faktore transkripcije. Pored toga što dovodi do hronične inflamacije, imunski odgovor igra vitalnu ulogu u integraciji implantata i osteogenezi. Inflamatorni citokini IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-6 mogu da poboljšaju diferencijaciju osteoklasta i resorptivnu aktivnost, a inhibiraju osteoblastnu aktivnost i formiranje kosti. Anti inflamatorni citokini IL-4, IL-10 i IL-13 imaju suprotan efekat [24].

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Radna hipoteza

Legura titana čija je površina modifikovana hemijskom metodom (formiranjem oksidnog sloja) i fizičkom metodom (nanošenjem hidroksiapatitnog sloja raspršivanjem plazmom) ne ispoljava značajnu citotoksičnost. Legura čija je površina modifikovana navedenim metodama ima manji pro-inflamacijski, a snažniji imunoregulacijski efekat u odnosu na leguru čija površina nije modifikovana.

### 2.2. Ciljevi istraživanja

1. Ispitati i uporediti citotoksično delovanje legure titana čija je površina modifikovana hemijskom obradom i deponovanjem hidroksiapatitne prevlake plazma metodom, primenom *in vitro* testova direktnog kontakta na ćelijskoj liniji L929, određivanjem:
  - metaboličke aktivnosti-ćelija
  - proliferacije ćelija
  - produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) ćelija
  - nekroze i apoptoze ćelija
2. Ispitati i uporediti imunomodulacijsko delovanje legure titana čija je površina modifikovana hemijskom obradom i deponovanjem hidroksiapatitne prevlake plazma metodom, primenom *in vitro* modela fitohemaglutininom (PHA) stimulisanih humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) određivanjem:
  - proliferacije ćelija u kulturi
  - produkcije citokina (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) u kulturi

### 3. MATERIJAL I METODE

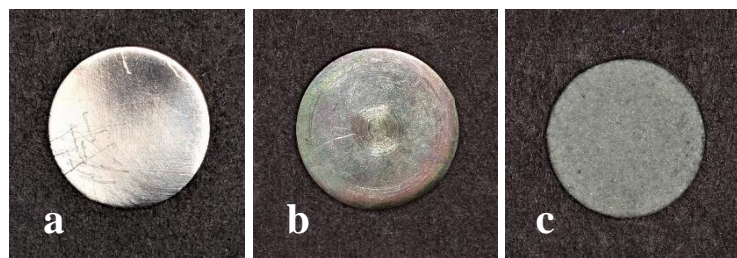
Za potrebe ovog istraživanja korišćeni su su uzorci titanove legure Ti6Al4V (u daljem tekstu: Ti legura) čija je površina modifikovana novim, originalnim metodama, pripremljeni u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“. Sva biološka ispitivanja urađena su na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske Akademije.

#### 3.1. Ispitivani uzorci

U radu su korišćeni sledeći uzorci legura titana:

1. Ti legura čija površina nije modifikovana (**Ti**)
2. Ti legura čija površina je modifikovana alkalnim nagrivanjem, jonskom izmenom i dodatnim termičkim tretmanom u vazdušnoj atmosferi (**Ti-Ca**)
3. Ti legura čija površina je modifikovana jednostranim (**Ti-HAP**) ili dvostranim (**Ti-HAP2**) nanošenjem hidroksiapatitnog (HAP) sloja inovativnom metodom raspršivanja plazme koja obezbeđuje visoku adheziju hidroksiapatita na površinu Ti legure

U eksperimentima u kojima je procenjivana citotoksičnost Ti legura, kao kontrolni uzorci koji su predstavljali negativnu kontrolu upotrebljeni su polistirenski diskovi dobijeni sečenjem polistirenske ploče za kulturu ćelija (Sarstedt, Nemačka). Kao kontrolni uzorci koji su predstavljali pozitivnu kontrolu korišćeni su diskovi od nikla. Kontrolni diskovi su bili istih dimenzija kao i diskovi ispitivanih Ti legura. Svi testirani diskovi su bili dijametra 10 mm i visine 2 mm (Slika 6).



**Slika 6.** Ispitivani uzorci: a) Ti; b) Ti-Ca; c) Ti-HAP

### **3.1.1. Modifikacija površine Ti legure alkalnim nagrizanjem, jonskom izmenom i dodatnim termičkim tretmanom u vazdušnoj atmosferi**

Šipke Ti legure (Bien-Air Medical Technologies, Švajcarska) su koristeći elektroeroziju isečene u diskove dijametra 10 mm i visine 2 mm. Diskovi su prvo polirani pomoću finog pudera  $\text{Al}_2\text{O}_3$  granulacije 5 – 0.05 mm [40], a zatim su potopljeni u 5 M NaOH vodeni rastvor u trajanju od 24 sata na  $60^\circ\text{C}$ , isprani destilovanom vodom nakon uklanjanja rastvora, i osušeni na temperaturi od  $40^\circ\text{C}$ . Nakon toga, uzorci su podvrgnuti jonskoj izmeni  $\text{Na}^+$  jona jonima  $\text{Ca}^{2+}$  potapanjem u vodeni rastvor 1 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  24 sata na  $60^\circ\text{C}$ , nakon čega su isprani destilovanom vodom i osušeni na sobnoj temperaturi. Uzorci legure su potom tretirani na  $700^\circ\text{C}$  u NiACr električnoj cevnoj peći, u periodu od 5 sati pri brzini zagrevanja od  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ , pod pritiskom kiseonika od 0.13 Pa. Posle zagrevanja, svi uzorci su ohlađeni do sobne temperature u peći.

### **3.1.2. Modifikacija površine Ti legure nanošenjem hidroksiapatitnog sloja**

Diskovi Ti legure tretirani sa NaOH i  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , na isti način kao što je opisano u prethodnom poglavlju, podvrgnuti su termalnom tretmanu na  $600^\circ\text{C}$  u periodu od 4 sata u električnoj peći, u vazdušnoj atmosferi, i ohlađeni do sobne temperature u peći [41].



Na ovako pripremljene uzorke nanošen je hidroksiapatit (HAP) metodom raspršivanja plazmom. HAP je nanošen jednostrano ili obostrano na Ti leguru. U procesu nanošenja HAP upotrebljena je inovativna plazma instalacija PJ-100 (Plasma Jet, Srbija) [55] koja se karakteriše mnogo većom brzinom plazme (1500-1800 m/s) u poređenju sa konvencionalnim plazma instalacijama, zahvaljujući većoj snazi plazme. Parametri korišćene instalacije bili su: snaga plazme 52.0 $\pm$  1.5 kW, voltaža 120 $\pm$  2V, struja 430 $\pm$  5A, protok argona 38.5 $\pm$  1.2 L/min, gasni nosač praha 8 L/min i brzina ispuštanja praha 2.0 $\pm$  0.1 g/s. Dijametar otvora anodne mlaznice je 8 mm a dužina plazma mlaznice između 60 i 70 mm. Proces nanošenja je bio kompjuterski kontrolisan što je omogućavalo mlaznici da se pomera izabranom brzinom i putanjom. Komercijalno dostupan prah HAP (Captal® 90, Plasma Biotall Limited, UK) sa prosečnom veličinom čestica od 90  $\mu$ m je korišćen za plazma depoziciju.

### **3.1.3. Fizičko-hemijska karakterizacija modifikovanih Ti legura korišćenih u istraživanju**

Analiza faza na površini modifikovanih uzoraka Ti legura je rađena pomoću difrakcije X-zraka (XRD) (Philips PW 1050 difraktometar za prah sa Ni filtriranim CuK $\alpha$  zračenjem), kao i pomoću infracrvene spektroskopije (Nicollet 380 FTIR, Thermo Electron Corporation). Strukturna topografija i morfologija modifikovane površine analizirana je pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) (Electron Microscope Quanta 200 3D) [41].

Kod legura modifikovanih nanošenjem HAP sloja određivana je brzina rastvaranja ovog sloja pomoću atomske apsorpcione spektroskopije (Perkin Elmer) merenjem koncentracije kalcijumovih jona koji se oslobađaju u TRIS-HCl puferu (pH 7.4) na 37°C za 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 i 120 sati. Brzina rastvaranja je određivana u dva nezavisna eksperimenta.

Jačina adhezije nanesenog HAP sloja merena je pomoću Instron 1185 mašine za mehaničko testiranje (brzina istežanja mašine je iznosila 2 mm/min). Pri tome je 5 uzoraka testirano koristeći *specijalni lepak (METCO EP-15)* polimerizovan 2 sata na 180°C.

#### **3.1.4. Priprema kondicioniranog medijuma**

Kondicionirani medijum (KM) je pripremljen inkubacijom testiranih uzoraka u kompletnom medijumu za kulture ćelija, RPMI 1640 medijum (Sigma, Minhen, Nemačka) sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (Sigma Minhen, Nemačka), 2mM L-glutamina (Sigma Minhen, Nemačka) i antibiotika (gentamicin - 10 µg/ml, penicilin - 100 IU, streptomycin - 100 µg/ml; Galenika, Beograd), u inkubatoru sa CO<sub>2</sub> na 37°C. Kompletan RPMI medijum bez testiranih uzoraka je predstavljao kontrolni KM.

Odnos površine testiranih uzoraka i volumena kompletnog medijuma je bio 1cm<sup>2</sup>/ml. Kondicioniranje je, u zavisnosti od eksperimenta, trajalo 24 sata, 3 dana ili 7 dana. Nakon inkubacije, KM su prikupljeni, centrifugirani na 3000 rpm/10min i čuvani na 4°C ili zamrznuti na -20°C do upotrebe u eksperimentima sa ćelijskim kulturama.

Kondicionirani medijum legura koje su prethodno kondicionirane (videti 3.1.5) je pripremljen 24-satnom inkubacijom kondicioniranih legura u kompletnom medijumu, u inkubatoru sa CO<sub>2</sub> na 37°C.

U pojedinim eksperimentima pripreman je KM praha HAP u koncentraciji za koju je procenjeno da se nalazi u dvostrano modifikovanim legurama (40 mg/ml). Ova količina HAP praha je kondicionirana u istoj zapremini RPMI kompletnog medijuma koja je korišćena za kondicioniranje Ti legura. Paralelno je na isti način pripreman i KM Ca(OH)<sub>2</sub> (Merck) koji je solubilniji od HAP. U ovim eksperimentima je korišćen blokator kalcijumovih kanala, nifelat, u koncentraciji 10 µg/ml.

### **3.1.5. Kondicioniranje ispitivanih legura**

U eksperimentima u kojima je ispitivano da li proces kondicioniranja utiče na citotoksičnost ispitivanih legura, uzorci legura i kontrolni uzorci su najpre kondicionirani tokom 24 sata u kompletnom medijumu za kulture ćelija, a nakon toga testirani u direktnom testu citotoksičnosti ili korišćeni za pripremu KM kondicioniranih legura.

## **3.2. Ispitivanje citotoksičnosti**

Citotoksičnost je ispitivana *in vitro*, primenom testova direktnog kontakta u skladu sa preporukama standarda ISO (ISO 10993-5) [7]. Za ispitivanje je korišćena ćelijska linija mišijih fibroblasta (L929). Ispitivana je citotoksičnost Ti legure čija je površina modifikovana na dva različita načina u odnosu na Ti leguru bez modifikacije (kontrola).

### **3.2.1. Priprema uzoraka Ti legure za *in vitro* ispitivanja**

U testovima direktnog kontakta korišćeni su prethodno opisani uzorci legure oblika diska, koji su pre dodavanja u ćelijske kulture bili sonifikovani u ultrazvučnom vodenom kupatilu u trajanju od 15 minuta, a potom sterilisani držanjem u 70% alkoholu u trajanju od 30 minuta. Posle sterilizacije uzorci su prebačeni u sterilne plastične petrijeve šolje u kojima su sušeni na ambijentalnoj temperaturi. Neposredno pre dodavanja u ćelijske kulture uzorci su ispirani u sterilnom RPMI medijumu.

### **3.2.2. Priprema L929 ćelija**

Pre ispitivanja citotoksičnosti, L929 ćelije su odmrznute i propagirane kroz najmanje tri pasaže. Propagiranje ćelija je izvedeno u flaskovima od 25 cm<sup>2</sup>, na 37°C u RPMI medijumu koji sadrži 10% fetalnog telećeg seruma, antibiotike (gentamicin - 10 µg/ml, penicilin - 100 IU, streptomycin - 100 µg/ml; Galenika, Srbija) i 2-merkaptoetanol (50 µM). Tripsinizacija ćelija je izvršena sa 0.25% rastvorom tripsina sa dodatkom 0.02% EDTA. Nakon svake tripsinizacije, procenjivala se vijabilnost ćelija brojanjem u 0.2% rastvoru Tripa-plavog. U eksperimentima za ispitivanje citotoksičnosti korišćene su ćelije čija je vijabilnost veća od 95%.

Za ispitivanje citotoksičnosti, L929 ćelije ( $3 \times 10^5$  / 2 ml) su bile zasejane u bazenima ploče sa 6 mesta (Sarstedt, Nemačka) i kultivisane 24 sata. Po dostizanju konfluentnosti od 60-80%, ćelije su kultivisane 24 sata sa testiranim uzorcima. Priprema ćelija i njihova kultivacija sa ispitivanim uzorcima je vršena u inkubatoru za gajenje ćelija na 37°C u prisustvu 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.2.3 Ispitivanje morfologije L929 ćelija u kulturi**

Procena ćelijskog rasta i morfološka analiza L929 ćelija je izvedena korišćenjem fazno kontrastne svetlosne mikroskopije (IX51 invertni mikroskop, Olympus), pod uvećanjem 10 i 20 puta. Kvalitet ćelijskog rasta je procenjen na osnovu stepena konfluentnosti ćelija i odsustva degenerativnih formi ćelija. Analizirane su osobine ćelija u kontaktu sa ispitivanim uzorcima, kao i osobine udaljenih ćelija. Konfluentan rast ćelija je ukazivao na odsustvo citotoksičnosti dok su "zaokružene" ćelije, vakuolizacija i odvajanje od podloge ukazivali na postojanje citopatogenog efekta ispitivanih uzoraka.

### **3.2.4. Ispitivanje vijabilnosti L929 ćelija u kulturi**

Vijabilnost L929 ćelija (koje su prethodno odvojene od podloge u kojoj su kultivisane primenom tripsinizacije, kako je ranije opisano) je određena primenom 1% rastvora Tripan plavog. Procenat vijabilnih ćelija je izračunat nakon oduzimanja Tripan-plavo pozitivnih (mrtvih) ćelija od 100%.

### **3.2.5. Merenje metaboličke aktivnosti L929 ćelija**

Metabolička aktivnost L929 ćelija je analizirana nakon 24 sata kontakta ćelija i eksperimentalnih uzoraka, primenom testa redukcije 3-4,5-dimetiltiazol-2-il -2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT). Test je zasnovan na redukciji MTT posredstvom mitohondrijalne sukcinat dehidrogenaze čime nastaje formazan kao nerastvorljivi produkt u vodenom rastvoru [56]. Metabolička aktivnost L929 ćelija je ispitivana nakon direktnog kontakta sa eksperimentalnim uzorcima u 24-satnoj kulturi u bazenima ploče sa 6 mesta. Nakon isteka inkubacije, uzorci i 1/2 zapremine supernatanta ćelijskih kultura su uklonjeni, dok je na ostatak ćelijske kulture dodat MTT reagens u finalnoj koncentraciji od 0.5 mg/ml. Ćelije su potom kultivisane 4 sata na 37°C, nakon čega je u bazene dodata podjednaka zapremina 10% natrijum dodecil sulfata (SDS) u 0.01M HCl. Detekcija formazana sa karakterističnom crveno-ljubičastom bojom je izvršena nakon 24 sata kultivacije, očitavanjem optičke gustine uzoraka (OD) na 570 nm primenom automatskog čitača mikrotitarskih ploča. Očitavanju metaboličke aktivnosti je prethodilo prebacivanje 200 µl supernatanta sa formazanom u bazene mikrotitarske ploče sa 96 mesta. Metabolička aktivnost je izražena kao relativna vrednost u odnosu na kontrolne ćelije čija je redukcija MTT uzeta kao mera 100% metaboličke aktivnosti.

### 3.2.6. Merenje proliferacije L929 ćelija

Efekat direktnog kontakta testiranih uzoraka Ti legure na proliferaciju L929 ćelija ispitivan je primenom testa ugradnje  $^3\text{[H}^+]$ -timidina [57]. Ćelije ( $3 \times 10^5/2$  ml) su bile zasejane u bazenima ploče sa 6 mesta i kultivisane 24 sata. Po dostizanju konfluentnosti od 60-80%, ćelije su kultivisane 24 sata sa eksperimentalnim uzorcima. Po isteku kultivacije, uzorci su uklonjeni, a ćelije su 8 sati dodatno kultivisane sa  $^3\text{[H}^+]$ -timidinom ( $1 \mu\text{Ci/bazen}$ ). Nakon toga, ćelije su odvojene od podloge tripsinizacijom i potom prebačene u bazene mirotitarske ploče sa 96 mesta. Nivo radioaktivnosti je očitao na beta scintilacionom brojaču (LKB 1219 Rackbeta, Švedska). Proliferacija ćelija je izražena kao broj otkucaja u minutu (cpm), odnosno kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolne ćelije čija je radioaktivnost uzeta kao mera 100% proliferacije.

### 3.2.7. Merenje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta

Intraćelijska produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) je analizirana primenom protočne citofluorimetrije i metode obeležavanja ćelija sa 2'-7'- di-hlorodihidro fluorescein diacetatom (DCFH-DA) [58]. Nakon isteka 24 sata inkubacije, uzorci i supernatanti ćelijskih kultura su uklonjeni, a ćelije isprane sa PBS-om (fosfatni pufferisani rastvor). Ćelije su potom inkubirane 30 minuta na  $37^\circ\text{C}$  sa  $1 \mu\text{M}$  DCFH-DA rastvorenim u RPMI medijumu bez seruma. Nakon toga ćelije su isprane u PBS-u, tripsinizirane i analizirane na protočnom citofluorimetru (Beckman Coulter Cytomics FC 500, SAD). Produkcija ROS-a je kvantifikovana na osnovu intenziteta fluorescencije ćelija obeleženih sa DCFH-DA. Rezultati su izraženi kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolne ćelije čija je produkcija ROS-a uzeta kao mera 100% produkcije.

### **3.2.8. Određivanje apoptoze i nekroze protočnom citofluorimetrijom**

Analiza nekroze i apoptoze L929 ćelija je izvršena pomoću protočne citofluorimetrije primenom postupka obeležavanja ćelija sa propidijum jodidom (PI), sa i bez hipotonog rastvora [59]. Nakon isteka inkubacije sa testiranim uzorcima, ćelije su pokupljene i isprane u PBS-u. Ćelije su potom inkubirane 5 minuta sa PI (za analizu nekroze), odnosno preko noći na hladnom sa PI (40 ug/ml) koji je rastvoren u hipotonom citratnom/Triton-X rastvoru (za analizu apoptoze). Analiza nekroze je izvršena na osnovu kvantifikacije broja ćelija obeleženih sa PI, dok je analiza apoptoze izvršena na osnovu određivanja broja ćelija sa hipodiploidnom količinom DNK molekula (sub-G1 pik). Rezultati su predstavljeni u procentima. Kulture su postavljene u triplikatima

### **3.2.9. Određivanje apoptoze morfološkom analizom**

U pojedinim eksperimentima apoptoza L929 ćelija je određivana primenom svetlosne mikroskopije, analizom morfoloških kriterijuma. L929 ćelije su nakon 24 sata kultivacije sa testiranim uzorcima tripsinizovane i bojene primenom Türk-ovog rastvora, po metodi koja je ranije opisana [60]. Apoptotičnim su smatrane ćelije sa homogeno obojenim, kondenzovanim jedrom. U svakoj ispitivanoj kombinaciji brojano je najmanje 500 L929 ćelija. Rezultati su prikazani kao procenti apoptotičnih ćelija.

### **3.2.10. Merenje produkcije laktat dehidrogenaze**

Merenje produkcije laktat dehidrogenaze (LDH), kao indirektna mera nekroze usled gubitka integriteta ćelijske membrane [61], je određivana u supernatantima kultura L929 ćelija nakon 24-satne kultivacije sa testiranim uzorcima, primenom komercijalnih LDH testova na sistemu ADVIA 1800. Kao mera potpune (100%) nekroze korišćene su ćelijske kulture sa 1% rastvorom deterdženta Triton X-100. Detektovane vrednosti LDH su

korigovane oduzimanjem vrednosti enzima izmerenih u samom RPMI medijumu. Rezultati su izraženi kao količina LDH u internacionalnim jedinicama po litru ili kao procenat citotoksičnosti koji je određen na osnovu odnosa vrednosti LDH u kulturama ćelija sa eksperimentalnim uzorcima i kulturama sa potpunom nekrozom koja je izazvana dodavanjem deterdženta.

### **3.2.11. Merenje apoptoze preko aktivacije gena za kaspaze**

Analiza ekspresije gena za mišje kaspaze (Cas-3, Cas-8 i Cas-9) je rađena metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (Real-Time PCR). Pomoću ove metode se mogu detektovati produkti amplifikacije DNK pomoću odgovarajućih prajmera, gde se u “realnom vremenu” može kontinuirano pratiti i kvantifikovati količina amplifikata PCR reakcije [62].

#### **3.2.11.1. Izolacija RNK**

Ukupna RNK je izolovana iz taloga L929 ćelija nakon nakon 24-satne kultivacije sa testiranim uzorcima (Ti, Ti-Ca, Ti-HAP, i tertman ćelija staurosporinom). Staurosporin (*Streptomyces staurospores*) je korišćen u cilju indukcije apoptoze u finalnoj koncentraciji 0.5  $\mu\text{M}$  [63]. Izolacija ukupne RNK iz L929 ćelija je izvođena pomoću TRIzol reagensa, prema uputstvu proizvođača. Ukratko, rastvor TRIzol-a sadrži fenol i gvanidin izotiocijanat, koji denaturišu proteine. U sterilnu epruvetu sa ćelijskom suspenzijom dodato je 200  $\mu\text{L}$  hloroforma na 1 mL TRIzol-a. Dodavanje hloroforma dovodi do odvajanja faza pri čemu su proteini u organskoj fazi, DNK se nalazi u međufazi, a RNK ostaje u vodenoj fazi. Sadržaj epruvete je ručno dobro promešan i ostavljen na sobnoj temperaturi 2 minuta, nakon čega je centrifugiran 15 minuta na 12000 rpm i +4°C (Eppendorf Centrifuge 5430R, Nemačka) kako bi došlo do razdvajanja faza. Gornja vodena faza sa RNK je pažljivo odvojena u novu epruvetu od 1.5 mL i dodato je 0.5 mL hladnog izopropanola na 1mL TRIzol-a. Dodavanjem hladnog izopropanola i inkubacijom na ledu (10 minuta) iz vodene faze je precipitirana RNK.



Nakon centrifugiranja u trajanju od 10 minuta na 12000 rpm/+4°C dobijen je precipitat (talog) RNK, supernatant je uklonjen, a talog je ispran sa 1000 µL hladnog 75% etanola. Nakon centrifugiranja u trajanju od 5 minuta na 10000 rpm/+4°C etanol je uklonjen, talog osušen na sobnoj temperaturi, nakon čega je RNK rastvorena u 50 µL destilovane vode (dH<sub>2</sub>O). Koncentracija dobijene RNK je merena na spektrofotometru.

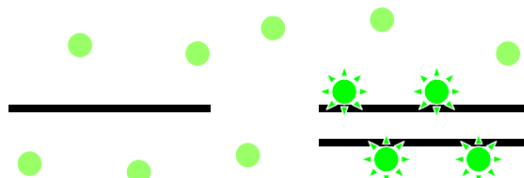
### 3.2.11.2 Reverzna transkripcija

Izolovana ukupna RNK je zatim reverznom transkripcijom prepisana u komplementarnu DNK (cDNK), primenom *Superscript II RNase H-reverse transcriptase* (Invitrogen, Francuska), prema uputstvima proizvođača. Reverzna transkripcija je enzimski proces u kojem se jednolančana RNK prepisuje u jednolančanu cDNK. Reverzna transkripcija se odvijala u PCR aparatu (Applied Biosystems, SAD) po sledećem protokolu: 25°C/10 min, 42°C/30 min, a reverzna transkriptaza je inaktivisana na 99°C/5 min. Reakciona smeša je sadržala 1 X RT pufer (500 µM dNTPs, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.3), 20 U inhibitora RNKaze (RNase inhibitor, Promega, Madison, WI), 3 µM “random hexamer” prajmera (Pharmacia, Uppsala, Švedska), 100 U reverzne transkriptaze *Superscript II RNase H-reverse transcriptase* (Invitrogen, Francuska), kao i 1 µg ukupne RNK. Ukupni volumen dobijenog rastvora cDNK bio je 20 µL, a zatim je ukupni volumen razblažen 4 puta i čuvan na -20°C do upotrebe. Dobijena cDNK upotrebljena je kao matrica za lančanu reakciju polimeraze u realnom vremenu (Real-Time PCR, RT-PCR), uz upotrebu specifičnih prajmera za odabrane target gene [64].

### 3.2.11.3. Kvantifikacija Real-time PCR metodom pomoću *SYBR Green* boje

U ovoj studiji je korišćena metoda za relativnu kvantifikaciju ekspresije gena praćenjem fluorescence *SYBR Green* bojom. Real-Time PCR metodom detekcija PCR amplifikacije vrši se u ekspancijalnoj fazi PCR, u kojoj se amplifikacija najbrže dešava, a

reakcija je u ovoj fazi visoko specifična [62,65]. Reakciona smeša za praćenje amplifikacije DNK u realnom vremenu sadržavala je fluorescentnu boju *SYBR Green*, koja se veže za DNK i emituje 1000 puta jači signal kada je vezana za dvolančane DNK (Slika 7). Kako tokom PCR dolazi do eksponencijalnog dupliranja dvolančanih amplifikata, tako dolazi i do povećanja fluorescence *SYBR Green* boje koja se vezuje za njih.



**Slika 7.** *SYBR Green* boja fluorescira tek nakon vezivanja za dvolančanu DNK

Korišćeni *SYBR Green* Mastermix sa Rox-om optimizovan je za Real-Time PCR, a osim navedene boje sadrži i DNK polimerazu (Taq-poly), 4 deoksi nukleotida (dNTPs), pasivnu referencu ROX (Passive Reference I), koja je neophodna za normalizaciju signala u svim reakcijama, kao i odgovarajući pufer koji sadrži  $MgCl_2$ . Reakcija umnožavanja se odvijala na aparatu ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD). Reakciona smeša sastojala se od 10  $\mu L$  od *SYBR Green* Master Mix, po 2  $\mu L$  10 pikomolarnog (pmol) rastvora oba oligonukleotidna prajmera (uzvodnog F i nizvodnog R), kao i 2  $\mu L$  razblažene cDNK (1:4). Sekvence prajmera (Tabela 3) su korišćene u prethodnim studijama [15,66]. Sve reakcije su rađene u triplikatu. Uslovi reakcije bili su sledeći: 50°C/2 min, inicijalna denaturacija 95°C/10min, nakon čega se reakcija odvijala u 40 ciklusa na 95°C/15s i 60°C/60s. Kontrolni uzorak, bez DNK u reakcionoj smeši, korišćen je u svakoj PCR analizi za kontrolu potencijalne kontaminacije korišćenih reagenasa. Vrednost Ct definisana je kao ciklus u kojem je količina DNK dostigla nivo zadatog praga (“threshold”) i bio je isti za sve analizirane uzorke.

