

A fogászatban széles körben alkalmazott  
tömőanyagok biológiai hatásai  
A TEGDMA mitokondriális toxicitásának kísérletes  
vizsgálata

Doktori értekezés

**Dr. Mikulás Krisztina Ágnes**

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Tretter László, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Tóth Zsuzsanna, egyetemi docens, Ph.D.  
Dr. Wunderlich Lívius, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Dobó-Nagy Csaba, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Végh András, egyetemi magántanár, Ph.D.  
Dr. Kardon Tamás, egyetemi docens, Ph.D.

Budapest

2019

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	4
1. Bevezetés.....	6
1.1 A fogászatban előforduló tömőanyagok jelene és a használatuk során felmerülő kérdések.....	6
1.2 Az amalgámok és kivezetésük .....	7
1.3 Üvegeionomer cementek létjogosultsága az amalgámok helyett .....	10
1.4 A műgyanta bázisú kompozitok .....	12
1.4.1 A kompozitok anyagtani összetétele .....	13
1.4.2 A polimerizációs zsugorodás.....	17
1.4.3 A kompozitok biokompatibilitása, a polimerizációs zsugorodás és a biodegradáció egyes következményei .....	18
1.4.4 A TEGDMA rezin monomer hatásai.....	20
1.4.5 A kompozitok fejlesztése.....	28
1.5 Bioenergetika .....	29
1.5.1 A mitokondrium felépítése és működése.....	29
1.5.2 A reaktív oxigénszármazékok .....	33
1.5.3 A mitokondriumok ROS képzése és a mitokondriumok szerepe a reaktív oxigén származékok képzésében.....	34
1.5.4 A mitokondriális ROS eliminációja .....	39
2. Célkitűzések .....	42
3. Módszerek .....	44
3.1 Mitokondrium preparálás.....	44
3.2 Mérési médium .....	45
3.3 A mitokondriális O <sub>2</sub> fogyasztás mérése.....	45
3.4 A mitokondriális membránpotenciál mérése ( $\Delta\psi_m$ ) .....	45
3.5 A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> és a NAD(P)H mérése párhuzamosan .....	46
3.5.1 A mitokondriális H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> és a NADP(H) termelés mérése.....	46
3.5.2 A mitokondriális H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> eliminációja.....	46
3.5.3 A redukált glutation fogyasztás mérése.....	47
3.6 Az ATP szintézis mérése .....	47

3.7	A mitokondriális Komplex I (CI) aktivitás mérés .....	48
3.8	Anyagok.....	48
3.9	Statikai analízis .....	49
4.	Eredmények.....	50
4.1	A TEGDMA hatása a mitokondriális légzésre .....	50
4.1.1	A CI-függő légzési szubsztrátok oxidációja.....	50
4.1.2	CII-függő légzési szubsztrát oxidációja .....	53
4.2	A TEGDMA hatása a mitokondriális membránpotenciálra ( $\Delta\psi_m$ ).....	55
4.3	A TEGDMA hatása a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> képzésére és eliminációjára .....	58
4.3.1	A mitokondrium H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelése NADH-termelő (CI-függő) légzési szubsztrátok esetén.....	58
4.3.2	A TEGDMA előkezelés hatása a ROS termelésre .....	60
4.3.3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> eliminációja a mitokondriumban NADH-t termelő szubsztrátok esetében 61	
4.3.4	A TEGDMA és a GSH közötti kölcsönhatás .....	63
4.3.5	A mitokondrium H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelése FADH <sub>2</sub> -termelő (CII-függő) légzési szubsztrátok esetén.....	64
4.4	A TEGDMA hatása a NAD(P)H szintre.....	66
4.5	A TEGDMA hatása az ATP szintézisre .....	69
4.6	A TEGDMA hatása a CI aktivitásra .....	70
5.	Megbeszélés .....	71
5.1	A TEGDMA hatása a mitokondriális légzésre .....	72
5.2	A TEGDMA hatása a mitokondriális membránpotenciálra ( $\Delta\psi_m$ ).....	73