**Tabela 3.** Sekvence prajmera koji su korišćeni za kvantifikaciju ekspresije gena za kaspaze

	<b>Sekvence prajmera (5'- 3')</b>	<b>Baznih parova</b>
<b>Kaspaza-3</b>	F-5'-TGTCATCTCGCTCTGGTACG-3' R-5'-AAATGACCCCTTCATCACCA-3'	199
<b>Kaspaza-8</b>	F-5'-GTGAAGAAGTGCCTTTCCTACC-3' R-5'-AGCTTCTTCCGTAGTGTGAAGG-3'	206
<b>Kaspaza-9</b>	F-5'-TGCACTTCCTCTCAAGGCAGGACC-3' R-5'-TCCAAGGTCTCCATGTACCAGGAGC-3'	206
<b>GAPDH</b>	F-5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' R-5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	439

Za izračunavanje i normalizaciju vrednosti relativne ekspresije korišćena je komparativna Ct metoda,  $\Delta\Delta Ct$  metoda. Za dobijanje  $\Delta Ct$  vrednosti je od srednje vrednosti Ct gena od interesa (srednja vrednost Ct triplikata) oduzimana srednja vrednost Ct referentnog gena GAPDH, čime je izvršena endogena normalizacija i eliminisane greške do kojih dolazi usled pipetiranja. Tako je ekspresija gena od interesa (geni za kaspaze) normalizovana u odnosu na endogenu kontrolu u tom uzorku (referentni gen, GAPDH), čime se mogu upoređivati rezultati dobijeni iz dva različita uzorka. Vrednost  $\Delta Ct$  je dobijena tako što je nivo relativne ekspresije ciljnog gena normalizovan i u odnosu na kontrolni uzorak, kalibrator. Rezultati  $\Delta Ct$  vrednosti dobijeni iz ćelija koje su bile izložene Ti legurama i tretirane staurosporinom su poređeni sa rezultatima  $\Delta Ct$  vrednosti iz ćelija koje nisu bile izložene Ti legurama, kako bi se utvrdilo da li dolazi do promene ekspresije gena za kaspaze pri izlaganju različitim legurama. Kao referentna kontrola je korišćen "housekeeping" gen gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH), prema kome su normalizovane vrednosti ekspresije odabranih gena, tako da su dobijene relativne vrednosti ekspresije pojedinog gena za svaki uzorak u odnosu na GAPDH. GAPDH je odabran kao referentni gen jer se u većini prethodnih istraživanja pokazao kao stabilni i najprikladniji gen za endogenu kontrolu, čija ekspresija nije varirala u zavisnosti od različitih tretmana korišćenih ćelijskih linija.

Ćelije koje nisu bile izložene legurama bile su kontrolni uzorci, kalibratori. Rezultati, izraženi kao N-umnošci razlika u ekspresiji ciljnog gena u odnosu na GAPDH gen i kalibrator, su izračunati po formuli:

$$N = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{[\Delta Ct(\text{target gena}) - \Delta Ct(\text{referentni gen})] - [Ct(\text{target kalibratora}) - Ct(\text{target uzorka})] - [Ct(\text{referentni gen kalibratora}) - Ct(\text{referentni gen uzorka})]}$$
, gde su vrednosti  $\Delta Ct$  kalibratora i uzorka izračunate oduzimanjem prosečna Ct vrednost ciljnog gena od Ct vrednosti referentnog GAPDH gena [67].

Međutim, ova metoda pretpostavlja da je efikasnost amplifikacije istraživanog target gena i endogene kontrole ista. Usled toga su vrednosti relativnih odnosa ekspresije izračunati pomoću matematičkog modela Pfaffl-a, koji uključuje i korekciju efikasnosti amplifikacije PCR-a svakog seta prajmera u formulu za relativnu kvantifikaciju [65,68]. Finalne vrednosti relativnih odnosa ekspresije su izračunati po formuli:

$$N = (E_{\text{target gen}})^{\Delta Ct(\text{target gen})} / (E_{\text{referentni gen}})^{\Delta Ct(\text{referentni gen})}$$

### 3.3. Ispitivanje imunomodulacijskog efekta

Imunomodulacijski efekat modifikovanih površina Ti legure je ispitivan na modelu fitohemaglutininom (PHA) aktiviranih humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMNC). Analiziran je efekat kondicioniranog medijuma testiranih uzoraka i kontrolnog medijuma (72 sata) (koncentracije 50% i 25%) na funkcionalne karakteristike PBMNC (proliferaciju i produkciju citokina) *in vitro*.

Rad sa mononuklearnim ćelijama je izveden u skladu sa postupkom koji je odobren od strane Etičkog odbora Vojnomedicinske akademije za projekat pod nazivom „Funkcionalni aspekti modulacije imunogenih i tolerogenih svojstava dendritskih ćelija“.

### **3.3.1. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi**

Humane mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMNC) su izolovane iz obogaćenih leukocita dobrovoljnih davalaca krvi (dobijenih u posupku pripreme krvnih derivata u Institutu za transfuziologiju i hemobiologiju Vojnomedicinske Akademije), postupkom diferencijalnog centrifugiranja na gustinskom gradijentu. Neposredno nakon venepunkcije, krv je razblažena u odnosu 1:2 sa RPMI medijumom koji sadrži 0.02% rastvor Na-EDTA. Nakon toga, razblažena krv je nanescena na gustinski gradijent ( $1,078 \text{ g/cm}^3$ ) u odnosu: 8 ml krvi na 2.5 ml gradijenta. Uzorci su potom centrifugirani na 2200 rpm u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Posle centrifugiranja sakupljena je frakcija obogaćenih mononuklearnih ćelija koja se izdvaja u formi interfaznog prstena na dodirnim stranama razblažene krvi i gustinskog gradijenta. Nakon ispiranja u RPMI medijumu sa Na-EDTA, sukcesivnim centrifugiranjem na malim brzinama (800 rpm) u trajanju od 10 min izvršeno je uklanjanje trombocita. Bojenje ćelija i određivanje njihove vijabilnosti je izvedeno primenom Tripan-plavo boje. U eksperimentima su korišćene ćelije čija je vijabilnost preko 95%.

### **3.3.2. Merenje proliferacije PBMNC**

Mononuklearne ćelije ( $2-3 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$ ) su kultivisane u mikrotitarskim pločama sa 96 mesta, 72 sata na  $37^\circ\text{C}$ , sa PHA ( $30 \mu\text{g/ml}$ ) u prisustvu kondicioniranog medijuma eksperimentalnih uzoraka i kontrolnog medijuma u koncentraciji od 50% i 25%. Efekat kondicioniranog medijuma na proliferaciju PBMNC je ispitivan testom proliferacije, primenom  $^3\text{[H}^+]$ -timidina [57]. Šesnaest sati pre isteka kultivacije, ćelijama je dodat  $^3\text{[H}^+]$ -timidin, nakon čega je nivo radioaktivnosti očitana na beta scintilacionom brojaču. Proliferacija mononuklearnih ćelija je izražena kao broj otkućaja u minutu (cpm), odnosno kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolne ćelije čija je radioaktivnost uzeta kao mera 100% proliferacije.

### **3.3.3. Merenje produkcije citokina**

Produkcija pro-inflamacijskih (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ), anti-inflamacijskih (IL-10), Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4, IL-5) i Th17 (IL-17) citokina je određivana u supernatantima kultura PHA-stimuliranih PBMNC nakon 72 sata kultivacije u prisustvu kondicioniranog medijuma testiranih uzoraka. Koncentracija citokina je određena primenom protočne citofluorimetrije upotrebom humanog Th1/Th2 11plex sistema (Human Th1/Th2 11plex Kit, Bender MedSystems GmbH, Austrija) i komercijalnog ELISA testa (Human IL-17 DuoSet® ELISA, R&D Systems, SAD). Protočna citofluorimetrija je urađena na citofluorimetru (Cytomics FC500 Beckman Coulter, SAD), a rezultati su obrađeni u FlowCytomix Pro 3.0 (eBioscience). Očitavanje optičke gustine u ELISA testu izvedeno je na 450 nm upotrebom ELISA čitača mikroploča (DV- 990-BV6, Italija). Rezultati su izraženi kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolne ćelije čija je količina citokina uzeta kao mera 100% produkcije.

### **3.4. Statistička analiza**

Za analizu statističke značajnosti između više nezavisnih uzoraka korišćena je analiza varijanse (ANOVA) sa Student-Newman-Keuls-ovim testom. Za procenu značajnosti razlike između dva nezavisna uzorka korišćen je Studentov t-test. Statistički značajnim smatrane se vrednosti  $p < 0.05$ . Sve statističke analize urađene su u kompjuterskom programu GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, SAD).

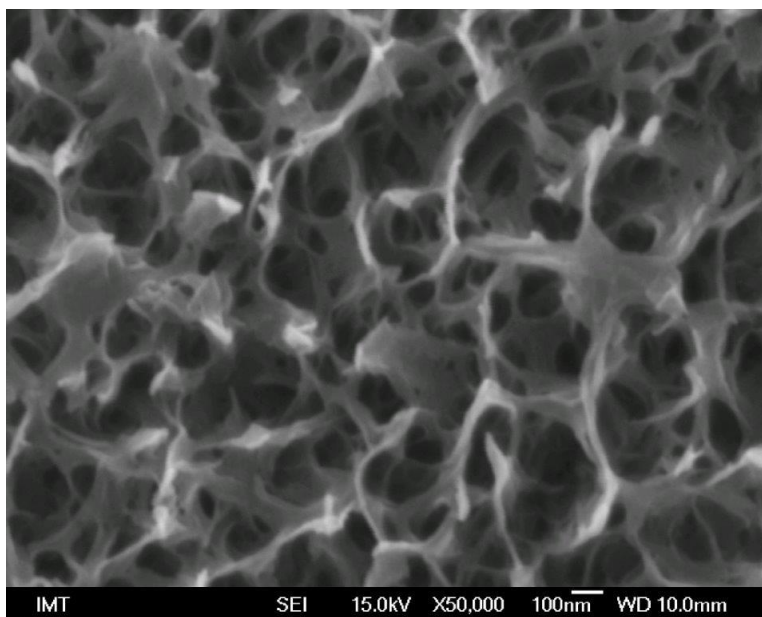
## 4. REZULTATI

### 4.1. Fizičko-hemijska karakterizacija modifikovanih Ti legura

XRD analiza Ti legure nakon tretmana sa NaOH,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  i termičkog tretmana pokazala je da su dobijene sledeće faze:  $\text{TiO}_2$  (rutil),  $\text{Na}_2\text{TiO}_3$ , CaO i  $\text{CaTi}_2\text{O}_4$ . FTIR spektar ovih legura potvrdio je prisustvo  $\text{TiO}_2$ , Ca-titanata i Na-titanata [40].

XRD analiza Ti legure sa deponovanim HAP slojem pokazala je prisustvo HAP u kristalnoj fazi u nanetom sloju. Količina amorfne faze kalcijum fosfata određena prema standardu F 2024-00 Američkog udruženja za testiranje materijala (ASTM) iznosila je oko 24% (<25% je optimalno). Veličina kristala, izračunata po Šererovoj formuli bila je 23 nm, što ukazuje da HAP sloj ima nano kristalnu strukturu.

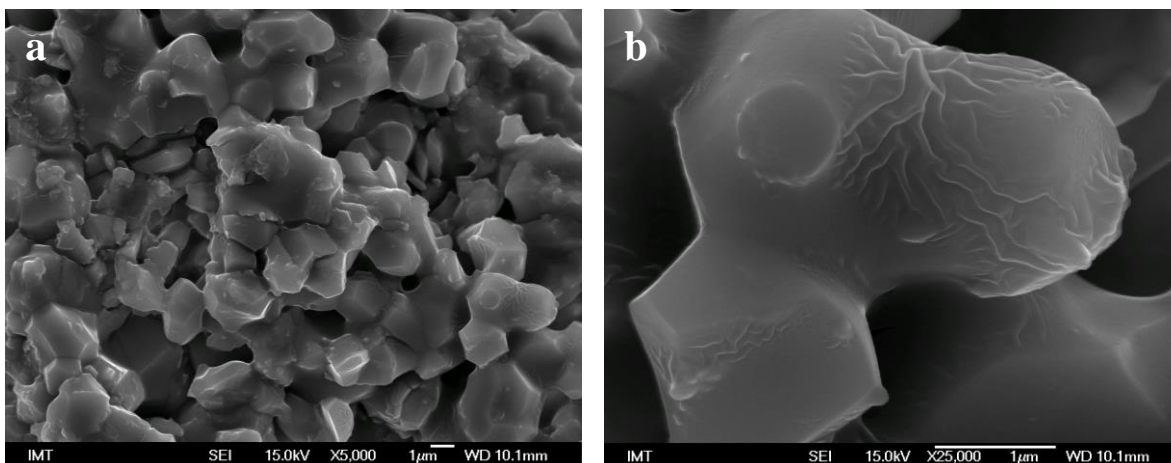
SEM analiza Ti legure tretirane sa NaOH,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  i termičkim tretmanom pokazala je veoma poroznu strukturu površine sa međusobno povezanim porama, koja deluje pogodno za adheziju i rast ćelija (Slika 8). Raspodela veličine pora je bimodalna, pri čemu se u unutrašnjosti većih pora (250–450 nm) nalaze manje pore (50-150 nm). Morfologija međusobno povezanih pora i vrlo tankih zidova između njih (10-30 nm) pokazuje veliki potencijal za proliferaciju ćelija, dok najmanje od njih mogu olakšati ćelijsko vezivanje pomoću filopodija. Tanki zidovi i njihov nanometrijski dizajn čine ovu nanotopologiju veoma korisnom za indukovanu ćelijsku aktivnost i naseljavanje ćelija.



**Slika 8.** SEM mikrografija površine Ti legure tretirane sa NaOH, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> i termičkim tretmanom. Uvećanje x50000. Preuzeto iz [40].

SEM analizom Ti legure sa deponovanim HAP slojem utvrđeno je da je srednja debljina nanetog sloja iznosila je  $204.6 \pm 15.3 \mu\text{m}$ . Nije bilo pukotina i pora na mestu spajanja nanetog sloja i metala. Morfologija HAP sloja je pokazala prisustvo čestica poligonalnog oblika veličine između 0.9 i 2.9  $\mu\text{m}$  (većinom oko 1.7  $\mu\text{m}$ ) (Slika 9). Pod većim uvećanjem uočava se kompleksna struktura koja se sastoji iz čestica veličine od 74 do 220 nm, dok između čestica postoji prostor u opsegu od 80 nm do 1  $\mu\text{m}$  (većina u opsegu 100-300 nm). Ovakva morfologija, sa mikro i nano elementima, adekvatna je za adheziju ćelija.





**Slika 9.** Tipičan izgled HAP čestica u sloju nanetom na površinu Ti legure

a) Uvećanje x5000; b) Uvećanje x25000. Preuzeto iz [41]

Određivanjem brzine rastvaranja HAP sloja uočeno je izrazito povećanje koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  jona tokom prvih 8 sati. Posle 48 sati kriva koncentracije pada i koncentracioni gradijent postaje negativan, što ukazuje na to da process precipitacije počinje da dominira. Može se pretpostaviti da u se u prva 24 sata dešava brzo rastvaranje amorfno HAP, dok se posle 48 sati amorfna faza kalcijum fosfata transformiše najvećim delom u novu fosfatnu fazu, u formi tetrakalcijum fosfata, usled čega dolazi do uravnoteženja brzine rastvaranja novonastale faze i njenog formiranja kroz proces precipitacije. Vrednost proizvoda rastvorljivosti nastale faze izračunata je iz odgovarajućih ravnotežnih koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  jona, i posle 120 sati iznosila je  $5.06 \times 10^{-36}$ , što jasno ukazuje da je u celosti amorfna faza zamenjena tetra kalcijum fosfatom (TTCP). Na taj način, bila je obezbeđena mehanička stabilnost prevlake, koja je, pored biološke aktivnosti nanetog sloja, izuzetno važna za dobro funkcionisanje prevlake ne samo u *in vitro*, nego i u *in vivo* uslovima.

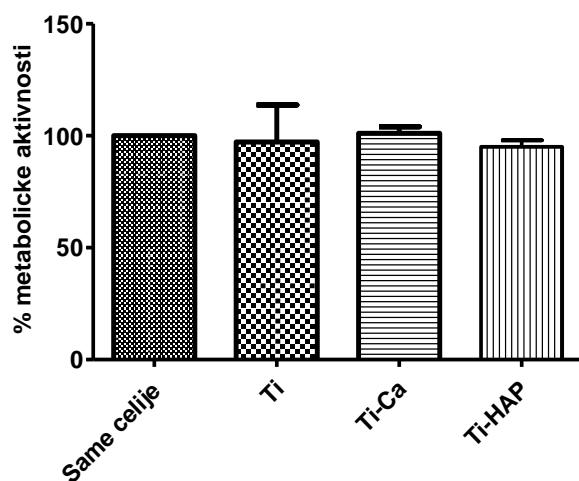
Merenje jačine adhezije nanetog HAP sloja pokazalo je jačinu adhezije od  $60.5 \pm 15.5$  MPa, što je izuzetno dobar rezultat koji višestruko premašuje vrednosti pronađene u literaturi.

## **4.2. Ispitivanje citokompatibilnosti Ti legura – direktan efekat**

U ovoj disertaciji ispitivano je citotoksično delovanje Ti legura čija je površina modifikovana hemijskom obradom, odnosno nanošenjem HAP metodom raspršivanja plazmom. Ispitivanje citokompatibilnosti je najpre ispitivano na ćelijama mišjih fibroblasta (L929), ove ćelije su odabrane kao adekvatna zamena za tipove ćelija koji čine mikrosredinu sa kojom bi u realnim uslovima uzorak kontaktirao.

### **4.2.1. Efekat Ti legura na metaboličku aktivnost L929 ćelija**

Uticaj na vijabilnost je određivan merenjem metaboličke aktivnosti L929 ćelija nakon 24 sata kontakta ćelija i eksperimentalnih uzoraka (Ti, Ti-Ca i Ti-HAP), primenom testa redukcije tro 4,5-dimetiltiazol-2-il -2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT). Dobijeni rezultati su pokazali da nije bilo statistički značajne razlike u vijabilnosti L929 ćelija nakon kontakta sa Ti legurama čija je površina modifikovana (Ti-Ca i Ti-HAP) u poređenju sa legurom čija površina nije modifikovana (Ti), odnosno u poređenju sa kontrolnim ćelijama (koje su kultivisane bez prisustva legure) (Grafikon 1).



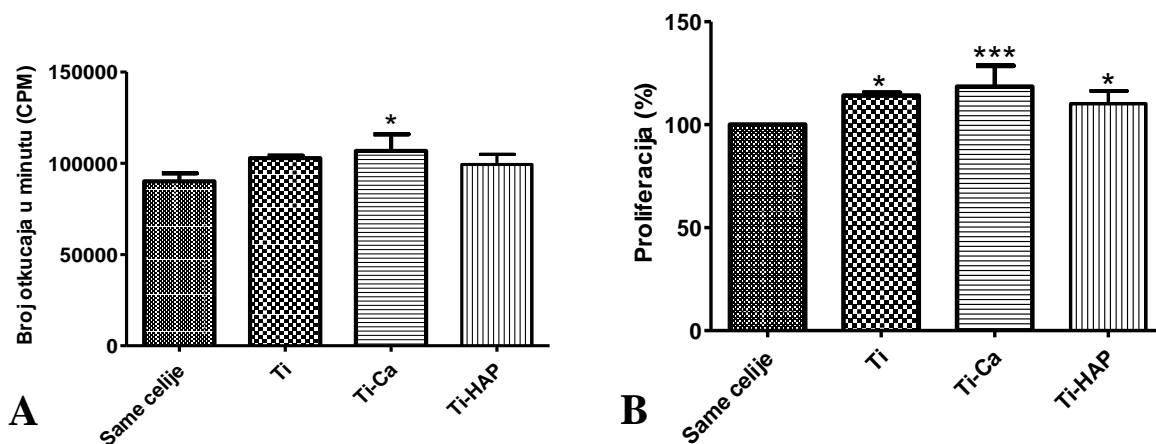
**Grafikon 1. Uticaj Ti legura na metaboličku aktivnost L929 ćelija.**

Vijabilnost je određivana merenjem metaboličke aktivnosti L929 ćelija, primenom MTT testa kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Metabolička aktivnost je izražena kao relativna vrednost u odnosu na kontrolne ćelije čija je redukcija MTT uzeta kao mera 100% metaboličke aktivnosti. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

#### 4.2.2. Efekat Ti legura na proliferaciju L929 ćelija

U cilju potvrde prethodnih rezultata, u narednim eksperimentima je određivana proliferacija L929 ćelija nakon 24 sata kultivacije sa legurama Ti, Ti-Ca i Ti-HAP. Efekat direktnog kontakta testiranih uzoraka na proliferaciju L929 ćelija je određivan primenom testa ugradnje  $^3[H+]$ -timidina. Poređenjem vrednosti broja otkucaja u minuti (cpm) nije detektovana statistički značajna razlika u proliferaciji L929 ćelija kultivisanih u prisustvu Ti legura, kako nemođifikovane legure (Ti) tako i mođifikovanih legura (Ti-Ca i Ti-HAP), u poređenju sa kontrolnim ćelijama (kultivisanim bez legure) (Grafikon 2A). Istovremeno, kada je proliferacija ćelija izražena kao relativna vrednost u odnosu na kontrolne ćelije (100%

proliferacije), uočena je statistički značajna stimulacija proliferacije L929 ćelija kultivisanih u prisustvu svih testiranih legura (Grafikon 2B).



**Grafikon 2. Uticaj Ti legura na proliferaciju L929 ćelija.**

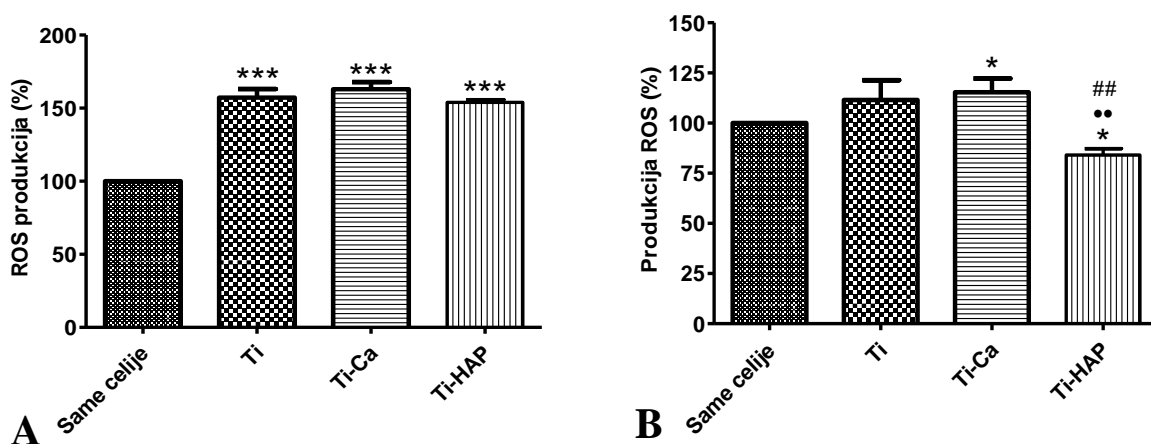
Proliferacija je određivana primenom testa ugradnje 3[H<sup>+</sup>]-timidina kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Nivo radioaktivnosti je očitao na beta scintilacionom brojaču. Proliferacija ćelija je izražena kao broj otkucanja u minutu (cpm) (A), odnosno kao relativna vrednost u odnosu na kontrolne ćelije (kultivisane bez prisustva legure) čiji je stepen proliferacije posmatran kao 100% vrednost (B). Prikazani su rezultati (X±SD) jednog reprezentativnog eksperimenta.

\*p≤0.05; \*\*\*p≤0.005 u poređenju sa kontrolnim ćelijama (bez legura).

#### 4.2.3. Efekat Ti legura na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta L929 ćelija

Jedna od reakcija ćelije na toksični stimulus je produkcija ROS, koji, ukoliko je produkovan u prekomernoj količini, može biti uzrok velikih oštećenja ćelije. Zbog toga je merenje odgovora ćelije na oksidativni stres jedan od važnih parametara u proceni biokompatibilnosti dentalnih legura. Produkcija ROS je određivana primenom protočne citofluorimetrije, obeležavanjem L929 ćelija bojom 2'-7'- di-hlorodihidro fluorescein diacetat

(DCFH-DA) nakon 24 sata inkubacije sa testiranim uzorcima. Produkcija ROS u kontrolnim ćelijama (kultiviranim bez prisutva legura) je posmatrana kao 100% produkcija. Rezultati su analizirani u odnosu na procenat pozitivnih ćelija (Grafikon 3A) i vrednosti srednjeg inteziteta fluorescence (Grafikon 3B). Analizom procenta pozitivnih ćelija, pokazano je da nema razlike u nivou produkovanih ROS u ćelijama koje su inkubirane u prisustvu modifikovanih legura (Ti-Ca i Ti-HAP) u poređenju sa kontrolnom legurom (Ti), ali je detektovano statistički značajno povećanje produkcije ROS u poređenju sa kontrolnim ćelijama (bez prisutva legure) (Grafikon 3A). Međutim, uporednom analizom vrednosti srednjeg inteziteta fluorescence pokazana je statistički značajno manja produkcija ROS u L929 ćelijama koje su inkubirane u prisustvu Ti-HAP u poređenju sa ćelijama inkubiranim u prisustvu Ti-Ca, Ti kao i kontrolnim ćelijama (Grafikon 3B).



**Grafikon 3. Uticaj Ti legura na produkciju ROS u kulturama L929 ćelija.**

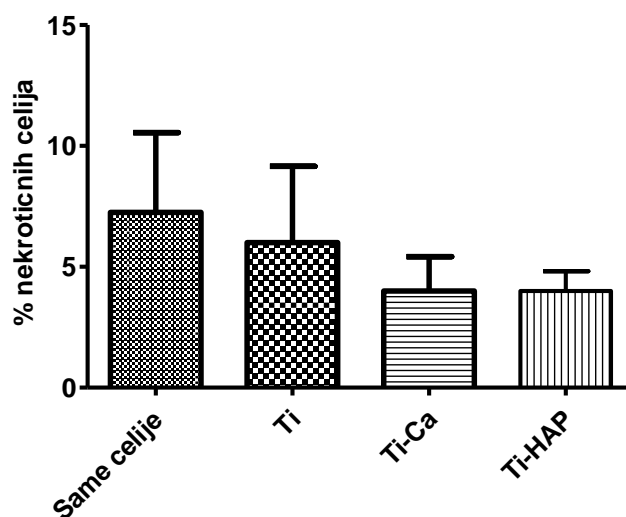
Produkcija ROS je određivana primenom protočne citofluorimetrije kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Analiziran je procenat ćelija (A) i srednji intenzitet fluorescence ćelija (B) obeleženih DCFH-DA. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti ( $X \pm SD$ ) u odnosu na kontrolne ćelije (bez legure) čija je produkcija ROS posmatrana kao 100%. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

\* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0.005$  u poređenju sa kontrolnim ćelijama (bez legura);

•• $p \leq 0.01$  u poređenju sa kontrolnom legurom (Ti); ## $p \leq 0.01$  u poređenju sa Ti-Ca.

#### 4.2.4. Efekat Ti legura na nekrozu L929 ćelija

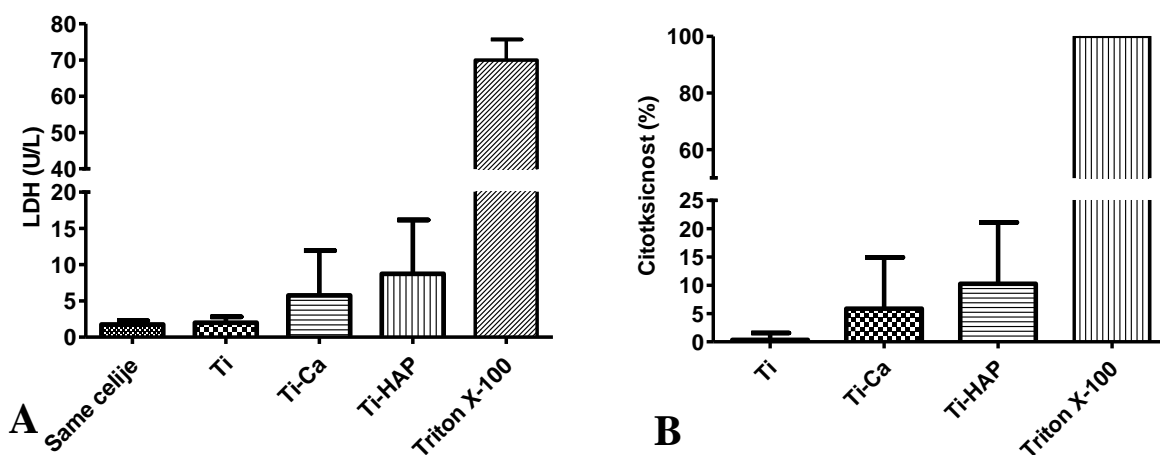
U cilju dodatnog ispitivanja citokompatibilnih svojstava legura Ti, Ti-Ca i Ti-HAP u narednom nizu eksperimenata urađeno je testiranje nekroze. Nekroza je određivana obeležavanjem L929 ćelija, prethodno inkubiranih u prisustvu testiranih legura, bojom propidijum jodidom (PI) i njihovom sledstvenom analizom pomoću protočne citofluorimetrije. Dobijeni rezultati, prikazani na grafikonu 4, pokazuju da modifikovane Ti legure (Ti-Ca i Ti-HAP) ne utiču statistički značajno na nekrozu L929 ćelija u poređenju sa kontrolnom legurom (Ti) odnosno kontrolnim ćelijama (bez legure).



**Grafikon 4. Uticaj Ti legura na nekrozu L929 ćelija.**

Nekroza je određivana citofluorimetrijski nakon 24-satnog kontakta ćelija sa testiranim legurama, primenom PI kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su predstavljeni kao procenti ( $X \pm SD$ ) nekrotičnih ćelija. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

U cilju potvrde prethodnih zapažanja, ispitana je i produkcija laktat dehidrogenaze (LDH), kao indirektna mera nekroze usled gubitka integriteta ćelijske membrane. LDH je određivana u supernatantima kultura L929 ćelija nakon 24 sata kultivacije sa testiranim uzorcima. Dobijeni rezultati su pokazali da modifikovane legure Ti-Ca i Ti-HAP statistički značajno ne menjaju produkciju LDH u poređenju sa kontrolnom legurom (Ti) odnosno kontrolnim ćelijama (bez legure). Drugim rečima, produkcija LDH (U/L) (Grafikon 5A) i procenat citotoksičnosti (Grafikon 5B) L929 ćelija nakon kontakta sa Ti legurama su bili u nivou kontrolnih ćelija. Međutim, moglo se zapaziti da su L929 ćelije kultivisane u prisustvu Ti-HAP produkovale više LDH. Takođe, najveći nivo citotoksičnosti je detektovan u kulturama L929 ćelija koje su kultivisane u prisustvu Ti-HAP.



**Grafikon 5. Uticaj Ti legura na produkciju LDH u kulturama L929 ćelija.**

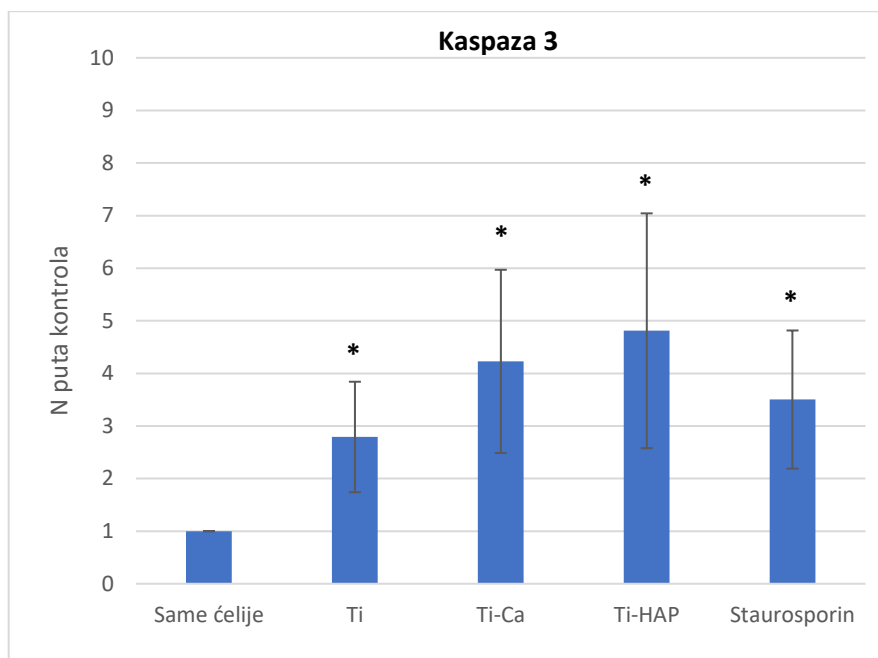
LDH je određivana primenom komercijalnih testova na sistemu ADVIA 1800 kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su predstavljeni kao koncentracija ( $X \pm SD$ ) LDH u internacionalnim jedinicama po litru (A) ili kao procenat citotoksičnosti ( $X \pm SD$ ) u poređenu sa potpunom nekrozom koja je izazvana dodavanjem deterdženta (triton X-100) (B). Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

#### 4.2.5. Efekat Ti legura na apoptozu preko aktivacije gena za kaspaze

Real-Time PCR metodom uz pomoć *SYBR Green* boje praćena je ekspresija gena za kaspaze 3, 8 i 9 u L929 ćelijama nakon 24-satnog kontakta ćelija i eksperimentalnih uzoraka (Ti, Ti-Ca i Ti-HAP). Osim što je ekspresija gena merena u ćelijama koje su bile u kontaktu sa ispitivanim legurama ona je još merena u ćelijama koje su samo kultivisane u istom medijumu (negativna kontrola) i ćelijama koje su tretirane staurosporinom (0.5  $\mu$ M) koji indukuje apoptozu (pozitivna kontrola). Prikazani rezultati se odnose na tri zasebna eksperimenta, a ekspresija gena u svakom uzorku je rađena u triplikatu.

Upoređivanjem ekspresije gena za kaspazu 3 (Grafikon 6) u L929 ćelijama koje su bile izložene kontaktu sa Ti, Ti-Ca i Ti-HAP u odnosu na kontrolne ćelije dobijeno je statistički značajno povećanje ekspresije gena ( $p < 0,05$ ) za sve ispitivane legure. Statistički najznačajnije povećanje ekspresije gena za kaspazu 3 prema ćelijama iz kontrolne grupe, je nađeno u ćelijama koje su stimulirane sa staurosporinom ( $p=0.030$ ), iako je to povećanje u odnosu na kontrolnu grupu bilo manje u odnosu na ćelije koje su bile u kontaktu sa Ti-HAP (3.5 prema 4.8 puta). Upoređivanjem ekspresije gena između uzoraka L929 ćelija koje su bile u kontaktu sa legurama ili staurosporinom jednih sa drugima nije nađena statistički značajna razlika. Iako je povećanje ekspresije gena za kaspazu 8 (Grafikon 7) u L929 ćelijama koje su bile u kontaktu sa Ti, Ti-Ca i Ti-HAP veće (povećanje ekspresije gena od 10 do 24 puta) u odnosu na ekspresiju gena za kaspazu 3, trend povećanja je isti, dok je ekspresija gena u ćelijama tretiranim staurosporinom (u odnosu na kontrole) dostigla visoku statističku značajnost  $p=0.0006$ . Za razliku od ekspresije gena za kaspazu 3 i 8, ekspresija gena za kaspazu 9 je statistički značajno povećana u uzorcima koji su tretirani staurosporinom (3.3 puta povećanje ekspresije u odnosu na kontrole) i Ti (4 puta veća ekspresija), ali ne i u uzorcima koji su bili u kontaktu sa Ti-Ca (3.5 puta veća ekspresija) i Ti-HAP (5.5 puta veća ekspresija) (Grafikon 8). Slično sa ekspresijom gena za kaspaze 3 i 8, i ekspresija gena za kaspazu 9 nije dostigla statistički značajne vrednosti kada su upoređivane ispitivane grupe međusobno, a ne sa kontrolnom grupom.

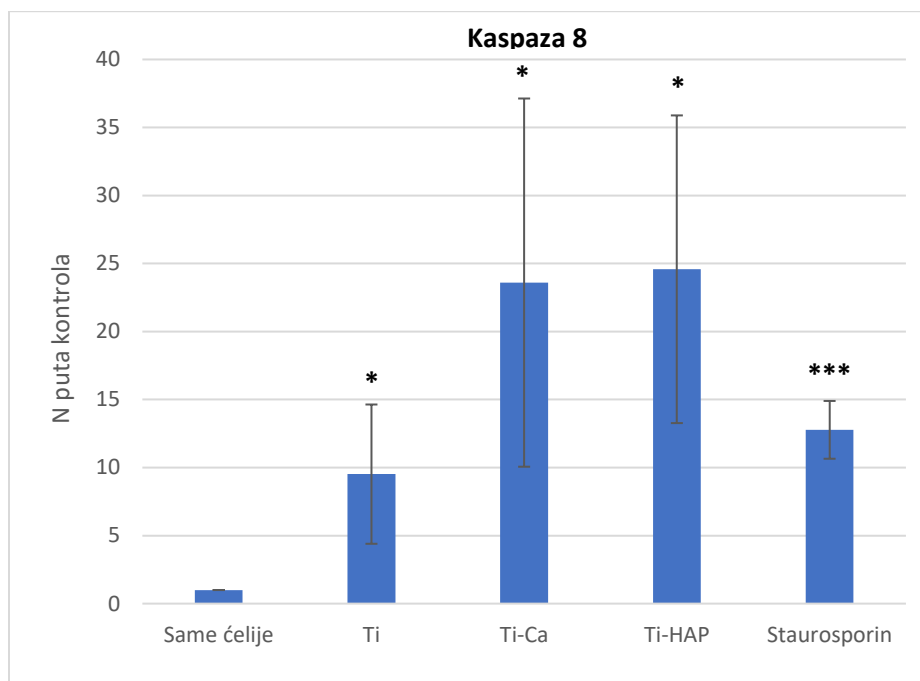




**Grafikon 6. Ekspresija gena za kaspazu 3 u L929 ćelijama nakon 24-satne kulture sa ispitivanim uzorcima.**

Real-Time PCR metodom uz pomoć *SYBR Green* boje praćena je ekspresija gena za kaspazu 3 u L929 ćelijama nakon 24-satnog kontakta ćelija i eksperimentalnih uzoraka (Ti, Ti-Ca i Ti-HAP), u ćelijama koje su same kultivisane u istom medijumu i ćelijama koje su tretirane staurosporinom. Ekspresija gena u svakom uzorku je rađena u triplikatu.

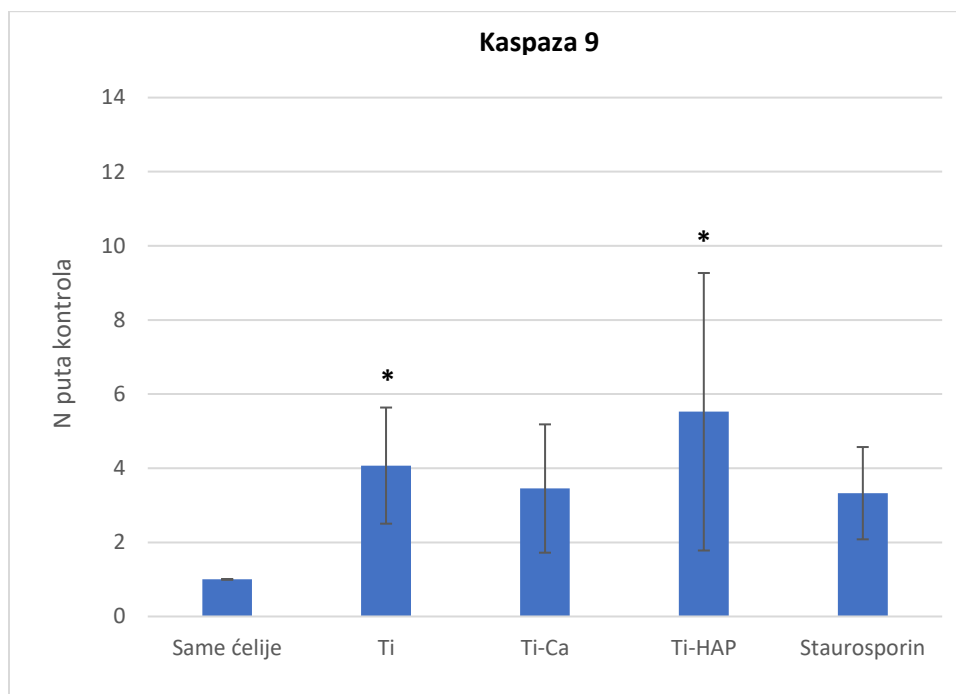
\* $p \leq 0.05$  u poređenju sa kontrolom.



**Grafikon 7. Ekspresija gena za kaspazu 8 u L929 ćelijama nakon 24-satne kulture sa ispitivanim uzorcima.**

Real-Time PCR metodom uz pomoć *SYBR Green* boje praćena je ekspresija gena za kaspazu 8 u L929 ćelijama nakon 24-satnog kontakta ćelija i eksperimentalnih uzoraka (Ti, Ti-Ca i Ti-HAP), u ćelijama koje su same kultivisane u istom medijumu i ćelijama koje su tretirane staurosporinom. Ekspresija gena u svakom uzorku je rađena u triplikatu.

\* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0.005$  u poređenju sa kontrolom.



**Grafikon 8. Ekspresija gena za kaspazu 9 u L929 ćelijama nakon 24-satne kulture sa ispitivanim uzorcima.**

Real-Time PCR metodom uz pomoć *SYBR Green* boje praćena je ekspresija gena za kaspazu 9 u L929 ćelijama nakon 24-satnog kontakta ćelija i eksperimentalnih uzoraka (Ti, Ti-Ca i Ti-HAP), u ćelijama koje su same kultivisane u istom medijumu i ćelijama koje su tretirane staurosporinom. Ekspresija gena u svakom uzorku je rađena u triplikatu.

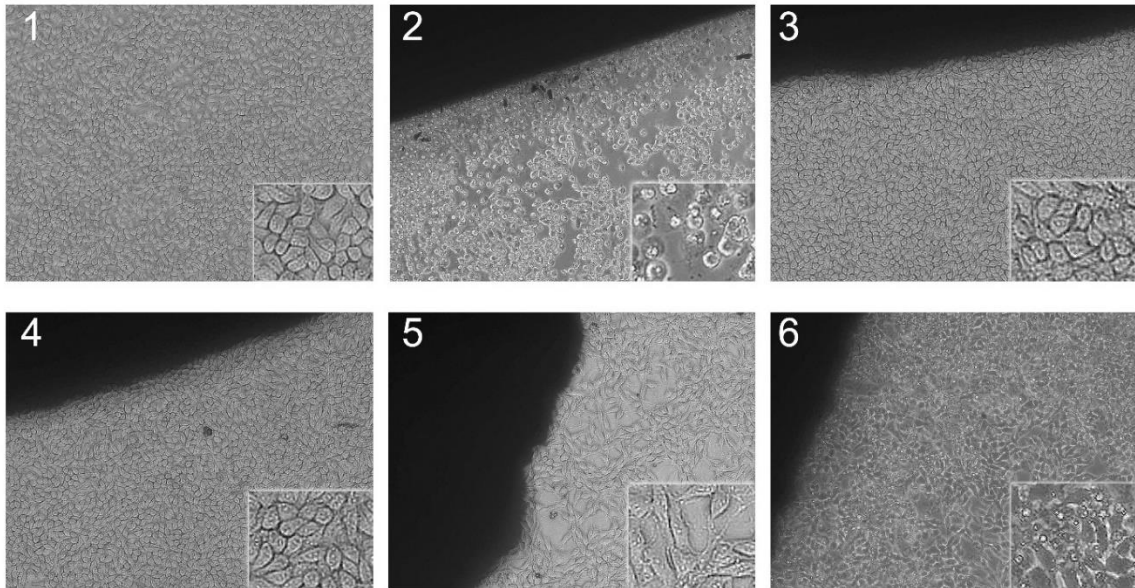
\* $p \leq 0.05$  u poređenju sa kontrolom.

### **4.3. Ispitivanje citokompatibilnosti Ti legure na koju je obostrano naneta prevlaka HAP-a – direktan i indirektan efekat**

Prethodno opisani rezultati odnosili su se na delovanje Ti legure na koje je prevlaka HAP-a naneta samo sa jedne strane (koja je bila u kontaktu sa ispitivanim ćelijama). Polazeći od dobijenih rezultata koji su pokazali da jednostrano modifikovana legura ispoljava blagu citotoksičnost, zanimljivo je bilo ispitati kakvo delovanje ispoljava legura na koju su obostrano nanete prevlake HAP-a (Ti-HAP2).

#### **4.3.1. Efekat Ti-HAP2 na metaboličku aktivnost L929 ćelija**

Najpre je ispitan citotoksični efekat Ti-HAP2 u testu direktne citotoksičnosti, primenom L929 ćelija, prema standardu ISO 10993-5. U ovim eksperimentima kao pozitivna kontrola korišćeni su citotoksični diskovi nikla (Ni), dok su negativnu kontrolu predstavljali polistirenski diskovi i L929 ćelije kultivisane bez ispitivanih diskova. Morfološkom analizom L929 ćelija, primenom svetlosne mikroskopije, nisu zabeleženi znaci citotoksičnog delovanja kontrolne legure (Ti) i polistirenskih uzoraka (negativna kontrola) (Slika 10-3,4) u poređenju sa kontrolnim ćelijama (same L929) (Slika 10-1). L929 ćelije koje su kultivisane sa diskovima Ni (pozitivna kontrola) su manifestovale vidljive znakove citotoksičnog delovanja, odlepljivanje od podloge, okrugao oblik, nekrozu i kompletnu inhibiciju rasta (Slika 10-2). Potvrđeni su prethodni nalazi koji pokazuju da Ti-HAP (modifikovana samo jedna strana) osim blage inhibicije rasta ne ispoljavaju značajnu citotoksičnost (Slika 10-5). Istovremeno, morfološki znaci citotoksičnosti su bili vidljivi na L929 ćelijama koje su se nalazile u blizini Ti-HAP2 (modifikovane obe strane) ali ne i na udaljenim ćelijama koje su delovale „zdravo“ (Slika 10-6). Treba naglasiti da su znaci citotoksičnog delovanja primećeni na L929 ćelijama koje su bile u direktnom kontaktu (ispod) sa svim testiranim uzorcima osim polistirenskih diskova (negativnih kontrola).

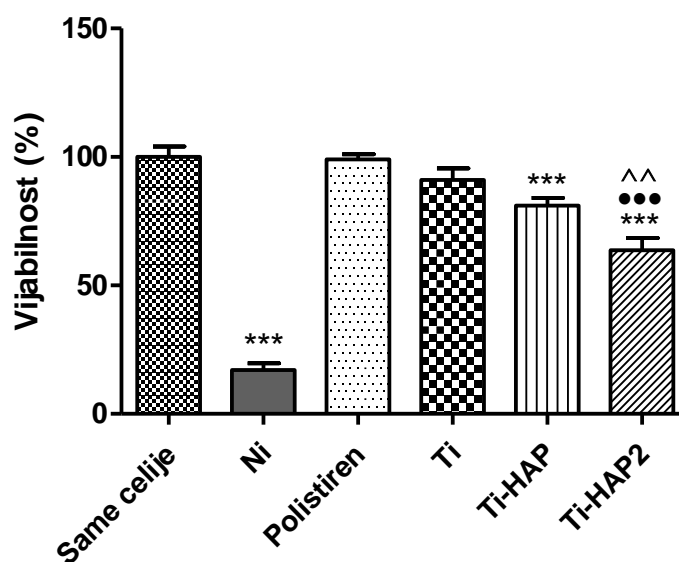


**Slika 10. Morfologija jednoslojne kulture L929 ćelija u kontaktu sa Ti legurama i kontrolnim uzorcima.**

Testirane ćelije su kultivisane u pločama sa 6 polja do postizanja 80% konfluentnosti. Uzorci legura i kontrolni diskovi ( $1\text{cm}^2/\text{ml}$ ) su postavljeni u centar polja i kultivisani sa ćelijama kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Nakon 24 sata ćelije su analizirane na invertnom mikroskopu. 1) Negativna kontrola (same ćelije); 2) Pozitivna kontrola (Ni); 3) Negativna kontrola (polistirenski diskovi); 4) kontrolna legura (Ti); 5) HAP modifikacija jedne strane Ti legure (Ti-HAP); 6) HAP modifikacija dve strane Ti legure (Ti-HAP2). Uvećanje x100; Umetnuta slika uvećanje x300.

U daljim istraživanjima, morfološka zapažanja su potvrđena primenom kvantitativnog testa vijabilnosti, na osnovu broja Tripan plavo pozitivnih ćelija (mrtve ćelije). Dobijeni rezultati su prikazani na grafikonu 9. Pokazana je statistički značajna razlika između Ti-HAP2 (dvostrano modifikovane legure) i Ti-HAP (jednostrano modifikovane) kao i između Ti-HAP2 i nemodifikovane (kontrolne) Ti legure.

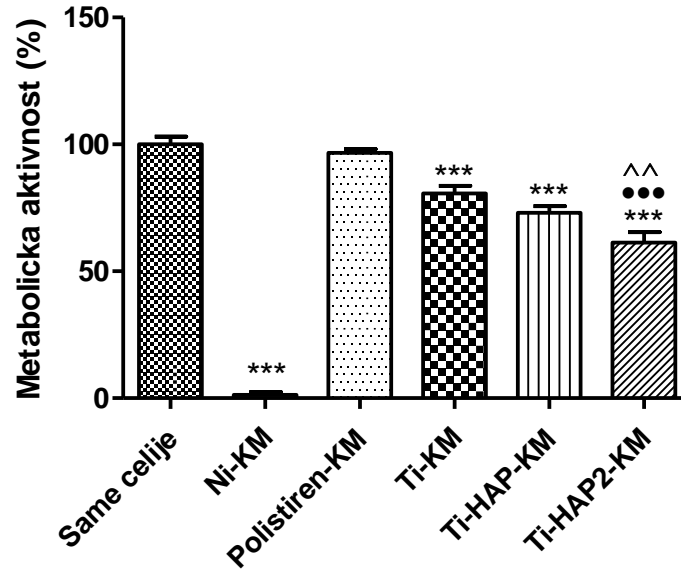
Da bi ispitali da li je zapažena citotoksičnost HAP-modifikovanih legura posledica oslobođenih produkata sa toksičnim delovanjem u narednoj seriji eksperimenata ispitan je uticaj kondicioniranog medijuma (KM) dobijenog držanjem legura u hranjivom medijumu u toku 24 sata (Grafikon 10). Dobijeni rezultati su potvrdili obrazac citotoksičnog delovanja ustanovljen prethodnim testovima vijabilnosti. Međutim, nivo zabeleženog citotoksičnog delovanja je bio blago uvećan u poređenju sa testom vijabilnosti. Polazeći od kriterijuma ISO 10993-5, nemodifikovana legura (Ti) i jednostrano HAP-modifikovana legura (Ti-HAP) su okarakterisane kao ne-citotoksične (redukcija vijabilnosti manja od 30%). Prema istim kriterijumima dvostrano HAP-modifikovana legura (Ti-HAP2) je klasifikovana u kategoriju blago-umereno citotoksična (redukcija vijabilnosti 30%-55%).



**Grafikon 9. Uticaj Ti legura i kontrolnih uzoraka na vijabilnost L929 ćelija.**

Testirani uzorci su inkubirani sa L929 ćelijama tokom 24 sata kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Vijabilnost je određivana nakon uklanjanja uzoraka. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti ( $X \pm SD$ ) u poređenju sa negativnom kontrolom (same ćelije) koja je posmatrana kao 100%.

\*\*\* $p \leq 0.005$  u poređenju sa negativnim kontrolama (same ćelije i polistiren); \*\* $p \leq 0.005$  u poređenju sa Ti; ^^ $p \leq 0.01$  u poređenju sa Ti-HAP.



**Grafikon 10. Uticaj KM Ti legura i kontrolnih uzoraka na metaboličku aktivnost L929 ćelija.**

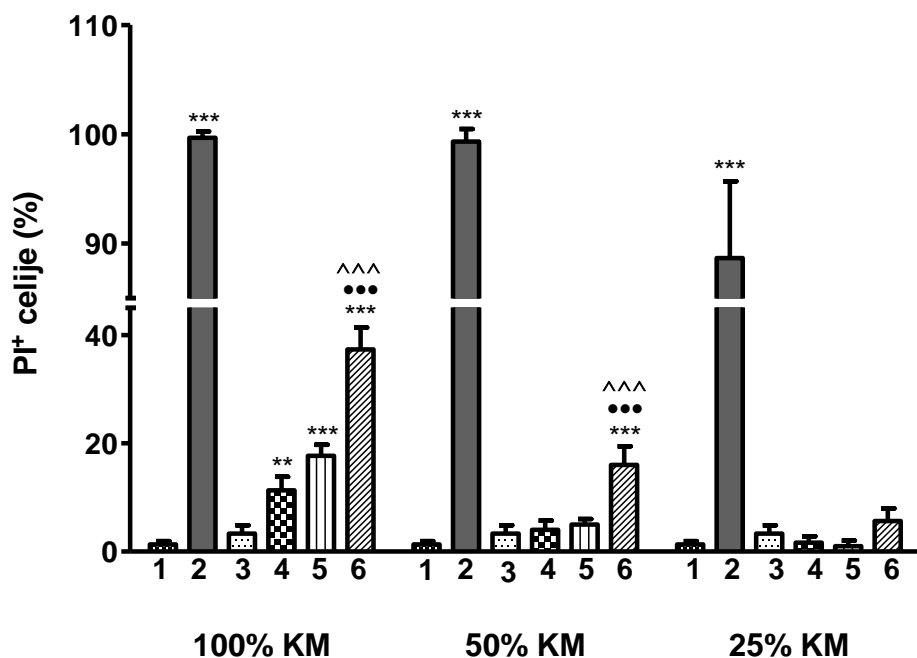
Testirani uzorci su inkubirani sa L929 ćelijama tokom 24 sata kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Metabolička aktivnost je određivana nakon kultivacije L929 ćelija u prisustvu KM testiranih uzoraka, primenom MTT testa. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti ( $X \pm SD$ ) u poređenju sa negativnom kontrolom (same ćelije) koja je posmatrana kao 100%.

\*\*\* $p \leq 0.005$  u poređenju sa negativnim kontrolama (same ćelije i polistiren-KM); ••• $p \leq 0.005$  u poređenju sa Ti-KM; ^^ $p \leq 0.01$  u poređenju sa Ti-HAP-KM.

#### **4.3.2. Efekat kondicionirane legure Ti-HAP2 na nekrozu i apoptozu L929 ćelija**

U cilju detaljnijeg ispitivanja mehanizama citotoksičnog delovanja ispitivanih Ti legura, urađeni su dodatni testovi, i to: bojenje PI za procenu nekroze, bojenje Turk-om za procenu apoptoze i merenje inkorporacije  $^3H$  kao indikator proliferacije ćelija. Ova istraživanja su urađena primenom KM testiranih legura na L929 ćelijama.

Pokazano je da nerazblaženi KM Ti legura (Ti-KM, Ti-HAP-KM i Ti-HAP2-KM) indukuje nekrozu L929 ćelija. Najveća nekroza je zabeležena delovanjem KM pripremljenog kondicioniranjem legure na koju su obostrano nanete prevlake HAP-a (Ti-HAP2). Ovaj efekat je zavisio od razblaženja Ti-HAP2-KM. Dobijeni rezultati su prikazani na grafikonu 11.



**Grafikon 11. Uticaj KM Ti legura i kontrolnih uzoraka na nekrozu L929 ćelija.**

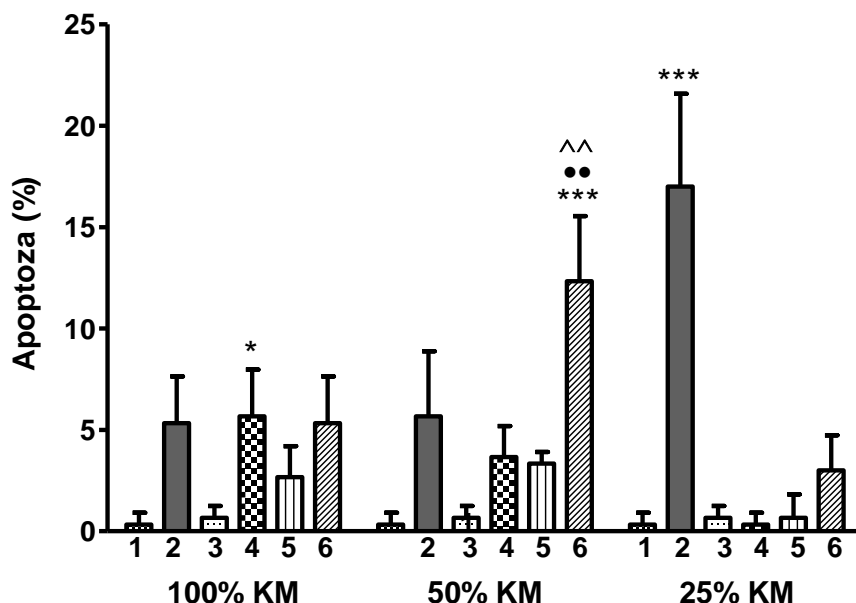
L929 ćelije su kultivisane u nerazblaženom (100%), 50% i 25% KM testiranih legura i kontrolnih uzoraka. Nakon 24 sata nekroza je određivana kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani kao procenat ( $X \pm SD$ ) nekrotičnih ćelija ( $PI^+$  ćelija) u poređenju sa negativnom kontrolom koja je posmatrana kao 100%. 1) Negativna kontrola (same ćelije); 2) Pozitivna kontrola (Ni); 3) Negativna kontrola (polistirenski diskovi); 4) kontrolna legura (Ti); 5) HAP-modifikacija jedne strane Ti legure (Ti-HAP); 6) HAP-modifikacija dve strane Ti legure (Ti-HAP2).

\*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.005$  u poređenju sa negativnim kontrolama (same ćelije i polistiren-KM);

•• $p \leq 0.005$  u poređenju sa Ti-KM; ^^ $p \leq 0.005$  u poređenju sa Ti-HAP-KM.



Zanimljivi rezultati su dobijeni u ispitivanjima efekta KM testiranih legura na apoptozu L929 ćelija (Grafikon 12). Pokazano je da niže koncentracije dvostrano HAP-modifikovane legure (Ti-HAP2) indukuju veći stepen apoptoze L929 ćelija.



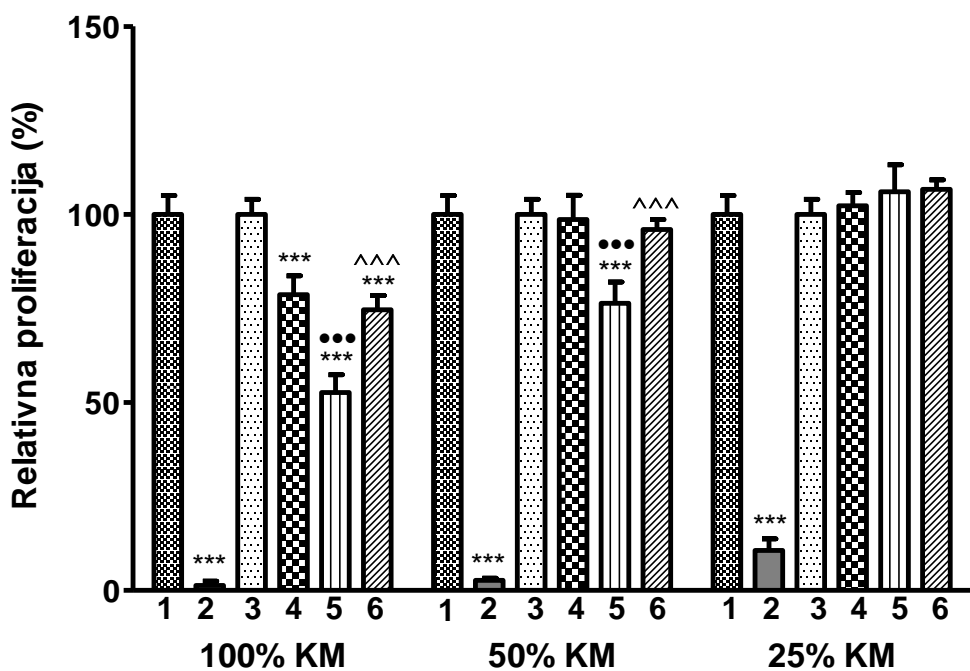
**Grafikon 12. Uticaj KM Ti legura i kontrolnih uzoraka na apoptozu L929 ćelija.**

L929 ćelije su kultivisane u nerazblaženom (100%), 50% i 25% KM testiranih legura i kontrolnih uzoraka. Nakon 24 sata apoptoza je određivana kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani kao procenat ( $X \pm SD$ ) apoptotičnih ćelija u poređenju sa negativnom kontrolom koja je posmatrana kao 100%. 1) Negativna kontrola (same ćelije); 2) Pozitivna kontrola (Ni); 3) Negativna kontrola (polistirenski diskovi); 4) kontrolna legura (Ti); 5) HAP-modifikacija jedne strane Ti legure (Ti-HAP); 6) HAP-modifikacija dve strane Ti legure (Ti-HAP2).

\* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0.005$  u poređenju sa negativnim kontrolama (same ćelije i polistiren-KM); \*\* $p \leq 0.01$  u poređenju sa Ti-KM; ^^ $p \leq 0.01$  u poređenju sa Ti-HAP-KM.

Prethodno opisani rezultati uticaja ispitivanih legura na nekrozu i apoptozu L929 ćelija su bili u saglasnosti sa rezultatima u kojima je ispitivan uticaj modifikovanih legura na

proliferaciju. Naime, pokazano je da je inhibicija ugradnje 3H timidina najveća kada su L929 ćelije kultivisane u prisustvu KM dvostrano HAP-modifikovane legure (Ti-HAP2-KM). Sva tri testirana uzorka KM ispitivanih legura su pokazala veći stepen inhibicije proliferacije ćelija u poređenju sa nivoom citotoksičnosti koji je detektovan primenom testova za nekrozu/apoptozu (Grafikon 13).



**Grafikon 13. Uticaj KM Ti legura i kontrolnih uzoraka na proliferaciju L929 ćelija.**

L929 ćelije su kultivisane u nerazblaženom (100%), 50% i 25% KM testiranih legura i kontrolnih uzoraka. Nakon 24 sata proliferacija je određivana kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani kao procenat ( $X \pm SD$ ) relativne proliferacije ćelija u poređenju sa negativnom kontrolom koja je posmatrana kao 100%. 1) Negativna kontrola (same ćelije); 2) Pozitivna kontrola (Ni); 3) Negativna kontrola (polistirenski diskovi); 4) kontrolna legura (Ti); 5) HAP-modifikacija jedne strane Ti legure (Ti-HAP); 6) HAP-modifikacija dve strane Ti legure (Ti-HAP2).

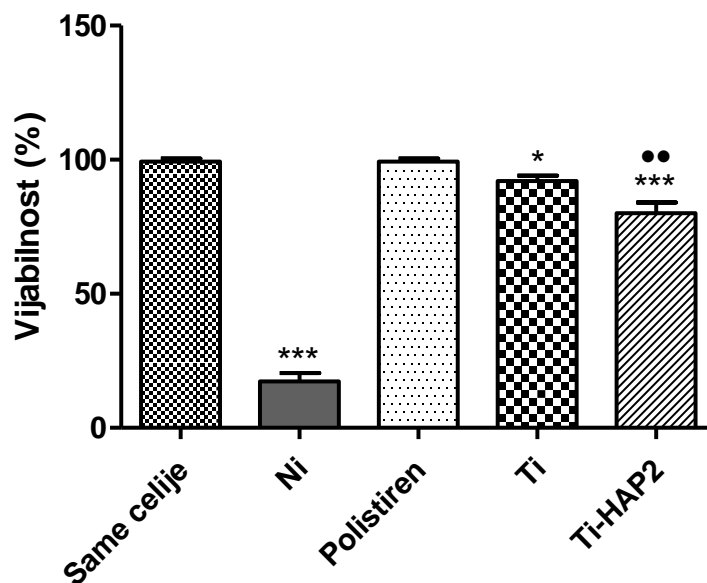
\*\*\* $p \leq 0.005$  u poređenju sa negativnim kontrolama (same ćelije i polistiren-KM); \*\* $p \leq 0.005$  u poređenju sa Ti-KM; ^^ $p \leq 0.005$  u poređenju sa Ti-HAP-KM.

### **4.3.3. Efekat kondicionirane legure Ti-HAP2 na metaboličku aktivnost L929 ćelija**

Da bi se ispitalo da li kondicioniranje utiče na citotoksičnost HAP-modifikovanih Ti legura, najpre je uzorak Ti-HAP2 kondicioniran 24 sata u medijumu, a potom je ispitano citotoksično delovanje ovako pripremljenog uzorka u testu direktne citotoksičnosti na L929 ćelijama (Grafikon 14). Istovremeno, primenom MTT testa, je analizirano delovanje 24-satnog KM HAP-modifikovanih legura koje su prethodno kondicionirane (Grafikon 15). Ista procedura je primenjena i za nemodifikovanu leguru (Ti) i za kontrolne uzorke.

Dobijeni rezultati ovog segmenta istraživanja, kako u testu direktne citotoksičnosti (Grafikon 14) tako i u testu indirektno citotoksičnosti (Grafikon 15) su pokazali da kondicioniranje značajno smanjuje citotoksični efekat HAP-modifikovanih legura. Citotoksičnost Ti-HAP2 (dvostrano modifikovane legure), detektovana MTT testom, je nakon kondicioniranja smanjena na nivo citotoksičnosti koji je prema kriterijumima ISO 10993-5 prihvatljiv. Naime, inicijalna zabeležena citotoksičnost  $48.2 \pm 4.73$  je nakon kondicioniranja smanjena na  $23.5 \pm 3.0$ .

Istovremeno, dodatno kondicioniranje testiranih uzoraka u trajanju od 7 dana nije dovelo do daljeg smanjenja citotoksičnog efekta (Grafikoni 16 i 17).

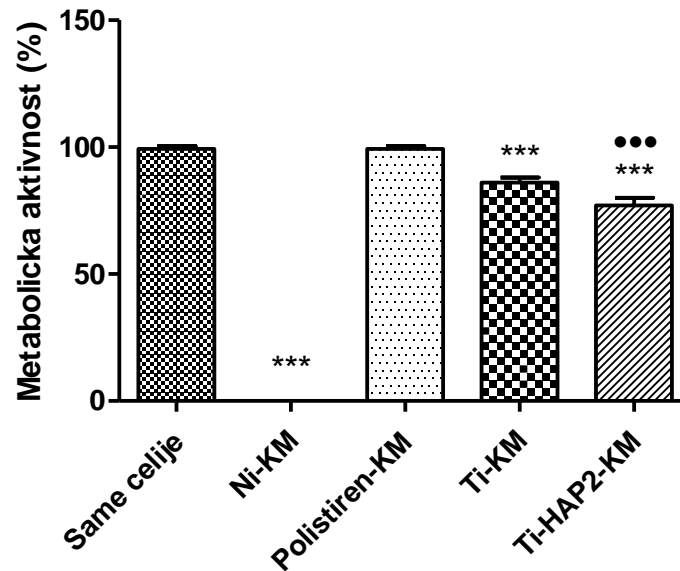


**Grafikon 14. Uticaj kondicioniranih Ti legura na vijabilnost L929 ćelija.**

Testirani uzorci legura su kondicionirani u RPMI medijumu tokom 24 sata. Nakon toga je određivana vijabilnost L929 ćelija nakon direktnog kontakta sa ovako pripremljenim uzorcima kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode.

\* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0.005$  u poređenju sa negativnim kontrolama (same ćelije i polistiren)

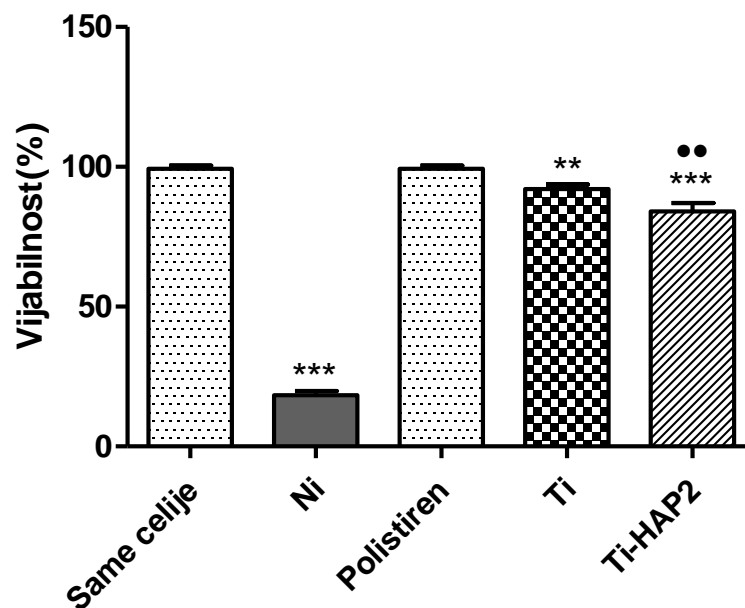
•• $p \leq 0.01$  u poređenju sa Ti.



**Grafikon 15. Uticaj KM kondicioniranih Ti legura na metaboličku aktivnost L929 ćelija.**

Testirani uzorci legura su kondicionirani u RPMI medijumu tokom 24 sata. Kondicionirani medijumi su pripremljeni inkubiranjem kondicioniranih uzoraka tokom 24 sata. Tako pripremljeni KM su kultivisani sa L929 ćelijama 24 sata nakon čega je određivana metabolička aktivnost L929 ćelija kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode.

\*\*\* $p \leq 0.005$  u poređenju sa negativnim kontrolama (same ćelije i polistiren-KM); ••• $p \leq 0.005$  u poređenju sa Ti-KM.

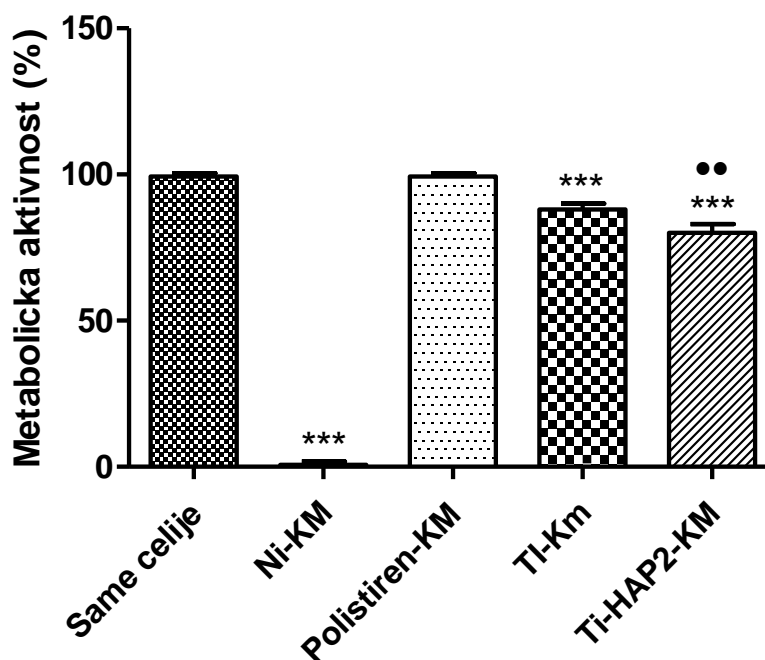


**Grafikon 16. Uticaj kondicioniranih Ti legura na vijabilnost L929 ćelija.**

Testirani uzorci legura su kondicionirani u RPMI medijumu 7 dana. Nakon toga, određivana je vijabilnost L929 ćelija nakon direktnog kontakta sa ovako pripremljenim uzorcima kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode.

\*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.005$  u poređenju sa negativnim kontrolama (same ćelije i polistiren);

•• $p \leq 0.01$  u poređenju sa Ti.



**Grafikon 17. Uticaj KM kondicioniranih Ti legura na metaboličku aktivnost L929 ćelija.**

Testirani uzorci legura su kondicionirani u RPMI medijumu tokom 7 dana. Kondicionirani medijumi su pripremljeni inkubiranjem kondicioniranih uzoraka tokom 24 sata. Tako pripremljeni KM su kultivisani sa L929 ćelijama 24 sata nakon čega je određivana metabolička aktivnost L929 ćelija kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode.

\*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.005$  u poređenju sa negativnim kontrolama (same ćelije i polistiren-KM);

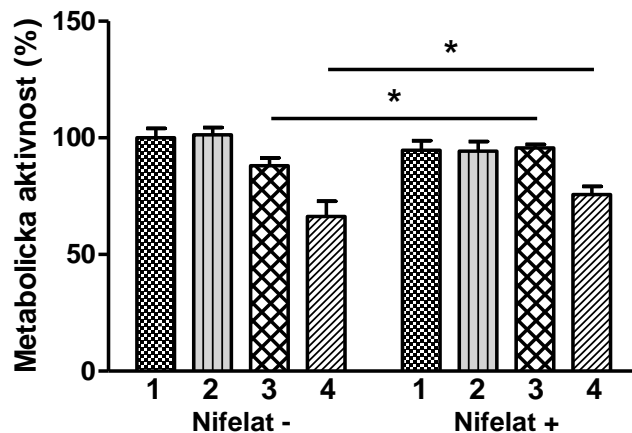
•• $p \leq 0.01$  u poređenju sa Ti-KM.

#### 4.3.4. Uloga jona $\text{Ca}^{2+}$ u citotoksičnom delovanju HAP-modifikovanih Ti legura

U finalnoj fazi istraživanja ispitana je moguća uloga jona  $\text{Ca}^{2+}$  u citotoksičnom delovanju Ti legura čija je površina modifikovana HAP-om. Raniji nalazi ukazuju na to da citotoksično delovanje može zavisiti od količine HAP-a koja je korišćena za oblaganje legura. Procenjena količina HAP-a koja je korišćena za oblaganje obe strane testiranih diskova Ti legure je iznosila 40 mg. Zbog toga je ova količina HAP-a kondicionirana u istoj zapremini i tipu medijuma (kompletni RPMI) koji je korišćen za kondicioniranje testiranih uzoraka. Dobijeni rezultati, prikazani na grafikonu 18, pokazuju da KM HAP ne deluje citotoksično na L929 ćelije što ukazuje da HAP oslobođen sa površine legure verovatno nije uzrok citotoksičnosti. Kako je HAP teško rastvorljiv u vodenim rastvorima, testirali smo i KM pripremljen od  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  koji je pod istim uslovima više rastvorljiv. Pokazano je da KM  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ispoljava blagu citotoksičnost, ali značajno nižu u poređenju sa KM HAP-modifikovanih legura Ti koje su testirane u ovom radu.

Istraživanja smo završili testiranjem efekta nifelata, blokatora  $\text{Ca}^{2+}$  kanala u eseju sa KM. Pokazalo se da nifelat kompletno poništava citotoksični efekat KM  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , a citotoksičnost KM dvostrano HAP-modifikovane legure (Ti-HAP2-KM) blago redukuje (Grafikon 18).





**Grafikon 18. Uticaj nifelata na metaboličku aktivnost L929 ćelija tretiranih različitim KM.**

L929 ćelije su tretirane KM pripremljenim kondicioniranjem HAP, Ca(OH)<sub>2</sub> ili Ti-HAP<sub>2</sub> (dvostrano modifikovane) u prisustvu ili odsustvu nifelata (10 µg/ml). Nakon 24 sata određena je metabolička aktivnost, primenom MTT testa kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani kao relativna metabolička aktivnost ( $X \pm SD$ ) u poređenju sa vrednostima kontrolnih ćelija. 1) kontrolni medijum; 2) HAP-KM; 3) Ca(OH)<sub>2</sub>-KM; 4) Ti-HAP<sub>2</sub>-KM.

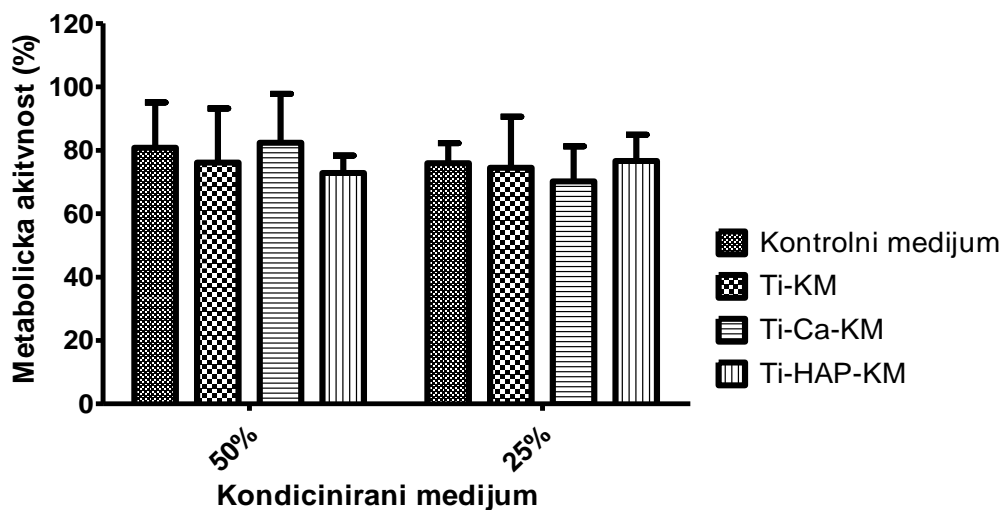
\* $p \leq 0.05$  u poređenju sa odgovarajućim uzorcima kao što ukazuju linije poređenja.

#### 4.4. Ispitivanje citokompatibilnosti Ti legura – indirektan efekat

Indirektna citotoksičnost modifikovanih Ti legura je procenjivana nakon kultivacije stimulisanih humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMNC) dobrovoljnih davaoca sa kondicioniranim medijumom (KM) koji je dobijen inkubacijom testiranih uzoraka legura u kompletnom medijumu za kultivaciju ćelija tokom 3 dana i 7 dana. Na taj način dobijeni su trodnevni i sedmodnevni KM legure Ti (Ti-KM) i modifikovanih legura Ti (Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM). Ispitivani su metabolička aktivnost i proliferativni kapacitet PBMNC.

#### 4.4.1. Efekat KM Ti legura na metaboličku aktivnost stimulisanih humanih PBMNC

Rezultati ispitivanja metaboličke aktivnosti PHA-stimuliranih PBMNC kultiviranih 72 sata u prisustvu 50% i 25% trodnevnog KM su prikazani na grafikonu 19. Uočava se da nije bilo statističke značajne razlike u delovanju KM modifikovanih legura (Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM) u poređenju sa KM kontrolne legure (Ti-KM) odnosno kontrolnim (nekondicioniranim) medijumom. Takođe, nije bilo razlike u delovanju 50% KM naspram 25% KM. Metabolička aktivnost svih ispitivanih uzoraka je bila oko 80% u poređenju sa kontrolnim ćelijama (kultiviranim u nekondicioniranom medijumu).

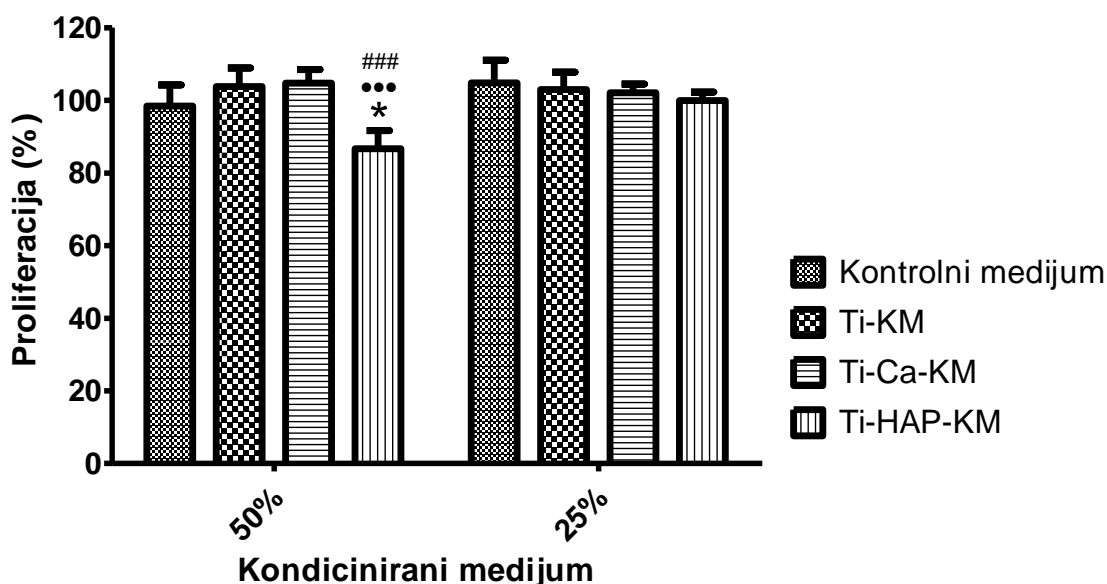


**Grafikon 19. Uticaj KM Ti legura na metaboličku aktivnost stimuliranih PBMNC.**

Metabolička aktivnost je ispitivana primenom MTT testa. PHA-stimulirane PBMNC su kultivirane 72 sata u prisustvu 50% i 25% trodnevnog KM, kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su izraženi kao relativna vrednost u odnosu na kontrolne ćelije (bez KM) čija je redukcija MTT posmatrana kao vrednost 100% metaboličke aktivnosti. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

#### 4.4.2. Efekat KM Ti legura na proliferativnu aktivnost stimulisanih humanih PBMNC

U narednom koraku je ispitivana proliferacija PHA-stimulisanih PBMNC kultivisanih u istim uslovima, u prisustvu 50% i 25% trodnevnog KM (Ti-KM, Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM). U prisustvu 50% KM pokazano je statistički značajno inhibitorno delovanje Ti-HAP-KM na proliferaciju PBMNC u poređenju sa kontrolama (Ti-KM i PBMNC kultivisanim u nekondicioniranom medijumu) i Ti-Ca-KM. Istovremeno, 25% trodnevni KM svih testiranih uzoraka nije statistički značajno menjao proliferaciju PBMNC, odnosno inhibitorni efekat KM je izostao (Grafikon 20).



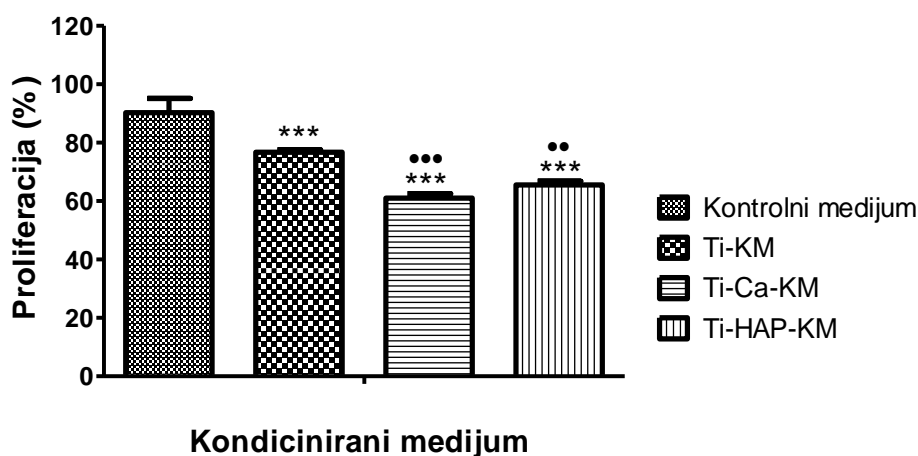
**Grafikon 20. Uticaj KM Ti legura na proliferaciju stimulisanih PBMNC.**

Proliferativna aktivnost je ispitivana primenom testa ugradnje 3[H<sup>+</sup>]-timidina nakon 72 sata kultivacije PHA-stimulisanih PBMNC u prisustvu 50% i 25% trodnevnog KM testiranih legura kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su izraženi kao relativna vrednost u odnosu na kontrolne ćelije (bez KM) čija je proliferacija posmatrana kao 100%. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

\* $p \leq 0.05$  u poređenju sa kontrolnim ćelijama (bez KM); \*\* $p \leq 0.01$  u poređenju sa Ti-KM;

### $p \leq 0.01$  u poređenju Ti-Ca-KM.

Ovaj segment je dopunjen i analizom delovanja sedmodnevnog KM na proliferaciju PHA-stimuliranih PBMNC u prisustvu 50% KM (Ti-KM, Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM). Dobijeni rezultati, prikazani na grafikonu 21, su pokazali da 50% Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM statistički značajno inhibiraju proliferaciju PBMNC u poređenju sa KM kontrolne legure (Ti-KM). Takođe, sedmodnevni KM sva tri testirana uzorka su, u primenjenoj koncentraciji, statistički značajno inhibirali proliferaciju PBMNC u poređenju sa kontrolnim ćelijama (kultivisanim u nekondicioniranom medijumu).



**Grafikon 21. Uticaj KM Ti legura na proliferaciju stimuliranih PBMNC.**

Proliferativna aktivnost je ispitivana primenom testa ugradnje 3[H<sup>+</sup>]-timidina nakon 72 sata kultivacije PHA-stimuliranih PBMNC u prisustvu 50% sedmodnevnog KM testiranih legura kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su izraženi kao relativna vrednost u odnosu na kontrolne ćelije (bez KM) čija je proliferacija posmatrana kao 100%. Prikazani su rezultati (X±SD) jednog reprezentativnog eksperimenta.

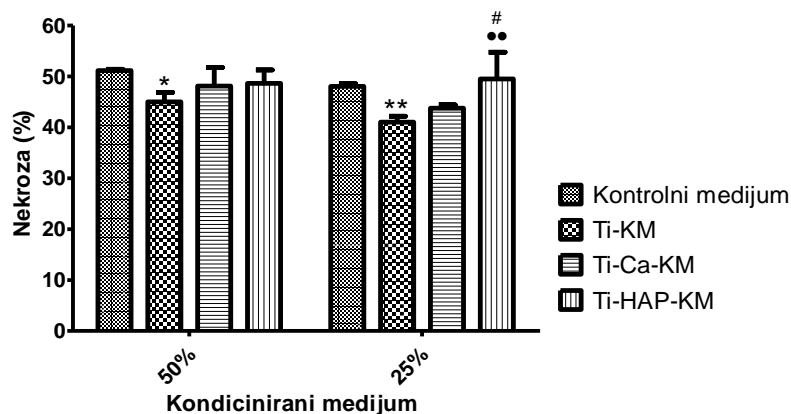
\*\*\*p≤0.005 u poređenju sa kontrolnim ćelijama (bez KM); \*\*p≤0.01; ••p≤0.005 u poređenju sa Ti-KM.

#### **4.4.3. Efekat KM Ti legura na nekrozu i apoptozu stimulisanih humanih PBMNC**

U cilju ispitivanja uzroka inhibitornog delovanja Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM na proliferaciju PBMNC, u narednim eksperimentima su izmerene nekroza i apoptoza u istim eksperimentalnim uslovima (72-satna kultivacija u prisustvu 50% i 25% trodnevnog KM). Nekroza i apoptoza su određivane obeležavanjem ćelija PI a ćelije su analizirane pomoću protočne citofluorimetrije.

Primenom navedenih metoda, detektovan je značajan broj nekrotičnih PBMNC (oko 50%) u svim grupama testiranih uzoraka (Grafikon 22). Takođe, dobijeni rezultati su pokazali da Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM u 50% koncentraciji ne utiču na nekrozu. Sa druge strane, zapaženo je da Ti-HAP-KM primenjen u manjoj (25%) koncentraciji značajno stimuliše nekrozu u poređenju sa Ti-Ca-KM i Ti-KM. Interesantno je da sam Ti-KM u obe testirane koncentracije značajno inhibira nekrozu u poređenju sa kontrolnim ćelijama (Grafikon 22).

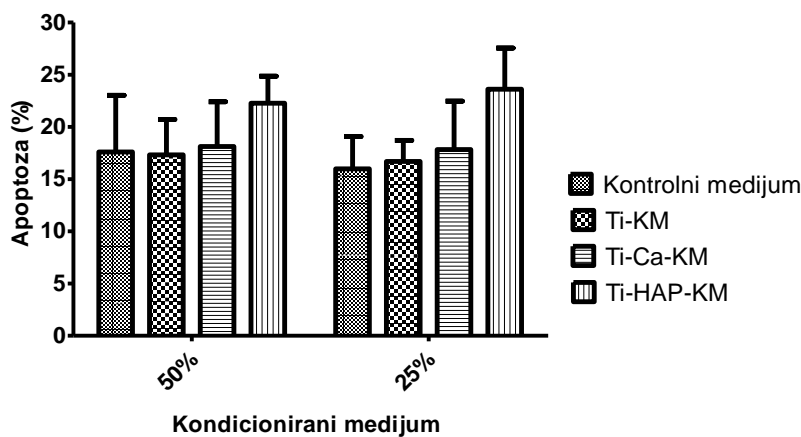
Nasuprot značajnom procentu nekrotičnih ćelija, broj ćelija u kasnoj apoptozi (u svim grupama) je bio manji od 25%. Nije detektovana statistički značajna razlika u delovanju testiranih koncentracija (50% i 25%) ispitivanih uzoraka (Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM) na procenat apoptotičnih PBMNC u poređenju sa kontrolnim uzorcima (Grafikon 23).



**Grafikon 22. Uticaj KM Ti legura na nekrozu stimuliranih PBMNC.**

Nekroza je ispitivana obeležavanjem ćelija PI, primenom protočne citofluorimetrije nakon 72 sata kultivacije PHA-stimuliranih PBMNC u prisustvu 50% i 25% trodnevnog KM testiranih legura kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$  u poređenju sa kontrolnim ćelijama (bez KM); •• $p \leq 0.01$  u poređenju sa Ti-KM; # $p \leq 0.05$  u poređenju Ti-Ca-KM.



**Grafikon 23. Uticaj Ti legura na apoptozu stimuliranih PBMNC.**

Apoptoza je ispitivana obeležavanjem ćelija PI, primenom protočne citofluorimetrije nakon 72-satne kultivacije PHA-stimuliranih PBMNC u prisustvu 50% i 25% trodnevnog KM testiranih legura kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

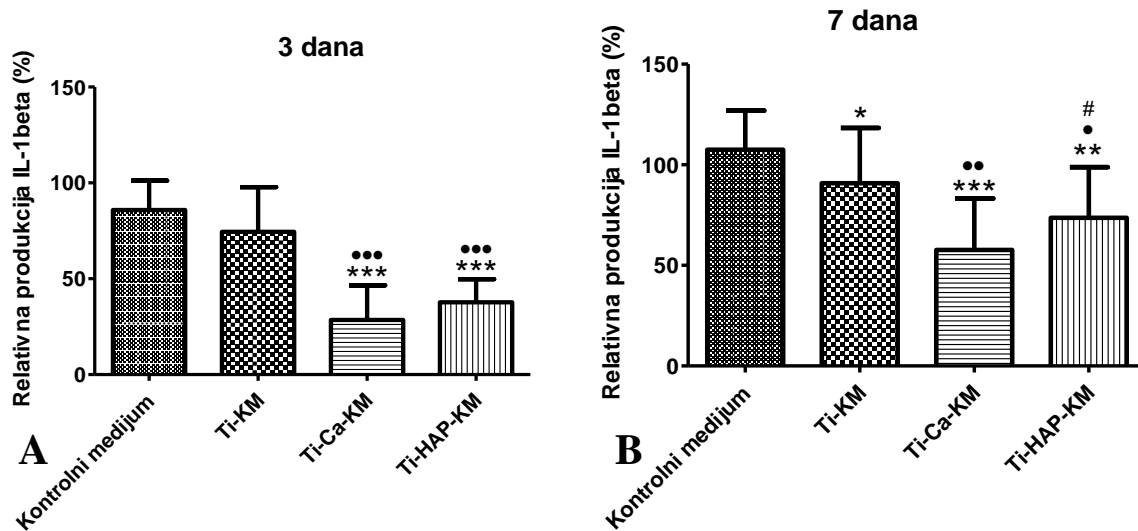
## **4.5. Ispitivanje imunomodulacijskih svojstava Ti legura**

U nameri da se detaljnije istraži inhibitorni efekat KM testiranih legura na proliferaciju PBMNC, sledeći cilj ispitivanja je bio ispitivanje produkcije citokina od strane ovih ćelija. Produkcija citokina je određivana nakon 72 sata kultivacije PHA-stimulisanih PBMNC u prisustvu 50% KM (Ti-KM, Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM)

### **4.5.1. Efekat KM Ti legura na produkciju citokina od strane stimulisanih PBMNC**

Produkcija citokina sa pro-inflamacijskim delovanjem (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) je prva ispitana, a paralelno je ispitivano delovanje trodnevnog (Grafikon 24A) i sedmodnevnog KM (Grafikon 24B). Pokazano je da 50% Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM statistički značajno inhibiraju produkciju IL-1 $\beta$  u poređenju sa Ti-KM i kontrolnim medijumom. Inhibitorni efekat je zabeležen u prisustvu kako trodnevnog tako i sedmodnevnog KM.

## IL-1 $\beta$



**Grafikon 24. Uticaj KM Ti legura na produkciju IL-1 $\beta$  od strane stimulisanih PBMNC.**

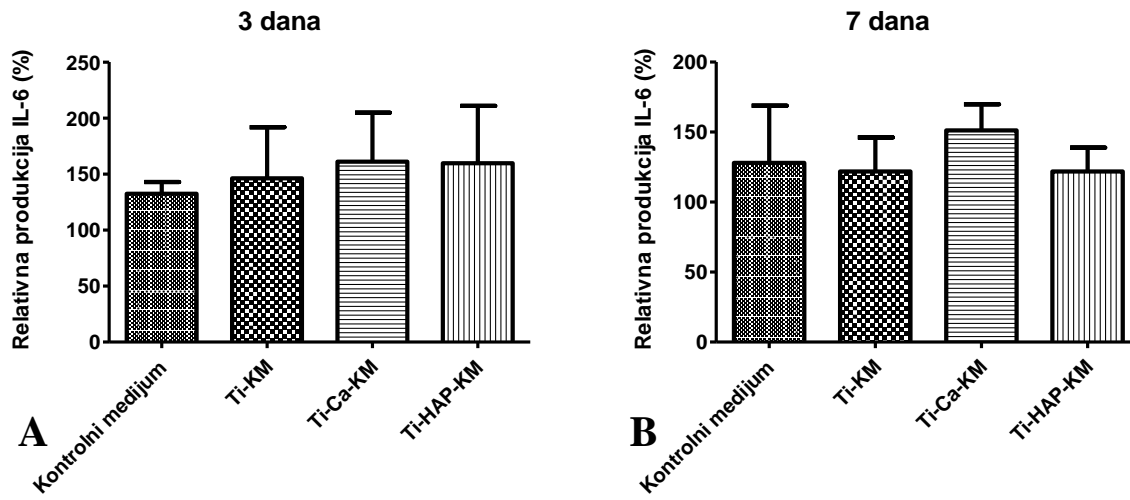
Produkcija citokina je određivana u supernatantima kultura PHA-stimulisanih PBMNC nakon 72 sata kultivacije u prisustvu 50% trodnevnog (A) i sedmodnevnog (B) KM testiranih legura primenom protočne citofluorimetrije sa mikropartikulama obloženim antitelima na citokine kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti nivoa citokina u poređenju sa njihovom produkcijom u kontrolnim ćelijama (mononukleari koji su stimulisani sa PHA i svežim medijumom) koja je posmatrana kao 100%. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.005$  u poređenju sa kontrolnim ćelijama (bez KM); • $p \leq 0.05$ ; •• $p \leq 0.01$ ; ••• $p \leq 0.005$  u poređenju sa Ti-KM; # $p \leq 0.05$  u poređenju Ti-Ca-KM.

Istovremeno, 50% Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM nisu značajno menjali produkciju IL-6 u poređenju sa Ti-KM i kontrolnim medijumom (Grafikoni 25A i 25B). Modulatorni efekat na produkciju IL-6 nije zabeležen ni u prisustvu trodnevnog ni u prisustvu sedmodnevnog KM.



## IL-6

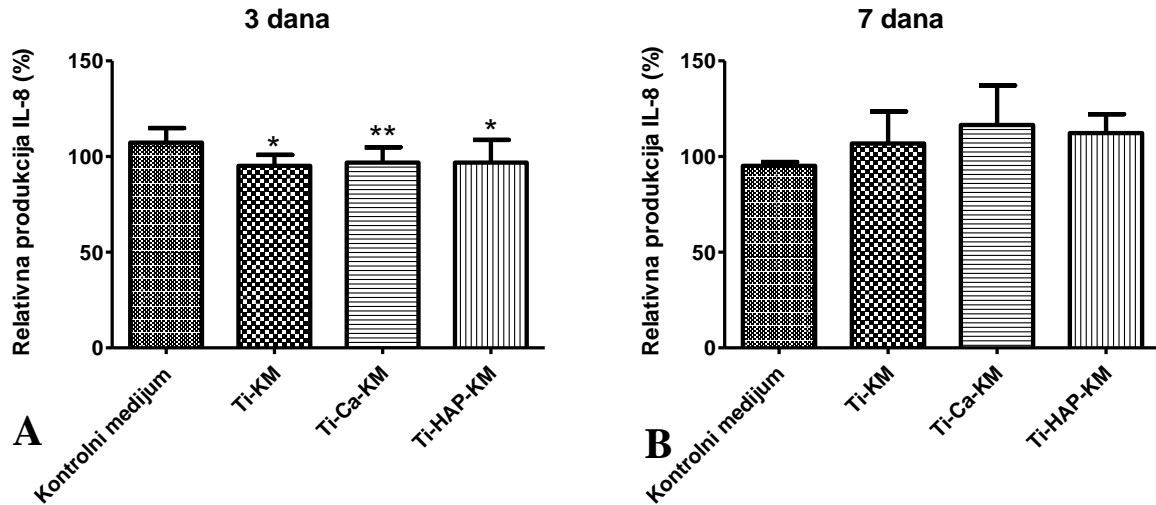


**Grafikon 25. Uticaj KM Ti legura na produkciju IL-6 od strane stimulisanih PBMNC.**

Produkcija citokina je određivana u supernatantima kultura PHA-stimuliranih PBMNC nakon 72 sata kultivacije u prisustvu 50% trodnevnog (A) i sedmodnevnog (B) KM testiranih legura protočne citofluorimetrije sa mikropartikulama obloženim antitelima na citokine kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti nivoa citokina u poređenju sa njihovom produkcijom u kontrolnim ćelijama (mononukleari koji su stimulirani sa PHA i svežim medijumom) koja je posmatrana kao 100%. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

Vrlo slično su 50% Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM delovali i na produkciju IL-8. Nisu značajno menjali produkciju IL-8 u poređenju sa Ti-KM, kako u prisustvu trodnevnog (Grafikon 26A), tako i u prisustvu sedmodnevnog KM (Grafikon 26B). Međutim, u poređenju sa kontrolnim medijumom, trodnevni KM svih ispitivanih legura je delovao inhibitory.

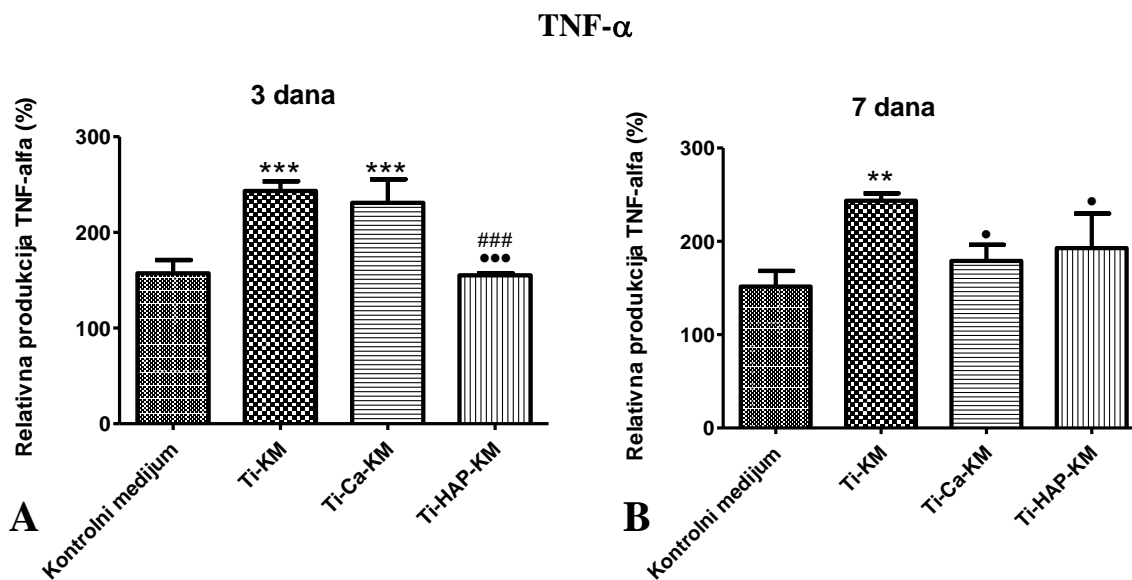
## IL-8



**Grafikon 26. Uticaj KM Ti legura na produkciju IL-8 od strane stimulisanih PBMNC.** Produkcija citokina je određivana u supernatantima kultura PHA-stimuliranih PBMNC nakon 72 sata kultivacije u prisustvu 50% trodnevnog (A) i sedmodnevnog (B) KM testiranih legura primenom protočne citofluorimetrije sa mikropartikulama obloženim antitelima na citokine kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti nivoa citokina u poređenju sa njihovom produkcijom u kontrolnim ćelijama (mononukleari koji su stimulirani sa PHA i svežim medijumom) koja je posmatrana kao 100%. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$  u poređenju sa kontrolnim ćelijama (bez KM).

Ispitivanja delovanja 50% Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM na produkciju TNF- $\alpha$  su prikazana na grafikonu 27. Pokazano je da trodnevni Ti-HAP-KM statistički značajno inhibira produkciju TNF- $\alpha$  i u poređenju sa kontrolnom legurom (Ti-KM) i u poređenju sa Ti-Ca-KM (Grafikon 27A). U slučaju sedmodnevnih KM pokazano je da KM obe modifikovane legure (Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM) deluje inhibitory u poređenju sa Ti-KM (Grafikon 27B). KM kontrolne legure (i trodnevni i sedmodnevni) statistički značajno stimulišu produkciju TNF- $\alpha$  u poređenju sa kontrolnim medijumom.



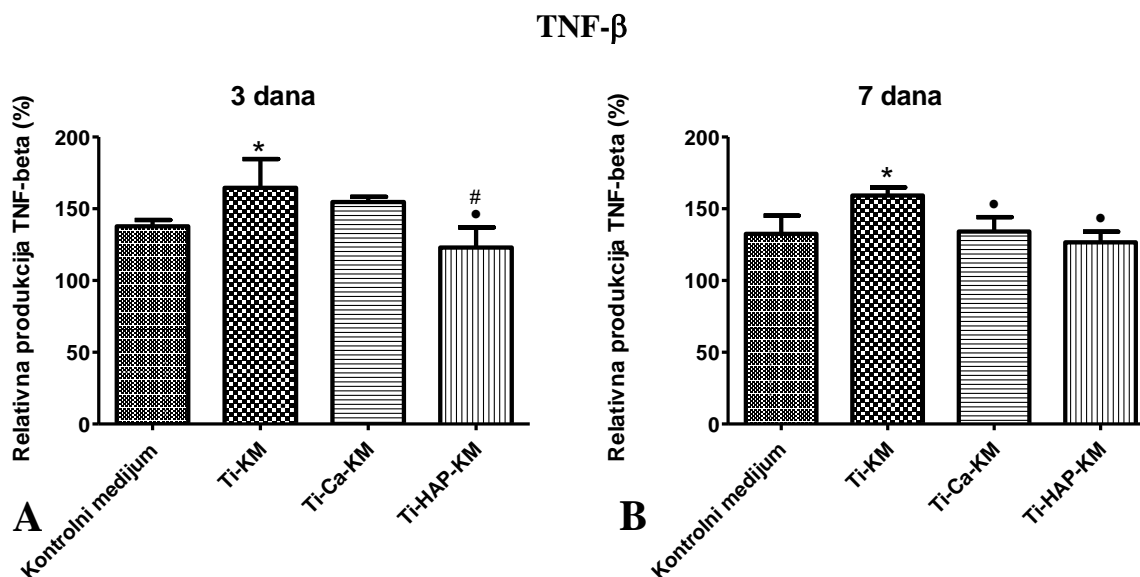
**Grafikon 27. Uticaj KM Ti legura na produkciju TNF- $\alpha$  od strane stimulisanih PBMNC.**

Produkcija citokina je određivana u supernatantima kultura PHA-stimulisanih PBMNC nakon 72 sata kultivacije u prisustvu 50% trodnevnog (A) i sedmodnevnog (B) KM testiranih legura primenom protočne citofluorimetrije sa mikropartikulama obloženim antitelima na citokine kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti nivoa citokina u poređenju sa njihovom produkcijom u kontrolnim ćelijama (mononukleari koji su stimulisani sa PHA i svežim medijumom) koja je posmatrana kao 100%. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

\*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.005$  u poređenju sa kontrolnim ćelijama (bez KM); • $p \leq 0.05$ ; •• $p \leq 0.005$  u poređenju sa Ti-KM; ### $p \leq 0.005$  u poređenju Ti-Ca-KM.

Na kraju segmenta ispitivanja citokina sa pro-inflamacijskim delovanjem analiziran je uticaj KM legura na produkciju TNF- $\beta$ . Pokazano je da 50% trodnevni Ti-HAP-KM statistički značajno inhibira produkciju TNF- $\beta$  u poređenju i sa Ti-KM i sa Ti-Ca-KM (Grafikon 28A). Istovremeno, KM obe modifikovane legure (Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM) nakon sedmodnevnog kondicioniranja deluje inhibitorno na produkciju TNF- $\beta$  u poređenju

sa kontrolama (Grafikon 28B). Slično prethodnom zapažanju, uočava se da KM kontrolne legure (i trodnevni i sedmodnevni) statistički značajno stimulišu produkciju TNF- $\beta$  u poređenju sa kontrolnim medijumom.

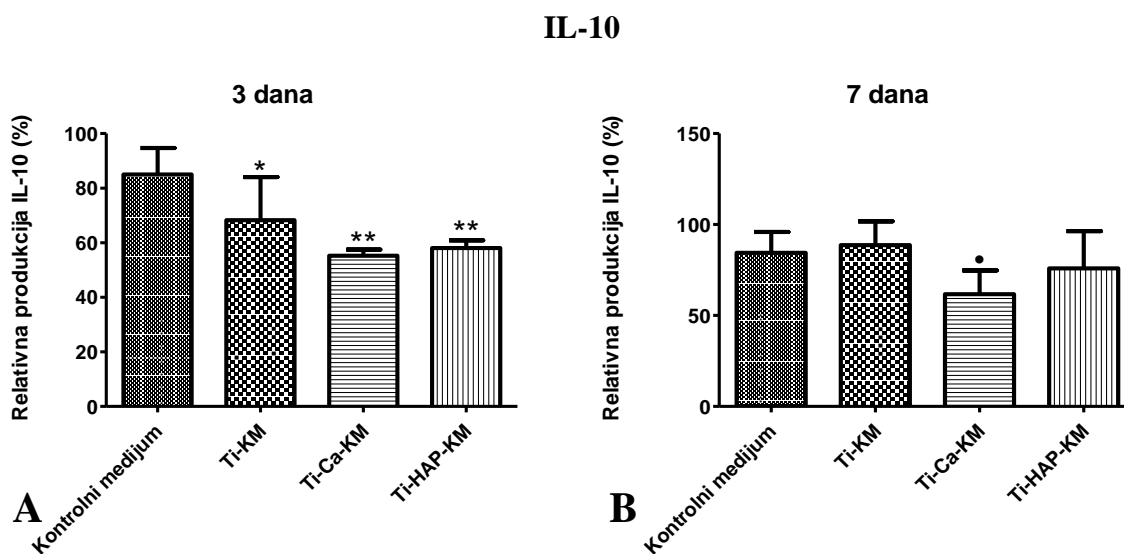


**Grafikon 28. Uticaj KM Ti legura na produkciju TNF- $\beta$  od strane stimulisanih PBMNC.**

Produkcija citokina je određivana u supernatantima kultura PHA-stimulisanih PBMNC nakon 72 sata kultivacije u prisustvu 50% trodnevnog (A) i sedmodnevnog (B) KM testiranih legura protočne citofluorimetrije sa mikropartikulama obloženim antitelima na citokine kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti nivoa citokina u poređenju sa njihovom produkcijom u kontrolnim ćelijama (mononukleari koji su stimulisani sa PHA i svežim medijumom) koja je posmatrana kao 100%. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

\* $p \leq 0.05$  u poređenju sa kontrolnim ćelijama (bez KM); • $p \leq 0.05$  u poređenju sa Ti-KM; # $p \leq 0.05$  u poređenju Ti-Ca-KM.

Ispitivanjima produkcije IL-10, citokina koji dominantno ispoljava anti-inflamacijsko delovanje, pokazano je da 50% trodnevni Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM statistički značajno inhibiraju produkciju IL-10 u poređenju sa kontrolnim medijumom ali ne i sa kontrolnom legurom (Grafikon 29A). U slučaju sedmodnevnog KM, inhibitorski efekat na produkciju IL-10 je zabeležen samo u prisustvu Ti-Ca-KM u poređenju sa KM kontrolne legure (Grafikon 29B). Dobijeni rezultati su prikazani na grafikonu 29.



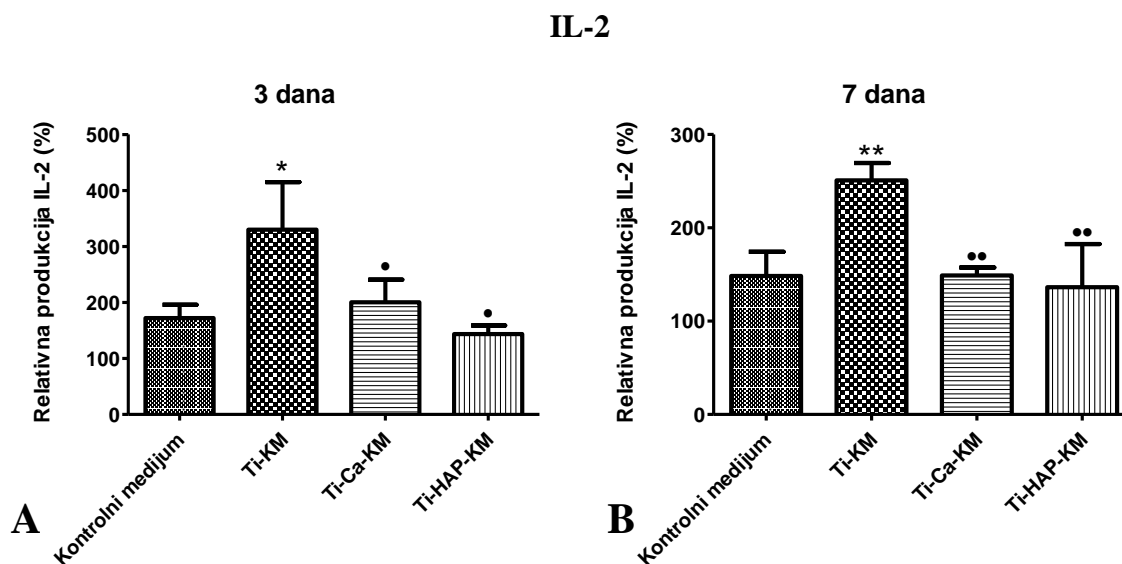
**Grafikon 29. Uticaj KM Ti legura na produkciju IL-10 od strane stimulisanih PBMNC.**

Produkcija citokina je određivana u supernatantima kultura PHA-stimulisanih PBMNC nakon 72 sata kultivacije u prisustvu 50% trodnevnog (A) i sedmodnevnog (B) KM testiranih legura protočne citofluorimetrije sa mikropartikulama obloženim antitelima na citokine kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti nivoa citokina u poređenju sa njihovom produkcijom u kontrolnim ćelijama (mononukleari koji su stimulisani sa PHA i svežim medijumom) koja je posmatrana kao 100%. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$  u poređenju sa kontrolnim ćelijama (bez KM); • $p \leq 0.05$  u poređenju sa Ti-KM.

U finalnoj fazi ispitivanja uticaja Ti legura na funkcionalnu aktivnost PBMNC analizirana je produkcija citokina koji se povezuju sa aktivacijom Th populacija T limfocita: Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4, IL-5) i Th17 (IL-17).

Rezultati uticaja KM ispitivanih legura na produkciju IL-2 prikazani su na grafikonu 30. Zapaža se da, kako trodnevni (Grafikon 30A) tako i sedmodnevni (Grafikon 30B), KM modifikovanih legura (Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM) statistički značajno inhibiraju produkciju IL-2 u poređenju sa kontrolnom legurom (Ti-KM). Istovremeno, KM kontrolne legure (Ti-KM) deluje stimulatorno na produkciju IL-2 u poređenju sa kontrolnim medijumom.

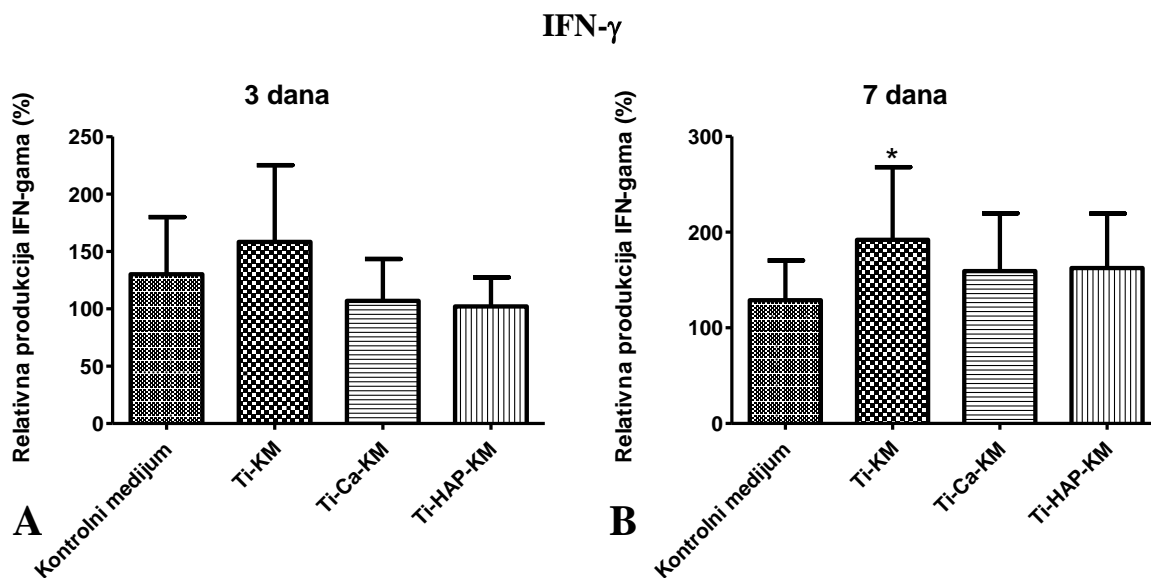


**Grafikon 30. Uticaj KM Ti legura na produkciju IL-2 od strane stimulisanih PBMNC.**

Produkcija citokina je određivana u supernatantima kultura PHA-stimuliranih PBMNC nakon 72 sata kultivacije u prisustvu 50% trodnevnog (A) i sedmodnevnog (B) KM testiranih legura primenom protočne citofluorimetrije sa mikropartikulama obloženim antitelima na citokine kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti nivoa citokina u poređenju sa njihovom produkcijom u kontrolnim ćelijama (mononukleari koji su stimulirani sa PHA i svežim medijumom) koja je posmatrana kao 100%. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$  u poređenju sa kontrolnim ćelijama (bez KM); • $p \leq 0.05$ ; •• $p \leq 0.01$  u poređenju sa Ti-KM.

Kada je analizirana produkcija IFN- $\gamma$ , pokazano je da trodnevni KM (Grafikon 31A) i sedmodnevni KM (Grafikon 31B) modifikovanih legura Ti (Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM) ne menjaju značajno produkciju IFN- $\gamma$  u poređenju sa KM kontrolne legure odnosno kontrolnim medijumom. Međutim, sedmodnevni KM kontrolne legure (Ti-KM) deluje stimulatorno na produkciju IFN- $\gamma$  u poređenju sa kontrolnim medijumom.

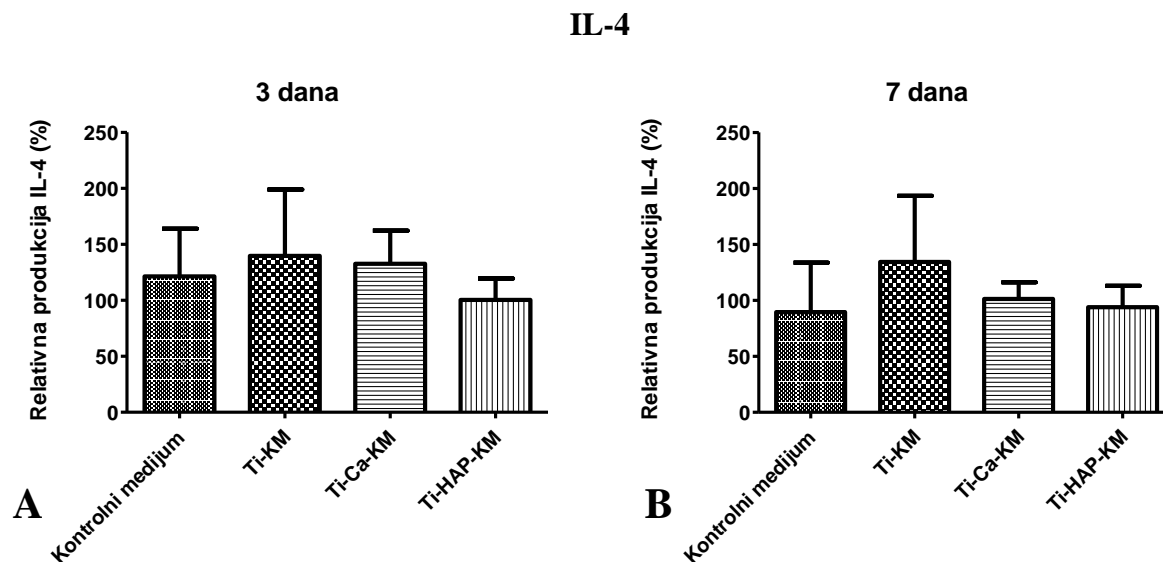


**Grafikon 31. Uticaj KM Ti legura na produkciju IFN- $\gamma$  od strane stimulisanih PBMNC.**

Produkcija citokina je određivana u supernatantima kultura PHA-stimulisanih PBMNC nakon 72 sata kultivacije u prisustvu 50% trodnevnog (A) i sedmodnevnog (B) KM testiranih legura primenom protočne citofluorimetrije sa mikropartikulama obloženim antitelima na citokine kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti nivoa citokina u poređenju sa njihovom produkcijom u kontrolnim ćelijama (mononukleari koji su stimulisani sa PHA i svežim medijumom) koja je posmatrana kao 100%. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

\* $p \leq 0.05$  u poređenju sa kontrolnim ćelijama (bez KM).

Kondicionirani medijumi modifikovanih legura (Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM) sakupljeni nakon 3 dana (Grafikon 32A) odnosno 7 dana (Grafikon 32B) nisu značajno menjali produkciju Th2 citokina IL-4 u kulturama PHA-stimulisanih PBMNC u poređenju sa kontrolnom legurom (Ti-KM) odnosno kontrolnim ćelijama (kultivisanim u kontrolnom medijumu).

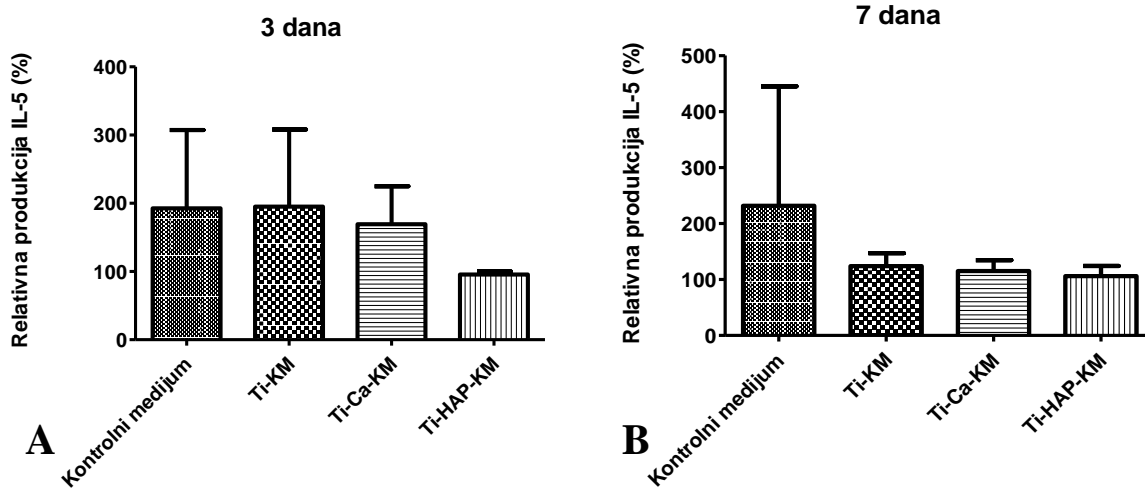


**Grafikon 32. Uticaj KM Ti legura na produkciju IL-4 od strane stimulisanih PBMNC.** Produkcija citokina je određivana u supernatantima kultura PHA-stimulisanih PBMNC nakon 72 sata kultivacije u prisustvu 50% trodnevnog (A) i sedmodnevnog (B) KM testiranih legura primenom protočne citofluorimetrije sa mikropartikulama obloženim antitelima na citokine kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti nivoa citokina u poređenju sa njihovom produkcijom u kontrolnim ćelijama (mononukleari koji su stimulisani sa PHA i svežim medijumom) koja je posmatrana kao 100%. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

Slični rezultati su dobijeni i u ispitivanjima uticaja Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM na produkciju IL-5. Naime, trodnevni KM (Grafikon 33A) i sedmodnevni KM (Grafikon 33B) modifikovanih Ti legura nisu značajno uticali na produkciju IL-5 u poređenju sa kontrolama (KM kontrolne legure i kontrolnim medijumom).



## IL-5

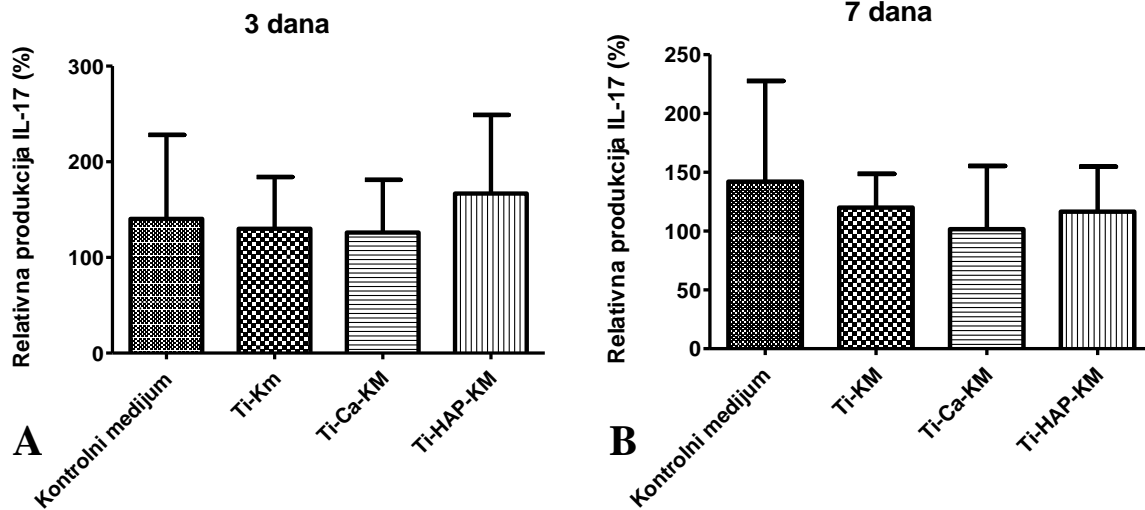


**Grafikon 33. Uticaj KM Ti legura na produkciju IL-5 od strane stimulisanih PBMNC.**

Produkcija citokina je određivana u supernatantima kultura PHA-stimuliranih PBMNC nakon 72 sata kultivacije u prisustvu 50% trodnevnog (A) i sedmodnevnog (B) KM testiranih legura primenom protočne citofluorimetrije sa mikropartilama obloženim antitelima na citokine kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti nivoa citokina u poređenju sa njihovom produkcijom u kontrolnim ćelijama (mononukleari koji su stimulirani sa PHA i svežim medijumom) koja je posmatrana kao 100%. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

U daljoj analizi produkcije citokina, ispitivana je produkcija Th17 citokina. Dobijeni rezultati su pokazali da KM modifikovanih legura (Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM) sakupljeni nakon 3 dana (Grafikon 34A) odnosno 7 dana (Grafikon 34B) nisu značajno menjali produkciju IL-17 u kulturama PHA-stimuliranih PBMNC u poređenju sa kontrolnom legurom (Ti-KM) odnosno kontrolnim ćelijama (kultivisanim u kontrolnom medijumu).

## IL-17



**Grafikon 34. Uticaj KM Ti legura na produkciju IL-17 od strane stimulisanih PBMNC.**

Produkcija citokina je određivana u supernatantima kultura PHA-stimulisanih PBMNC nakon 72 sata kultivacije u prisustvu 50% trodnevnog (A) i sedmodnevnog (B) KM testiranih legura primenom ELISA testova kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti nivoa citokina u poređenju sa njihovom produkcijom u kontrolnim ćelijama (mononukleari koji su stimulisani sa PHA i svežim medijumom) koja je posmatrana kao 100%. Prikazani su rezultati ( $X \pm SD$ ) jednog reprezentativnog eksperimenta.

## 5. DISKUSIJA

Titan i njegove legure se upotrebljavaju kao materijal za implantate u stomatologiji i ortopediji zahvaljujući dobrim fizičkim i hemijskim svojstvima, kao i pokazanoj biokompatibilnosti [30]. Međutim, korozivna svojstva titana i njegovih legura u rastvorima kiselina ili baza i u biološkim tečnostima nisu zadovoljavajuća. Takođe, ovi materijali pokazuju visok koeficijent trenja i nisku otpornost na habanje, kao i nisku rezistenciju na abraziju [31].

Sve ove osobine su navele istraživače da tragaju za modifikacijama površine legura titana, posebno onih legura koje se koriste u oralnoj implantologiji i ortopediji. Promena površine titana se u implantologiji sprovodi da bi se poboljšala biokompatibilnost, povećala površina za povezivanje implantata i kosti, poboljšao stepen oseintegracije implantata, kao i da bi se smanjili negativni efekti implantata po okolno tkivo i negativni uticaji na imunski sistem nosilaca dentalnih implantata. Pokazano je da oblaganje legura titana hidroksiapatitom ne menja biokompatibilnost titana. Hidroksiapatit je sličan biološkom apatitu i zbog toga povećava bioaktivnost implantata i vezivanje implantata za kost. Hidroksiapatitna obloga svojom hrapavošću poboljšava stabilnost implantata, indukuje osteogenu diferencijaciju humanih mezenhimalnih stem ćelija [38,69,70], pomaže urastanje novog koštanog tkiva [71] i značajno smanjuje habanje koštanog tkiva u direktnom kontaktu sa implantatom [72]. U ovom kontekstu, HAP se primenjuje vrlo često zbog dobre biokompatibilnosti. Međutim, bioaktivnost HAP prevlaka *in vivo* značajno zavisi od primenjene metode za njihovo nanošenje [39].

Tako, titan obložen hidroksiapatitom metodom raspršivanja plazme pokazuje varijacije u kvalitetu HAP sloja uključujući neravnomernosti u debljini i gustini nanetog sloja, nedovoljnu jačinu adhezije između metala i obloge. Može doći i do promena u strukturnim (fizičkim i hemijskim) svojstvima obloge tokom nanošenja. Postupak oblaganja

raspršivanjem plazme može da utiče i na promenu u sastavu HAP faze, iz kristalne strukture u amorfnu formu [39,73]. Upotreba hidroksiapatitom obloženih legura titana u kliničkoj praksi pre svega zavisi od stabilnosti hidroksiapatitne prevlake i zbog toga su i dalje u toku istraživanja tehnika oblaganja koje poboljšavaju osobine obloženog titana, odnosno koje treba da omoguće stvaranje stabilnih prevlaka sa visokom adhezijom hidroksiapatita na površinu titana [74].

U ovom radu je ispitivana legura u kojoj je HAP obloga nanešena inovativnom metodom raspršivanja plazmom koja omogućava izuzetnu snagu adhezije hidroksiapatita na Ti legure [41]. Jačina adhezije je iznosila 60.5 MPa, što je omogućilo stvaranje stabilnih obloga hidroksiapatita sa hrapavom površinom i sa mikro i nano strukturom. Mada će detaljna analiza mikrostrukture ovako pripremljene obloge biti predmet budućih istraživanja, istraživanja u ovom radu pokazuju da je HAP sloj veoma stabilan, što predstavlja ključni parametar za uspešnu oseointegraciju.

Sa druge strane, pokazano je da hemijska obrada površine titana nagrizanjem natrijum hidroksidom, jonskom izmenom natrijuma kalcijumom i termalnom obradom dovodi do formiranja uniformnog bioaktivnog sloja na površini titana. Očekuje se da metal koji sadrži  $\text{Ca}^{2+}$  jone na svojoj površini pokazuje povećanu prijemčivost za stvaranje apatita. Titan tretiran sa NaOH,  $\text{CaCl}_2$  i zagrevanjem je pokazao efikasnost u odnosu na sposobnost formiranja apatita, visoku otpornost na habanje i otpornost na vlagu, što ovaj pristup čini podesnim za modifikaciju površine titana u implantologiji [75]. Takođe, prevlaka korišćena u ovom radu, dobijena sličnim tretmanom Ti legure, pokazala je da poseduje nano strukturu tankih zidova između međusobno povezanih pora koja je podesna za aplikaciju u implantologiji i depoziciju hidroksiapatita pomoću metode raspršivanja plazmom [40].

U ovom istraživanju su ispitivani direktna i indirektna citotoksičnost *in vitro*, kao i imunomodulacijsko dejstvo KM testiranih Ti legura na funkcionalne karakteristike PHA-stimulisanih PBMNC *in vitro*.

Ispitivanja biokompatibilnosti započeta su esejima citotoksičnosti *in vitro*, na ćelijskoj liniji mišjih fibroblasta (L929), prema aktuelnim kriterijumima ISO 10993-5. Citotoksičnost je verifikovana na osnovu redukcije vijabilnosti ćelija (MTT i morfološka analiza), smanjenju proliferacije ćelija i indukciji nekroze i apoptoze. Ispitivana je citotoksičnost nemodifikovane Ti legure (Ti), Ti legure modifikovane alkalnim nagrizanjem, jonskom izmenom i termalnim tretmanom (Ti-Ca) i Ti legure obložene hidroksiapatitom jednostrano (Ti-HAP) ili dvostrano (Ti-HAP2). U pojedinim eksperimentima su kao pozitivna kontrola korišćeni citotoksični diskovi nikla (Ni), dok su negativnu kontrolu predstavljali polistirenski diskovi i L929 ćelije kultivisane bez ispitivanih diskova. Tokom izvođenja eksperimenata HAP obloga na leguri titana je bila stabilna.

Dobijeni rezultati pokazuju da svi ispitivani uzorci Ti legure ispoljavaju određeni stepen citotoksičnosti. Morfološkom analizom L929 ćelija (svetlosnom mikroskopijom) je pokazano da Ti-HAP osim blage inhibicije rasta ne ispoljava značajnu citotoksičnost. Istovremeno, morfološki znaci citotoksičnosti su bili vidljivi na L929 ćelijama koje su se nalazile u blizini Ti-HAP2. Treba naglasiti da su znaci citotoksičnog delovanja primećeni na L929 ćelijama koje su bile u direktnom kontaktu (ispod) sa svim testiranim uzorcima osim polistirenskih diskova (negativnih kontrola).

Morfološka zapažanja su potvrđena primenom kvantitativnog testa vijabilnosti, na osnovu broja Tripan plavo pozitivnih L929 ćelija. Pokazano je statistički značajno inhibitorno delovanje Ti-HAP2 i Ti-HAP na vijabilnost testiranih ćelija.

Uticaj na vijabilnost je određivana i merenjem metaboličke aktivnosti L929, primenom MTT testa. Primenom ovog testa nije pokazana statistički značajna razlika u delovanju legura Ti čija površina je modifikovana (Ti-Ca i Ti-HAP) u poređenju sa legurom Ti čija površina nije modifikovana (Ti).

U cilju potvrde prethodnih rezultata ispitivan je i uticaj direktnog kontakta Ti, Ti-Ca i Ti-HAP na proliferaciju L929 ćelija primenom testa ugradnje 3[H<sup>+</sup>]-timidina. Kada je

proliferacija ćelija izražena kao relativna vrednost u odnosu na kontrolne ćelije pokazalo se da testirane legure statistički značajno stimulišu proliferaciju L929 ćelija. Direktni efekat ispitivanih legura Ti, Ti-Ca i Ti-HAP u kulturi bio je povećanje ćelijske proliferacije za 15-20%.

Ispitivanjima indirektnog uticaja (kondicioniranog medijuma) testiranih legura je potvrđen obrazac citotoksičnog delovanja ustanovljen direktnim testovima citotoksičnosti i vijabilnosti. Na osnovu ovog dela istraživanja, a polazeći od kriterijuma ISO 10993-5, nemodifikovana legura i jednostrano HAP-modifikovana legura su okarakterisane kao ne-citotoksične (redukcija vijabilnosti manja od 30%). Prema istim kriterijumima dvostrano HAP-modifikovana legura je klasifikovana u kategoriju blago-umereno citotoksična (redukcija vijabilnosti 30%-55%). Ovaj nalaz je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja drugih autora i publikovanim podacima o biokompatibilnosti hidroksiapatitnih obloga na titanski substrat [76,77].

Jedan od najvažnijih pokazatelja ćelijskog odgovora na stres je produkcija reaktivnih kiseoničnih jeduđenja (ROS). Prekomerna produkcija ROS-a može izazvati oštećenja ćelija. Zbog toga je merenje odgovora ćelije na oksidativni stres jedan od važnih parametara u proceni biokompatibilnosti dentalnih legura. Produkcija ROS je određivana primenom protočne citofluorimetrije, obeležavanjem L929 ćelija bojom DCFH-DA. Dobijeni rezultati pokazuju da nema razlike u nivou produkovanih ROS u ćelijama koje su inkubirane u prisustvu modifikovanih legura (Ti-Ca i Ti-HAP) u poređenju sa kontrolnom legurom (Ti). Istovremeno je detektovano statistički značajno povećanje produkcije ROS u poređenju sa kontrolnim ćelijama (bez prisustva legure). Tang i saradnici su pokazali da nanopartikule hidroksiapatita ne dovode do povećanja u produkciji ROS [78]. Treba naglasiti da su ovi autori istraživanja vršili na L-02 ćelijskoj liniji humanih hepatocita nakon 72 sata inkubacije dok su u okviru ove disertacije sprovedena na L929 ćelijama nakon 24 sata kontakta sa testiranim uzorcima. Literaturni podaci pokazuju da je povišena produkcija ROS-a dominantno pokazana u tumorskim ćelijama tretiranim hidroksiapatitom *in vitro*, ali ne i ćelijskim linijama koje su nastale iz normalnih (tumorski neizmenjenih) ćelija [78]. Novija

istraživanja pokazuju da nanopartikule hidroksiapatita smanjuju ćelijsku proliferaciju u malignim ćelijama [78,79] dok je njihov efekat na normalne ćelije u kulturi zanemarljiv [78].

Međutim, analizom srednjeg inteziteta fluorescence uočava se čak statistički značajno manja produkcija ROS u L929 ćelijama inkubiranim u prisustvu Ti-HAP u poređenju sa ćelijama inkubiranim u prisustvu Ti-Ca, Ti kao i kontrolnim ćelijama. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima istraživanja Fouada i sar. koji pokazuju da oblaganje titanovih implantata hidroksiapatitom može da inhibira stvaranje kiseoničnih i nitrokiseoničnih jedinjenja i da olakša proces zarastanja nakon ugradnje implantata [80].

Povećanje oksidativnog stresa koje je detektovano u okviru istraživanja ove disertacije nije bilo praćeno stimulacijom citopatogenih promena na testiranim ćelijama. Modifikovane Ti legure ne utiču statistički značajno na nekrozu L929 ćelija u poređenju sa kontrolnom legurom odnosno kontrolnim ćelijama. Ispitivanja produkcije LDH, kao indirektna mere nekroze usled gubitka integriteta ćelijske membrane pokazuju da su produkcija LDH i procenat citotoksičnosti L929 ćelija nakon kontakta sa Ti legurama u nivou kontrolnih ćelija. Drugim rečima, merenje parametara nekroze (nivo LDH u ćelijskoj kulturi, kao i bojenje kultivisanih ćelija propidium jodidom) potvrđuju nisku citotoksičnost ispitivanih legura titana.

Efekti ispitivanih legura koji rezultiraju povišenom produkcijom ROS-a bez citopatogenih efekata mogu ukazivati na to da ovako modifikovane legure ne utiču na odbrambenu moć ćelija od oštećenja indukovanih oksidativnim stresom odnosno slobodnim radikalima. Naime, iako su mnoge studije pokazale da nanopartikule hidroksiapatita mogu indukovati toksičnost putem povećanja produkcije ROS-a, pokazalo se da ćelije poseduju snažan mehanizam odbrane od oksidativnog stresa kojim mogu sprečiti kaskadu oštećenja pod uticajem viška ROS-a. Među "čuvarima ćelije" se ističu mitohondrijalni enzim superoksid dismutaza koji predstavlja prvu liniju odbrane od antioksidanasa. Ovi enzimi štite ćeliju od mogućih oštećenja izazvanih povišenom produkcijom ROS-a [81].

Ispitujući mehanizme citotoksičnog delovanja legura Ti testirali smo i uticaj KM Ti legura na L929 ćelije. Pokazano je da nerazblaženi KM Ti legura (Ti-KM, Ti-HAP-KM i Ti-HAP2-KM) indukuje nekrozu L929 ćelija. Najveća nekroza je zabeležena delovanjem KM pripremljenog kondicioniranjem dvostrano HAP-modifikovane legure. Ispitivanjima efekta KM na apoptozu L929 ćelija pokazano je da niže koncentracije dvostrano HAP-modifikovane legure indukuju veći stepen apoptoze L929 ćelija. Ovi nalazi su bili u saglasnosti sa rezultatima da je inhibicija proliferacije najveća kada su L929 ćelije kultivisane u prisustvu KM dvostrano HAP-modifikovane legure. Istovremeno, svi testirani KM su pokazali veći stepen inhibicije proliferacije ćelija u poređenju sa nivoom citotoksičnosti koji je detektovan primenom testova za nekrozu/apoptozu.

Dobijeni fenomen, da veće koncentracije Ti-HAP2-KM snižavaju apoptozu, dok je nekroza L929 ćelija zavisna od koncentracije bi mogao da se objasni činjenicom da će ćelije aktivirane da uđu u apoptozu, u uslovima kada je nivo unutarćelijske energije nizak, kao što je to slučaj u uslovima redukcije adenozin trifosfata (ATP-a), ući u nekrozu [82]. Imajući na umu ovu spoznaju, može se pretpostaviti da veća koncentracija toksičnih jedinjenja u medijumu blokira generisanje mitohondrijalnog ili glikolitičkog ATP-a i izaziva nekrozu. Kada je koncentracija toksičnih jedinjenja niža, koncentracije ATP su dovoljne da omogućе izvođenje programa apoptoze [83]

Očigledno je da su mehanizmi citotoksičnosti različiti u zavisnosti od karakteristika legure koja je testirana. Blaga citotoksičnost neobloženih Ti legura, koja je poznata i već opisana u literaturi [84] može biti posledica oslobađanja citotoksičnih jona Ti, Al i V [84,85]. Oslobađanje ovih jona je obično u koncentracijama koje su ispod citotoksičnih nivoa, zbog stvaranja zaštitnog sloja Ti-oksida [84–86]. Međutim, ne može se isključiti sinergističko delovanje ovih jona pojedinačno prisutnih u subtoksičnim koncentracijama. Jone Ti, Al i V mogu otpuštati i uzorci legure titana obloženi hidroksiapatitom.

Citotoksičnost može biti izazvana i hidroksiapatitnim oblogama. Kristalni oblik hidroksiapatita nije citotoksičan, jer se teško rastvara u vodenim rastvorima. I rezultati ove



disertacije su u skladu sa ovim zapažanjima i pokazuju da KM dobijen kondicioniranjem hidroksiapatita ne menja metaboličku aktivnost L929 ćelija. Rezultati drugih autora, dobijeni ispitivanjima na HepG2 ćelijama, pokazuju da hidroksiapatitne nanostrukturne forme mogu biti citotoksične u izvesnom stepenu, jer indukuju oksidativni stres i sledstvene citopatogene efekte koji su posledica indukcije nekroze i apoptoze [87].

Najizraženiji citotoksični efekat u okviru ovog istraživanja detektovan je u direktnom dejstvu HAP dvostrano obložene legure titana. Pretpostavka je da bi ovaj efekat mogao biti indukovano delovanjem amorfnih formi obloge, uključujući CaO, tri i tetrakalcijum fostat. Ove forme koje se javljaju tokom primenjenog postupka raspršivanja plazme pri nanošenju obloga [41,88] su rastvorljive u vodenim rastvorima [89]. Pokazano je da je među ovim formama CaO najrastvorljivije jedinjenje koje se ujedno ne smatra biokompatibilnim [89–91]. Kalcijum oksid u vodi formira  $\text{Ca(OH)}_2$ . To je jedan od razloga zbog kojih je ispitivano da li je KM pripremljen od  $\text{Ca(OH)}_2$  suspenzije citotoksičan. Rezultati ispitivanja pokazuju da je ovaj KM citotoksičan u nivou koji je pokazan za  $\text{Ca(OH)}_2$  nanopartikule [92] ali je stepen citotoksičnosti bio značajno manji u poređenju sa KM od HAP uzoraka.

Postavilo se pitanje da li kondicioniranje utiče na citotoksičnost HAP-modifikovanih legura Ti? Da bi se odgovorilo na ovo pitanje najpre je Ti-HAP2 kondicioniran 24 sata u medijumu, a potom je ispitano delovanje ovako spremljenog uzorka u testu direktne citotoksičnosti na L929 ćelijama. Ista procedura je primenjena i za nemodifikovanu leguru i za kontrolne uzorke. Dobijeni rezultati, kako u testu direktne citotoksičnosti tako i u testu indirektno citotoksičnosti pokazuju da kondicioniranje značajno smanjuje citotoksični efekat HAP-modifikovanih legura. Citotoksičnost dvostrano modifikovane legure, detektovana MTT testom, je nakon kondicioniranja smanjena na nivo citotoksičnosti koji je prema kriterijumima ISO 10993-5 prihvatljiv. Istovremeno, dodatno kondicioniranje testiranih uzoraka u trajanju od 7 dana nije dovelo do daljeg smanjenja citotoksičnog efekta. Dobijeni rezultati da kondicioniranje smanjuje citotoksičnost su u saglasnosti sa hipotezom da solubilne komponente HAP obloge mogu biti odgovorne za efekat citotoksičnosti. Drugim rečima, citotoksičnost se može značajno smanjiti do necitotoksičnog nivoa prethodnim

kondicioniranjem u medijumu za kulturu ćelija. Polazeći od ovih zapažanja, moglo bi se zaključiti da bi koristan metod u smanjivanju citotoksičnosti HAP obloženih metalnih legura, pre njihove implantacije *in vivo*, bio njihovo kondicioniranje u vodi. Ovom procedurom bi se mogle ukloniti rastvorljive toksične komponente [83]. Međutim, u tom cilju bilo bi neophodno određivati i koncentracije Ca koje se oslobađaju u medijum tokom kondicioniranja kao i uraditi adekvatnu karakterizaciju HAP obloga primenom Ožeeve spektroskopije.

U finalnoj fazi istraživanja ispitivana je moguća uloga jona  $Ca^{2+}$  u citotoksičnom delovanju legura Ti čija je površina modifikovana HAP-om. Raniji nalazi pokazuju da citotoksično delovanje može zavistiti i od količine HAP koja je korišćena za oblaganje legura. Dobijeni rezultati pokazuju da KM HAP ne deluje citotoksično na L929 ćelije što ukazuje da HAP oslobođen sa površine legure verovatno nije uzrok citotoksičnosti. Kako je HAP teško rastvorljiv u vodenim rastvorima, testiran je i KM pripremljen od  $Ca(OH)_2$  koji je pod istim uslovima više rastvorljiv. Pokazano je da KM  $Ca(OH)_2$  ispoljava blagu citotoksičnost, ali značajno nižu u poređenju sa KM HAP-modifikovanih Ti legura koje su testirane u ovom radu.

Ovaj deo istraživanja je završen testiranjem efekta nifelata, blokatora Ca kanala u eseju sa KM. Pokazalo se da nifelat kompletno poništava citotoksični efekat KM  $Ca(OH)_2$ , a citotoksičnost KM dvostrano HAP-modifikovane legure (Ti-HAP2-KM) blago redukuje. Ovi nalazi su pokazali da  $Ca^{2+}$  joni nisu ključni faktor koji utiče na citotoksičnost. Ostali mehanizmi bi mogli biti povezani sa mikro ili nano HAP partikulama koje su se mogle osloboditi u KM. Ove partikule su vidljive u okolini testiranih uzoraka u direktnom testu citotoksičnosti. Nedavna istraživanja pokazuju da je citotoksičnost nano-HAP posledica njihovog delovanja na signalne mehanizme uključene u proliferaciju/smrť ćelija [93]. Zhao i saradnici sugerišu da je citotoksičnost nano partikula HAP-a povezana sa oblikom partikule HAP-a kao i sa tipom ćelija koju se korišćene u istraživanju. Dobijeni rezultati na BEAS-2B ćelijama ukazuju da nano-HAP partikule dovode do povišene produkcije IL-6, koja nije praćena stvaranjem ROS-a, na osnovu čega su autori pretpostavili da IL-6 može da suprimira

oksidativni stres. Sa druge strane, uočena je korelacija između visoke učestalosti nekroze i visoke ekspresije IL-6, na istoj ćelijskoj liniji. Ovi nalazi su ukazali da nektotične ćelije doprinose povećanju sinteze i oslobađanju inflamatornih citokina, što može biti od značaja za održavanje homeostaze [93].

Takođe, moguće je da je citotoksičnost KM HAP legura posledica sinergizma između oslobođenih jona metala (Ti, Al i V) i komponenti amorfne HAP faze. Ispitivanja ove pretpostavke su predmet budućih istraživanja. Rad Rao i saradnika je pokazao da se brzina proliferacije L929 ćelija u kulturi *in vitro* ne menja pod uticajem jona titana, ali se smanjuje pod uticajem Al i V jona [94]. Takođe, pokazano je da postoji mogućnost da se Al joni, nakon implantacije Ti6Al4V, koji u *in vivo* uslovima izazivaju neurotoksičnost, oslobađaju iz implantata i akumuliraju u lamelarnoj kosti [95].

U cilju dodatnih ispitivanja molekularnih mehanizama apoptoze, u ovom radu je ispitivana i ekspresija gena za kaspaze kao pokazatelja apoptoze. Ekspresija gena je ispitivana u L929 ćelijama nakon direktnog kontakta sa testiranim legurama.

Apoptoza ćelija je izuzetno važan proces za normalno funkcionisanje i razvoj ćelija, tkiva i organizama. Kada je apoptotski signal aktiviran započinje direktna aktivacija kaspaza inicijatora (kaspaze 8 i 9 kod miša) koje dalje proteolizom aktiviraju kaskadu efektorskih kaspaza (kod miša su najznačajnije kaspaze 3 i 7). Aktivnost ovih enzima je često povećana i pre nego što se uoče ostali znaci apoptoze i predstavlja siguran znak aktivacije mehanizama apoptoze u ćelijama [96]. Iz tog razloga je ispitivano da li je izlaganje L929 ćelija kontaktu sa ispitivanim legurama dovelo do promene u ekspresiji gena za mišje kaspaze 3, 8 i 9, i sledstvene aktivacije apoptoze. Rezultati pokazuju da je kultivacija L929 ćelija sa Ti, Ti-Ca i Ti-HAP dovela do aktivacije gena za sve tri ispitivane kaspaze. Ukoliko bi se pratila kaskada aktivacije kaspaza uočavamo da je transkripcija gena za kaspaze 8 i 9 (inicijatorne kaspaze) višestruko povećana u kulturi L929 ćelija nakon 24-satnog kontakta sa Ti, Ti-Ca i Ti-HAP. Transkripcija gena za kaspaze 8 i 9 dostiže najviše vrednosti nakon izlaganja Ti-HAP ali su te vrednosti statistički značajne u odnosu na kontrolne vrednosti, samo za kaspazu

8. Dobijeni rezultati ukazuju da svi ispitivani uzorci legura dovode do aktivacije gena za kaspaze inicijatore apoptoze ali isto tako su pokazali da se na nivou ekspresije gena ne može utvrditi razlika u efektu ispitivanih legura. Naime, upoređivanjem ekspresije gena međusobno, u L929 ćelijskim kulturama sa Ti, Ti-Ca, Ti-HAP i staurosporinom nisu dobijene značajne razlike. Rezultati grupe istraživača iz Kanade su pokazali da različite legure-metali (aluminijum, srebro-paladijum, kobalt-hrom, nikel-hrom i bakarne legure) dovode da različite aktivacije gena za mišje kaspaze 3, 8 i 9 u L929 ćelijama [15]. Takođe, pokazali su da je ekspresija gena merena RT-PCR metodom (RT-PCR je manje osetljiv od Real-Time metode koja je korišćena u ovom istraživanju) značajno osetljivija u odnosu na MTT test za procenu citotoksičnosti ispitivanih materijala. Na osnovu toga pomenuti autori su zaključili da je moguće koristiti ekspresiju gena za kaspaze kao osetljivi test za ispitivanje indukcije apoptoze L929 ćelija nakon izlaganja dejstvu različitih legura/metala. U ovom istraživanju nisu dobijene tako jasne razlike između ispitivanih uzoraka verovatno zbog toga što se radi o istoj leguri sa različitom obradom površine. Međutim, na osnovu izrazitog povećanja ekspresije gena za sve tri ispitivane kaspaze može se zaključiti da je izlaganje ćelija kontaktu sa ispitivanim uzorcima dovelo do aktivacije apoptoze. Trebalo bi imati u vidu da na ekspresiju gena za kaspaze može da utiče i prisustvo jona metala, gustina ćelija u kulturi kao i vreme izlaganja legurama. Ovi elementi si bili standardni u eksperimentu u ovom istraživanju za sve ispitivane grupe ( $3 \times 10^5/2$  ml i 24 sata kultivacije u medijumu).

Slično inicijatornim kaspazama i ekspresija gena za kaspazu 3 (efektorska kaspaza) je statistički značajno veća kod svih ispitivanih grupa. Najveća značajnost u odnosu na kontrolu je nađena u grupi u kojoj su ćelije bile u kontaktu sa Ti ( $p=0.032$ ), ali kada se uporedi efekat ispitivanih uzoraka međusobno, nema statistički značajne razlike. Ovi nalazi su potvrda da svi ispitivani uzorci dovode do aktivacije apoptoze na molekularnom nivou, ali da razlike između ispitivanih uzoraka nisu značajne kada se prati ekspresija gena za kaspaze 3, 8 i 9.

Prilikom interpretacije dobijenih rezultata potrebno je imati u vidu da aktivacija kaspaza nije povezana samo sa apoptozom već da kaspaze, osim u inflamaciji [97], učestvuju

i u drugim ćelijskim aktivnostima uključujući nekrozu [98], diferencijaciju, proliferaciju i reprogramiranje ćelijskog ciklusa [99]. Za oblast stomatologije, tj. implantologije poseban značaj imaju istraživanja koja ukazuju na ulogu kaspaze 7 u procesu osteogeneze kroz indukciju ekspresije gena za osteokalcin [12]. Aktivirana kaspaza 3 i 7 je detektovana u ranoj fazi razvoja miševa i ostaje aktivna i postnatalno u intramembranskim kostima (formiraju se direktnom osifikacijom mezenhima kao što je vilična kost), ali i u endohondralnim kostima (kostima koje se formiraju od hrskavice kao što je femur i ostale duge kosti). Miševi mutirani za kaspazu 7 imaju značajne defekte u formiranju kosti uključujući redukovani volumen kosti, smanjeni sadržaj minerala i gustinu kostiju. Ovi defekti su različito izraženi u intramembranoznim i endohondralnim kostima sugerišući različite funkcije kaspaze 7 u zavisnosti od vrste osifikacije.

Drugi deo istraživanja u okviru ove disertacije odnosio se na procenu imunomodulacijskih efekata ispitivanih legura titana. Biomaterijali, bez obzira na stepen biokompatibilnosti, za imunski sistem domaćina predstavljaju strana tela [16].

Ćelije imunskog sistema domaćina, pre svih makrofagi, produkuju medijatore imunskog odgovora kao što su citokini, hemokini i faktori rasta. Neposredno nakon ugradnje implantata, makrofagi se skupljaju na površini implantata. Rezultati mnogobrojnih istraživanja pokazuju da ove ćelije imaju jako važnu ulogu kako u započinjanju inflamacije tako i u njenoj završnoj fazi (rezoluciji), zahvaljujući na prvom mestu produkciji pro-inflamacijskih i anti-inflamacijskih citokina, ali i drugih faktora (enzima). Takođe, pokazano je da karakteristike površine implantata mogu uticati na lokalnu imunost na mestu ugradnje implantata utičući na profil oslobođenih citokina od strane makrofaga. Drugim rečima, različite površine implantata mogu uticati na različitu uspešnost procesa zarastanja nakon ugradnje implantata [100].

Jedan od modela za procenu *in vivo* odgovora imunskih ćelija jeste procena njihove *in vitro* reakcije. U istraživanjima u okviru ove disertacije korišćene su fitohemaglutininom

(PHA)-aktivisane humane mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMNC) kao opšte prihvaćen model za procenu proliferacije limfocita i produkcije citokina *in vitro*.

Rezultati ispitivanja metaboličke aktivnosti PHA-stimuliranih PBMNC kultiviranih u prisustvu KM testiranih legura nisu pokazali statistički značajno delovanje legura. Metabolička aktivnost svih ispitivanih uzoraka je bila oko 80% u poređenju sa kontrolnim ćelijama (kultiviranim u nekondicioniranom medijumu). Ispitivanjima proliferacije PHA-stimuliranih PBMNC kultiviranih u prisustvu trodnevnog 50% KM pokazano je statistički značajno inhibitorno delovanje Ti-HAP-KM na proliferaciju PBMNC u poređenju sa kontrolama i Ti-Ca-KM. Inhibitorski efekat je dozno zavisna, jer je pokazan kompletan izostanak smanjenja ćelijske proliferacije pri koncentraciji kondicioniranog medijuma od 25%. Ovaj segment je dopunjen i analizom delovanja sedmodnevnog KM. Dobijeni rezultati pokazuju da 50% KM modifikovanih legura statistički značajno inhibiraju proliferaciju PBMNC u poređenju sa KM kontrolne legure. Takođe, sedmodnevni KM sva tri testirana uzorka (Ti-KM, Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM) u primenjenoj koncentraciji (50%) statistički značajno inhibiraju proliferaciju PBMNC u poređenju sa kontrolnim ćelijama (kultiviranim u nekondicioniranom medijumu). Proliferacija u prisustvu sedmodnevnog KM je bila inhibirana oko 20-30%.

U odgovoru na pitanje šta je uzrok inhibicije proliferacije ispitane su i nekroza i apoptoza, primenom protočne citometrije, obeležavanjem ćelija PI. Primenom navedenih metoda, detektovan je značajan broj nekrotičnih PBMNC (oko 50%) u svim grupama testiranih uzoraka, uključujući kontrolni medijum. Ovako značajan stepen nekroze je mogao biti posledica 72-satne stimulacije ćelija PHA. Međutim, dobijeni rezultati su pokazali da Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM u 50% koncentraciji ne utiču na nekrozu, dok Ti-HAP-KM primenjen u manjoj (25%) koncentraciji značajno stimuliše nekrozu u poređenju sa Ti-Ca-KM i Ti-KM. Takođe, zapaženo je da sam Ti-KM u obe testirane koncentracije značajno inhibira nekrozu u poređenju sa kontrolnim ćelijama. Nasuprot značajnom procentu nekrotičnih ćelija, broj ćelija u kasnoj apoptozi u svim ispitivanim grupama je bio manji od 25%. Nije detektovana statistički značajna razlika u delovanju testiranih koncentracija (50% i 25%) ispitivanih

uzoraka (Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM) na procenat apoptotičnih PBMNC u poređenju sa kontrolnim uzorcima.

Prethodno opisani rezultati ukazuju da se niža ćelijska proliferacija najverovatnije ne može povezati ni sa inhibicijom metaboličke aktivnosti, niti sa povećanom ćelijskom nekrozom ili apoptozom. Međutim, iako nije detektovana statistički značajna razlika u broju ćelija u apoptozi, prisustvo za 10-15% većeg broja ćelija u apoptozi u kulturi sa Ti-HAP-KM ipak ukazuje na mogućnost da bi ćelijska smrt, makar u jednom delu, mogla biti odgovorna za inhibiciju proliferacije PBMNC u prisustvu KM testiranih legura.

Kako je ranije naglašeno, dentalni implantati koji sadrže HAP menjaju inflamatorni odgovor na mestu implantacije [101,102]. Zbog toga je analizirana i produkcija citokina od strane stimulisanih PBMNC. Najpre je ispitana produkcija citokina sa pro-inflamacijskim delovanjem.

Pokazano je da 50% Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM statistički značajno inhibiraju produkciju IL-1 $\beta$  u poređenju sa Ti-KM i kontrolnim medijumom. Inhibitorni efekat je zabeležen u prisustvu kako trodnevnog tako i sedmodnevnog KM. IL-1 $\beta$  je pro-inflamacijski citokin koji učestvuje u regulaciji imunskog i zapaljenskog odgovora i može imati značajnu ulogu u aktivaciji T ćelija [103]. Kao što je već istaknuto, detektovana je značajna inhibicija produkcije ovog citokina u ćelijskoj kulturi sa Ti-HAP-KM. Imajući ove činjenice na umu može se pretpostaviti da bi i hidroksiapatitom-posredovana inhibicija produkcije IL-1 $\beta$  mogla biti jedan od uzroka smanjenja ćelijske proliferacije PBMNC.

Analiza produkcije IL-8 u prisustvu KM eksperimentalnih legura Ti-Ca i Ti-HAP je pokazala da nije došlo do značajne promene produkcije IL-8 u poređenju sa Ti-KM. Međutim, pokazan je inhibitorni efekat trodnevnog KM svih ispitivanih legura titana u poređenju sa kontrolnim medijumom. IL-8 je hemokin sa važnom ulogom u inflamaciji, koji stimuliše priliv i aktivaciju neutrofila na mestu povrede, ima različite uloge u urođenom i

stečenom imunskom odgovoru. Sekrecija IL-8 se povećava pod oksidativnim stresom utičući na povećanje broja inflamacijskih ćelija i dodatno povećanje medijatora oksidativnog stresa. Zbog toga se smatra da IL-8 predstavlja jedan od ključnih hemokina u lokalnoj inflamaciji [104]. Polazeći od ovih saznanja pretpostavlja se da bi smanjenje produkcije IL-8 pod dejstvom KM svih ispitivanih legura, koje smo je pokazano u ovoj disertaciji u *in vitro* sistemu, moglo da ima povoljan uticaj na smanjenje nespecifičnog imunskog odgovora i lokalne inflamacije *in vivo*. Međutim, neophodna su dodatna istraživanja u ovom pravcu za finalni zaključak.

Kada je analizirana produkcija citokina koji igraju glavnu ulogu u nastanku i regulaciji inflamacijskih reakcija, primećeno je da KM kontrolne legure (Ti-uzorak), u oba ispitivana termina kondicioniranja, indukuje statistički značajno višu produkciju TNF- $\alpha$  u odnosu na kontrolni KM, kao i na Ti-HAP-KM i Ti-Ca-KM. Ovi nalazi su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da je direktna ko-kultura makrofaga i osteoblasta sa mikro partikulama titana praćena povišenim nivoima TNF- $\alpha$  [105]. Sa druge strane, rezultati istraživanja ove disertacije pokazuju da trodnevni Ti-HAP-KM statistički značajno inhibira produkciju TNF- $\alpha$  i u poređenju sa kontrolnom legurom (Ti-KM) i u poređenju sa Ti-Ca-KM. Dobijeni rezultati ukazuju da bi se dodavanjem hidroksiapatitne obloge na leguru titana moglo uticati na smanjenje inflamacije. Naime, TNF- $\alpha$  je jedan od najznačajnijih citokina sa pro-inflamacijskim delovanjem koji ima važnu ulogu u indukciji celularnog imunskog odgovora. Zbog toga povećana produkcija ovog citokina od strane imunskih ćelija u lokalnoj mikrosredini može biti udružena sa razvojem inflamacije i aktivacijom osteolize, kako je pokazano u nekim studijama [106]. Takođe, ne treba isključiti ni ulogu Ti jona. Tako su Pascual i saradnici, na osnovu rezultata njihovih istraživanja, ukazali da povećani efekat titana na oslobađanje citokina može biti posledica oslobađanja Ti jona iz debrisa metala u medijumu za kultivaciju [107]. Mogućnost uticaja implantata na nastanak inflamacijskog miljea je istraživana u mnogim studijama. Jedno od tih istraživanja je i rad Jacobi-Gresser i saradnika, koji se bavio genetičkim i imunskim parametrima koji mogu biti markeri neuspeha dentalnih implantata od titana. Ovi autori su pokazali da su kod pacijenata sa gubitkom implantata značajno povećane koncentracije TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , pro-inflamacijskih citokina, u



kultuirama ćelija pune krvi inkubiranih u direktnom kontaktu sa česticama Ti dioksida. Dugoročno oslobađanje IL-1 i TNF- $\alpha$  podstiče inflamatorne i osteolitičke procese koji dovode do povećanog rizika od nastanka peri-implantitisa i gubitka implantata. [108].

I u više drugih istraživanja je pokazan pro-inflamacijski efekat legura titana i hidroksiapatita na humane mononuklearne ćelije [109–111]. Lange i sar su pokazali da beta-tri-kalcijum fosfat i čestice hidroksiapatita značajno stimulišu produkciju TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  u 24-satnoj kulturi PMBNC. Isti autori su takođe pokazali da hidroksiapatit značajno stimuliše produkciju RANKL-a (ligand receptora aktivatora nuklearnog faktora  $\kappa$ B) što može da ukazuje na ulogu hidroksiapatita u osteolitičkim procesima [112]. Svi ovi rezultati potvrđuju značaj *in vitro* sistema za ispitivanje potencijalne reakcije ćelija imunskog sistema na dentalni implantat, kao strano telo, u *in vivo* uslovima.

Vrlo zanimljiv rezultat je detektovan ispitivanjima produkcije IL-10, citokina koji dominantno ispoljava anti-inflamacijsko delovanje. Dobijeni rezultati pokazuju da trodnevni Ti-KM, Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM statistički značajno inhibiraju produkciju IL-10 u poređenju sa kontrolnim medijumom. Istovremeno, u slučaju sedmodnevnog KM, inhibitorni efekat na produkciju IL-10 je zabeležen samo u prisustvu Ti-Ca-KM u poređenju sa KM kontrolne legure. Poznato je da IL-10 inhibira sintezu citokina sa pro-inflamacijskim delovanjem kao što su IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  [113–115]. Dobijeni rezultati koji pokazuju da sedmodnevni KM kontrolne legure Ti povećavaju produkciju IL-2, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  su u saglasnosti sa smanjenom produkcijom IL-10 koja je detektovana u istim eksperimentalnim uslovima. Takođe, rezultati dobijeni u ovoj disertaciji pokazuju da oblaganje Ti legure hidroksiapatitom značajno smanjuje produkciju citokina sa pro-inflamacijskim delovanjem (TNF- $\alpha$ ) ali ne dovodi do povećanja produkcije IL-10 (citokina sa anti-inflamacijskim delovanjem). Ovi rezultati ukazuju da bi oblaganje legure HAP moglo da pojača anti-inflamacijska i osteoprotektivna svojstva legura Ti, mehanizmima koji ne zavise od IL-10. Za konačnu potvrdu ove pretpostavke potrebna su dalja istraživanja.

Analiza produkcije citokina okončana je ispitivanjem uticaja Ti legura na produkciju citokina koji se povezuju sa Th polarizacijom imunskog odgovora: Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4, IL-5) i Th17 (IL-17).

Kada je u pitanju produkcija IL-2, rezultati ovog istraživanja pokazuju da KM kontrolne legure (Ti-KM) deluje stimulatorno na produkciju IL-2 u poređenju sa kontrolnim medijumom. Poznato je da je IL-2 faktor rasta T limfocita [116] koji proizvode aktivisani T limfociti. Stimulacija produkcije IL-2 u ovom radu bi mogla da ukaže i na reaktivaciju T ćelija u prisustvu Ti jona. Bilo bi očekivano da povećana produkcija IL-2 bude praćena većim proliferativnim odgovorom T limfocita. Međutim, nasuprot očekivanjima, detektovana je značajna inhibicija proliferacije PBMNC inkubiranih u prisustvu sedmodnevnog KM svih eksperimentalnih uzoraka (Ti-KM, Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM). Istovremeno, KM modifikovanih legura nisu značajno uticali na produkciju IL-2 u poređenju sa kontrolnim medijumom. Nije isključena mogućnost da uzorci čija je površina modifikovana utiču na ekspresiju receptora za IL-2 (IL-2R), jer kao što je već pokazano, niža ekspresija alfa lanca IL-2R (CD25) može biti povezana sa nižim stepenom utroška ovog citokina [117]. Imajući na umu sve ove nalaze, jedno od objašnjenja inhibicije proliferacije bi mogla biti i manja potrošnja IL-2 od strane T ćelija zbog eventualne smanjene ekspresije IL-2R ili moguća ometanja u signalnim putevima kao posledica PHA-indukovane aktivacije ćelija. Precizan odgovor na ovo pitanje zahteva dodatna istraživanja. U prilog pretpostavci o mogućem poremećaju na nivou signalnih puteva idu i rezultati istraživanja Wang-a i saradnika koji su pokazali da oslobođeni metali (titan, kobalt, hrom), u klinički relevantnim koncentracijama, mogu podstaći produkciju citokina, utičući na prenos signala i ekspresiju gena za citokine. Isti autori su ukazali da bi solubilni metalni joni mogli ući u ćelije i vezati se za kinaze ili nuklearne faktore koji regulišu pomenuti prenos signala i ekspresiju gena za citokine [105].

I drugi autori su pokazali uticaj modifikovanih legura titana na molekularne mehanizme produkcije citokina. Tako rezultati rada Hamleta i Ivanovskog, na modelu RAW 264.7 ćelijske linije, pokazuju da direktni kontakt sa nanostrukturnom Ca-fosfatnom oblogom

legure titana (Ti6Al4V), dovodi do izrazitog smanjenja genske ekspresije pro-inflamacijskih citokina i hemokina. Smanjenje ekspresije gena potvrđeno je za TNF $\alpha$  i CCL5 i na proteinskom nivou. Ovi autori su pretpostavili da inhibicija produkcije pro-inflamacijskih citokina može na taj način olakšati zarastanje kosti i oseointegraciju što je u ovom istraživanju uočeno i klinički [102].

Kada je u pitanju uticaj modifikovanih legura na Th polarizaciju, nije pokazano statistički značajno smanjenje produkcije IL-4 i IL-5 u prisustvu KM eksperimentalnih legura, što ukazuje na izostanak Th2 modulacije. Promene nivoa IL-17 takođe nisu ukazivale na postojanje bilo kakve modulacije Th17 odgovora. Takođe, nisu pokazane statistički značajne promene u produkciji IFN- $\gamma$ . Zbog toga je malo verovatno da prisustvo solubilnih faktora u kondicioniranim medijumima ispitivanih legura menja odgovor aktiviranih PBMNC u smislu Th1 polarizacije. Odnosno, povišeni nivoi IL-2 u PBMNC kulturama sa Ti-KM su verovatnije posledica smanjene potrošnje IL-2.

Generalno, na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da originalna metoda oblaganja Ti6Al4V legure HAP-om pomoću atmosferske plazme u obliku spreja visoke energije omogućava stabilnu adheziju prevlake. Citotoksičnost ovako obrađene legure, koja zavisi od količine nanetog HAP-a, se može znatno smanjiti do necitotoksičnog nivoa prethodnim kondicioniranjem u medijumu za kultivaciju ćelija ili drugim vodenim rastvorima. Ova procedura, kojom se uklanjaju rastvorljive toksične komponente, može biti korisna pre implantacije HAP obloženih legura *in vivo*. Inhibicija produkcije IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  pod uticajem Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM u odnosu na Ti-KM, dobijena u ovom istraživanju, može ukazivati na veću stopu preživljanja ovako modifikovanih površina implantata *in vivo*. Takođe, rezultati *in vitro* ispitivanja na PHA-stimulisanim PBMNC svrstavaju ovako pripremljene legure u kategoriju materijala koje bi trebalo dodatno istražiti u *in vivo* modelima. Zbog toga će predmet budućih istraživanja biti određivanje dinamike produkcije citokina i precizna identifikacija tipa ćelija koje ih proizvode u cilju objašnjenja fiziološkog značaja dobijenih rezultata.

## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj disertaciji mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Direktan kontakt Ti legura čija površina je jednostrano modifikovana (Ti-Ca i Ti-HAP) i L929 ćelija u poređenju sa nedomodifikovanom legurom (Ti) ne utiče na metaboličku aktivnost, proliferaciju, produkciju ROS, nekrozu, produkciju LDH.
2. Direktan kontakt Ti-HAP i L929 ćelija u poređenju sa Ti-Ca dovodi do statistički značajne inhibicije produkcije ROS.
3. Ti-HAP2 (čija površina je dvostrano modifikovana) nakon direktnog kontakta statistički značajno smanjuje vijabilnost i metaboličku aktivnost L929 ćelija u poređenju sa Ti-HAP.
4. Prema kriterijumima ISO 10993-5, Ti, Ti-Ca i Ti-HAP se mogu okarakterisati kao ne-citotoksični materijali (redukcija vijabilnosti ćelija manja od 30%), dok Ti-HAP2 ispoljava blago-umerenu citotoksičnost (redukcija vijabilnosti ćelija 30%-55%).
5. Ti-HAP2-KM, nakon indirektnog kontakta sa L929 ćelijama, u poređenju sa Ti-HAP-KM:
  - a) statistički značajno stimuliše nekrozu ćelija i apoptozu ćelija;
  - b) statistički značajno inhibira proliferaciju ćelija.
6. Kondicioniranje u medijumu (24 sata i sedmodnevno) značajno smanjuje citotoksični efekat HAP-modifikovanih legura, mereno testovima direktne i indirektno citotoksičnosti na L929 ćelijama. Citotoksičnost Ti-HAP2 i Ti-HAP2-KM je nakon kondicioniranja smanjena na nivo citotoksičnosti koji je prema kriterijumima ISO 10993-5 prihvatljiv.
7. Višestruko povećanje ekspresije gena za kaspaze 3, 8 i 9 u odnosu na kontrole u L929 ćelijama mišjih fibroblasta gajene u 24-satnoj kulturi u direktnom kontaktu sa Ti, Ti-Ca i Ti-HAP jasno ukazuje na aktivaciju procesa apoptoze.

8. Razlika u ekspresiji gena za kaspaze 3, 8 i 9 između ćelija koje su bile izložene kontaktu sa Ti, Ti-Ca ili sa Ti-HAP nisu statistički značajne.
9. Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM (50% i 25% trodnevni KM), u poređenju sa Ti-KM, ne utiču na metaboličku aktivnost i apoptozu PHA-stimuliranih PBMNC.
10. Ti-HAP-KM (50%), u poređenju sa istom koncentracijom Ti-KM, stimuliše nekrozu i inhibira proliferaciju PHA-stimuliranih PBMNC.
11. Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM, u poređenju sa Ti-KM, različito utiču na produkciju citokina od strane PHA-stimuliranih PBMNC u zavisnosti od dužine vremena kondicioniranja:
  - a) statistički značajno inhibiraju produkciju IL-1 $\beta$  i IL-2, a ne menjaju produkciju IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 i IL-17 (obe modifikovane legure u svim testiranim vremenima kondicioniranja);
  - b) Ti-Ca-KM (sedmodnevno kondicioniranje) statistički značajno inhibira produkciju IL-10, TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$ .
  - c) Ti-HAP-KM (trodnevno i sedmodnevno kondicioniranje) statistički značajno inhibira produkciju TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$ .

## 7. LITERATURA

1. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981; 52:155–70.
2. Kostić M, Krunić N, Najman S. Savremeni aspekt ispitivanja biokompatibilnosti materijala u stomatologiji. *Acta Stomatol Naissi*. 2010; 26:1007–16.
3. Listgarten MA, Lang NP, Schroeder HE, Schroeder A. Periodontal tissues and their counterparts around endosseous implants. *Clin Oral Implants Res*. 1991; 2:1–19.
4. Santin M, Phillips G. Biomimetic, bioresponsive, and bioactive materials: An introduction to integrating materials with tissues. Wiley; 2012.
5. Williams DF, European Society for Biomaterials. Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986. Elsevier; 1987.
6. Williams DF. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials*. 2014; 35:10009–14.
7. ISO/EN10993-5. B. Int Stand ISO 10993-5 Biol Eval Med Devices - Part 5 Tests Cytotox Vitr Methods. 2009; 3 Ed:42.
8. Kunzmann A, Andersson B, Thurnherr T, Krug H, Scheynius A, Fadeel B. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2011; 1810:361–73.
9. Mouhyi J, Dohan Ehrenfest DM, Albrektsson T. The peri-implantitis: Implant surfaces, microstructure, and physicochemical aspects. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012; 14:170–83.
10. Perez-Garijo A, Steller H. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development*. 2015; 142:3253–62.
11. Ichim G, Tait SWG. A fate worse than death: Apoptosis as an oncogenic process. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16:539–48.

12. Svandova E, Lesot H, Vanden Berghe T, Tucker AS, Sharpe PT, Vandenabeele P, Matalova E. Non-apoptotic functions of caspase-7 during osteogenesis. *Cell Death Dis.* 2014; 5:e1366.
13. Miura M, Chen X-D, Allen MR, Bi Y, Gronthos S, Seo B-M, Lakhani S, Flavell RA, Feng X-H, Robey PG, Young M, Shi S. A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. *J Clin Invest.* 2004; 114:1704–13.
14. Kato S, Akagi T, Sugimura K, Kishida A, Akashi M. Evaluation of biological responses to polymeric biomaterials by RT-PCR analysis IV: study of c-myc, c-fos and p53 mRNA expression. *Biomaterials.* 2000; 21:521–7.
15. Jia X, Wang Q, Sun H, Zhan D. Effects of different dental alloys on cytotoxic and apoptosis related genes expression in L929 Cells 2010; 19:95–100.
16. Trindade R, Albrektsson T, Tengvall P, Wennerberg A. Foreign body reaction to biomaterials: On mechanisms for buildup and breakdown of osseointegration. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016; 18:192–203.
17. Brånemark P-I, Zarb GA, Albrektsson T. Tissue-integrated prostheses : osseointegration in clinical dentistry. Quintessence; 1985.
18. Jain R, Kapoor D. The dynamic interface: A review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015; 5:354–8.
19. American Academy of Implant Dentistry. Glossary of implant terms. *J Oral Implantol.* 1986; 12:284–94.
20. Trindade R, Albrektsson T, Galli S, Prgomet Z, Tengvall P, Wennerberg A. Osseointegration and foreign body reaction: Titanium implants activate the immune system and suppress bone resorption during the first 4 weeks after implantation. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2018; 20:82–91.
21. Albrektsson T, Dahlin C, Jemt T, Sennerby L, Turri A, Wennerberg A. Is Marginal Bone Loss around Oral Implants the Result of a Provoked Foreign Body Reaction? *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014; 16:155–65.
22. Bosshardt DD, Chappuis V, Buser D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. *Periodontol* 2000. 2017; 73:22–40.

23. Morton D, Bornstein MM, Wittneben JG, Martin WC, Ruskin JD, Hart CN, Buser D. Early loading after 21 days of healing of nonsubmerged titanium implants with a chemically modified sandblasted and acid-etched surface: Two-year results of a prospective two-center study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2010; 12:9–17.
24. Chen Z, Wu C, Gu W, Klein T, Crawford R, Xiao Y. Osteogenic differentiation of bone marrow MSCs by  $\beta$ -tricalcium phosphate stimulating macrophages via BMP2 signalling pathway. *Biomaterials.* 2014; 35:1507–18.
25. Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: Materials, chemistry and topography. *Trends Biotechnol.* 2010; 28:198–206.
26. Stamenković D. *Stomatološki materijali, knjiga 2. 1.* Beograd: 2012.
27. Osman RB, Swain M V. A critical review of dental implant materials with an emphasis on titanium versus zirconia. *Materials (Basel).* 2015; 8:932–58.
28. Sicilia A, Cuesta S, Coma G, Arregui I, Guisasola C, Ruiz E, Maestro A. Titanium allergy in dental implant patients: A clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19:823–35.
29. Eisenbarth E, Velten D, Schenk-Meuser K, Linez P, Biehl V, Duschner H, Breme J, Hildebrand H. Interactions between cells and titanium surfaces. *Biomol Eng.* 2002; 19:243–9.
30. Fojt J, Joska L, Málek J. Corrosion behaviour of porous Ti–39Nb alloy for biomedical applications. *Corros Sci.* 2013; 71:78–83.
31. Upadhyay D, Panchal MA, Dubey RS, Srivastava VK. Corrosion of alloys used in dentistry: A review. *Mater Sci Eng A.* 2006; 432:1–11.
32. Bral A, Mommaerts MY. In vivo biofunctionalization of titanium patient-specific implants with nano hydroxyapatite and other nano calcium phosphate coatings: A systematic review. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016; 44:400–12.
33. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20:172–84.



34. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1 - review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont.* 2004; 17:536–43.
35. Lang NP, Jepsen S. Implant surfaces and design (Working Group 4). *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20:228–31.
36. Nimb L, Gotfredsen K, Steen Jensen J. Mechanical failure of hydroxyapatite-coated titanium and cobalt-chromium-molybdenum alloy implants. An animal study. *Acta Orthop Belg.* 1993; 59:333–8.
37. Albrektsson T. Hydroxyapatite-coated implants: A case against their use. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998; 56:1312–26.
38. Palanivelu R, Kalainathan S, Ruban Kumar A. Characterization studies on plasma sprayed (AT/HA) bi-layered nano ceramics coating on biomedical commercially pure titanium dental implant. *Ceram Int.* 2014; 40:7745–51.
39. Mohseni E, Zalnezhad E, Bushroa AR. Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti–6Al–4V implant: A review paper. *Int J Adhes Adhes.* 2014; 48:238–57.
40. Jokanović V, Vilotijević M, Jokanović B, Jenko M, Anžel I, Stamenković D, Lazić V, Rudolf R. Investigations of corrosion on the surface of titanium substrate caused by combined alkaline and heat treatment. *Corros Sci.* 2014; 82:180–90.
41. Jokanović V, Vilotijević M, Čolović B, Jenko M, Anžel I, Rudolf R. Enhanced Adhesion Properties, Structure and Sintering Mechanism of Hydroxyapatite Coatings Obtained by Plasma Jet Deposition. *Plasma Chem Plasma Process.* 2015; 35:1–19.
42. Raković D, Uskoković D. *Biomaterijali.* Beograd: Institut Tehničkih Nauka SANU; 2010.
43. Morais JM, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. Biomaterials/tissue interactions: Possible solutions to overcome foreign body response. *AAPS J.* 2010; 12:188–96.
44. Santos MCLG, Campos MIG, Line SRP. Early dental implant failure: A review of the literature. *Brazilian J Oral Sci.* 2002; 1:103–11.
45. Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2009; 9:61–71.

46. Hotchkiss KM, Reddy GB, Hyzy SL, Schwartz Z, Boyan BD, Olivares-Navarrete R. Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. *Acta Biomater.* 2016; 31:425–34.
47. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol.* 2013; 229:176–85.
48. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8:958–69.
49. Kelso A. Cytokines: Principles and prospects. *Immunol Cell Biol.* 1998; 76:300–17.
50. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol.* 2007; 37:34–45.
51. Murphy K, Weaver C. *Janeway's immunobiology.* 9th Ed. Garland Science: New York; 2016.
52. Chensue SW, Ruth JH, Warmington K, Lincoln P, Kunkel SL. In vivo regulation of macrophage IL-12 production during type 1 and type 2 cytokine-mediated granuloma formation. *J Immunol.* 1995; 155:3546–51.
53. Haraguchi S, Good RA, James-Yarish M, Cianciolo GJ, Day NK. Differential modulation of Th1- and Th2-related cytokine mRNA expression by a synthetic peptide homologous to a conserved domain within retroviral envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:3611–5.
54. Tallima H, Salah M, Guirguis FR, El Ridi R. Transforming growth factor-beta and Th17 responses in resistance to primary murine schistosomiasis mansoni. *Cytokine.* 2009; 48:239–45.
55. Vilotijević M, Dačić B, Božić D. Velocity and texture of a plasma jet created in a plasma torch with fixed minimal arc length. *Plasma Sources Sci Technol.* 2009; 18:015016.
56. Sieuwerts AM, Klijn JG, Peters HA, Foekens JA. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1995; 33:813–23.

57. Invitrogen. Assays for Cell Viability, Proliferation and Function Molecular Probes™ Handbook A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies Fluorophores and Their Amine-Reactive Derivatives The Molecular Probes® Handbook Molecular Probes® Resources 2010; 11th Ed.
58. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol.* 2010; 594:57–72.
59. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.* 2006; 1:1458–61.
60. Čolić M, Gašić S, Vučević D, Pavičić L, Popović P, Jandrić D, Medić-Mijačević Lj, Rakić Lj. Modulatory effect of 7-thia-8-oxoguanosine on proliferation of rat thymocytes in vitro stimulated with concanavalin A. *Int J Immunopharmacol.* 2000; 22:203–12.
61. Burd JF, Usategui-Gomez M. A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase. *Clin Chim Acta.* 1973; 46:223–7.
62. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods.* 2001; 25:402–8.
63. Kabir J, Lobo M, Zachary I. Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis. *Biochem J.* 2002; 367:145–55.
64. Sirover MA. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol.* 1999; 1432:159–84.
65. Pfaffl MW. Quantification Strategies in Real-time Polymerase Chain Reaction. In: Stephen A. Bustin, editor. *A-Z Quant. PCR*, 2004, 87–112.
66. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Support for an infection-induced apoptotic pathway in human fetal membranes. *Am J Obs Gynecol.* 2001; 184:1392–8.
67. Girault I, Tozlu S, Lidereau R, Bièche I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:4415–22.

68. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:e45.
69. Drevet R, Viteaux A, Maurin JC, Benhayoune H. Human osteoblast-like cells response to pulsed electrodeposited calcium phosphate coatings. *RSC Adv.* 2013; 3:11148–54.
70. Urquia Edreira ER, Wolke JGC, Aldosari AA, Al-Johany SS, Anil S, Jansen JA, Van Den Beucken J. Effects of calcium phosphate composition in sputter coatings on in vitro and in vivo performance. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2015; 103:300–10.
71. Goodman SB, Yao Z, Keeney M, Yang F. The future of biologic coatings for orthopaedic implants. *Biomaterials.* 2013; 34:3174–83.
72. Zhang BGX, Myers DE, Wallace GG, Brandt M, Choong PFM. Bioactive coatings for orthopaedic implants-recent trends in development of implant coatings. *Int J Mol Sci.* 2014; 15:11878–921.
73. Maxian SH, Zawadsky JP, Dunn MG. Mechanical and histological evaluation of amorphous calcium phosphate and poorly crystallized hydroxyapatite coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res.* 1993; 27:717–28.
74. Hung K-Y, Lo S-C, Shih C-S, Yang Y-C, Feng H-P, Lin Y-C. Titanium surface modified by hydroxyapatite coating for dental implants. *Surf Coatings Technol.* 2013; 231:337–45.
75. Kizuki T, Takadama H, Matsushita T, Nakamura T, Kokubo T. Preparation of bioactive Ti metal surface enriched with calcium ions by chemical treatment. *Acta Biomater.* 2010; 6:2836–42.
76. Huang S, Zhou K, Huang B, Li Z, Zhu S, Wang G. Preparation of an electrodeposited hydroxyapatite coating on titanium substrate suitable for in-vivo applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19:437–42.
77. Huang Y, Zhang X, Zhao R, Mao H, Yan Y, Pang X. Antibacterial efficacy, corrosion resistance, and cytotoxicity studies of copper-substituted carbonated hydroxyapatite coating on titanium substrate. *J Mater Sci.* 2015; 50:1688–700.

78. Tang W, Yuan Y, Liu C, Wu Y, Lu X, Qian J. Differential cytotoxicity and particle action of hydroxyapatite nanoparticles in human cancer cells. *Nanomedicine*. 2014; 9:397–412.
79. Meena R, Kesari KK, Rani M, Paulraj R. Effects of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of human breast cancer cells (MCF-7). *J Nanoparticle Res*. 2012; 14:712.
80. Fouda M, Nemat A, Gawish A, Baiuomy AR. Does the coating of titanium implants by hydroxyapatite affect the elaboration of free radicals. An experimental study. *Aust J Basic Appl Sci*. 2009; 3:1122–9.
81. Natarajan V, Wilson CL, Hayward SL, Kidambi S. Titanium dioxide nanoparticles trigger loss of function and perturbation of mitochondrial dynamics in primary hepatocytes. *PLoS One*. 2015; 10:e0134541.
82. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*. 1997; 185:1481–6.
83. Magić M, Čolović B, Jokanović V, Vasilijić S, Marković M, Vučević D, Rudolf R, Čolić S, Čolić M. Cytotoxicity of a titanium alloy coated with hydroxyapatite by plasma jet deposition. *Vojnosanit Pregl*. 2017:97–97.
84. Li Y, Wong C, Xiong J, Hodgson P, Wen C. Cytotoxicity of titanium and titanium alloying elements. *J Dent Res*. 2010; 89:493–7.
85. Sidambe AT. Biocompatibility of advanced manufactured titanium implants-A review. *Materials (Basel)*. 2014; 7:8168–88.
86. Chandar S, Kotian R, Madhyastha P, Kabekkodu SP, Rao P. In vitro evaluation of cytotoxicity and corrosion behavior of commercially pure titanium and Ti-6Al-4V alloy for dental implants. *J Indian Prosthodont Soc*. 2017; 17:35–40.
87. Yuan Y, Liu C, Qian J, Wang J, Zhang Y. Size-mediated cytotoxicity and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Biomaterials*. 2010; 31:730–40.
88. Rahman ZU, Shabib I, Haider W. Surface characterization and cytotoxicity analysis of plasma sprayed coatings on titanium alloys. *Mater Sci Eng C*. 2016; 67:675–83.

89. Ducheyne P, Radin S, King L. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution. *J Biomed Mater Res.* 1993; 27:25–34.
90. Sun L, Berndt CC, Gross KA, Kucuk A. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: A review. *J Biomed Mater Res.* 2001; 58:570–92.
91. Mozayeni MA, Milani AS, Marvasti LA, Asgary S. Cytotoxicity of calcium enriched mixture cement compared with mineral trioxide aggregate and intermediate restorative material. *Aust Endod J.* 2012; 38:70–5.
92. Dianat O, Azadnia S, Mozayeni MA. Toxicity of calcium hydroxide nanoparticles on murine fibroblast cell line. *Iran Endod J.* 2015; 10:49–54.
93. Zhao X, Ng S, Heng BC, Guo J, Ma L, Tan TT, Ng KW, Loo SC. Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent. *Arch Toxicol.* 2013; 87:1037–52.
94. Rao S, Ushida T, Tateishi T, Okazaki Y, Asao S. Effect of Ti, Al, and V ions on the relative growth rate of fibroblasts (L929) and osteoblasts (MC3T3-E1) cells. *Biomed Mater Eng.* 1996; 6:79–86.
95. Zaffe D, Bertoldi C, Consolo U. Accumulation of aluminium in lamellar bone after implantation of titanium plates, Ti-6Al-4V screws, hydroxyapatite granules. *Biomaterials.* 2004; 25:3837–44.
96. Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell.* 2011; 147:742–58.
97. Songane M, Khair M, Saleh M. An updated view on the functions of caspases in inflammation and immunity. *Semin Cell Dev Biol.* 2018; 82:137–49.
98. Yuan J, Najafov A, Py BF. Roles of caspases in necrotic cell death. *Cell.* 2016; 167:1693–704.
99. McArthur K, Kile BT. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends Cell Biol.* 2018; 28:475–93.

100. Moura CCG, Zanetta-Barbosa D, Dechichi P, Carvalho VF, Soares PBF. Effects of titanium surfaces on the developmental profile of monocytes/macrophages. *Braz Dent J.* 2014; 25:96–103.
101. Rydén L, Omar O, Johansson A, Jimbo R, Palmquist A, Thomsen P. Inflammatory cell response to ultra-thin amorphous and crystalline hydroxyapatite surfaces. *J Mater Sci Mater Med.* 2017; 28:9.
102. Hamlet S, Ivanovski S. Inflammatory cytokine response to titanium chemical composition and nanoscale calcium phosphate surface modification. *Acta Biomater.* 2011; 7:2345–53.
103. Santarasci V, Cosmi L, Maggi L, Liotta F, Annunziato F. IL-1 and T helper immune responses. *Front Immunol.* 2013; 4:182.
104. Harada A, Mukaida N, Matsushima K. Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory diseases. *Mol Med Today.* 1996; 2:482–9.
105. Wang JY, Wicklund BH, Gustilo RB, Tsukayama DT. Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokines by human monocytes/macrophages in vitro. *Biomaterials.* 1996; 17:2233–40.
106. Kaji K, Katogi R, Azuma Y, Naito A, Inoue JI, Kudo A. Tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced osteoclastogenesis requires tumor necrosis factor receptor-associated factor 6. *J Bone Miner Res.* 2001; 16:1593–9.
107. Pascual A, Tsukayama DT, Wicklund BH, Bechtold JE, Merritt K, Peterson PK, Gustilo RB. The effect of stainless steel, cobalt-chromium, titanium alloy, and titanium on the respiratory burst activity of human polymorphonuclear leukocytes. *Clin Orthop Relat Res.* 1992:281–8.
108. Jacobi-Gresser E, Huesker K, Schütt S. Genetic and immunological markers predict titanium implant failure: a retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013; 42:537–43.
109. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT. Human monocyte response to particulate biomaterials generated in vivo and in vitro. *J Orthop Res.* 1995; 13:792–801.

110. Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, Guenounou M, Laurent-Maquin D, Phillips TM. Importance of the surface area ratio on cytokines production by human monocytes in vitro induced by various hydroxyapatite particles. *Biomaterials*. 2005; 26:2361–9.
111. Curran J, Gallagher J, Hunt J. The inflammatory potential of biphasic calcium phosphate granules in osteoblast/macrophage co-culture. *Biomaterials*. 2005; 26:5313–20.
112. Lange T, Schilling AF, Peters F, Haag F, Morlock MM, Rueger JM, Amling M. Proinflammatory and osteoclastogenic effects of beta-tricalciumphosphate and hydroxyapatite particles on human mononuclear cells in vitro. *Biomaterials*. 2009; 30:5312–8.
113. Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1993; 178:2207–11.
114. Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol*. 1992; 148:1143–8.
115. D’Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med*. 1993; 178:1041–8.
116. Oppenheim JJ. IL-2: More Than a T Cell Growth Factor. *J Immunol*. 2007; 179:1413–4.
117. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12:180–90.



# Biografija

Dr Marko Magić rođen je u Beogradu 07.06.1985. godine.

Diplomirao je na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2011. godine sa prosečnom ocenom 8.69.

Školske 2011/2012 godine upisao je doktorske studije iz oblasti oralne hirurgije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Položio je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 9.75.

Angažovan je kao istraživač saradnik na Stomatološkom fakultetu u Beogradu, na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom: Hemijsko i strukturno dizajniranje nanomaterijala za primenu u medicini i inženjerstvu.

Objavio je 8 naučnih radova u recenziranim naučnim časopisima. Aktivni je učesnik domaćih i međunarodnih stručnih skupova na kojima ima 9 saopštenja.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а **Марко Магић**

број индекса **4015/2011**

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Утицај различитих модификација површине титана физичким и хемијским методама на његову цитокомпатибилност и имуномодулацијска својства**

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Марко Магић**

Број индекса **4015/2011**

Студијски програм **Докторске студије**

Наслов рада **Утицај различитих модификација површине титана физичким и хемијским методама на његову цитокомпатибилност и имуномодулацијска својства**

Ментор **Проф. др Сњежана Чолић**

Потписани/а **Марко Магић**

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**Утицај различитих модификација површине титана физичким и хемијским методама на његову цитокомпатибилност и имуномодулацијска својства**

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.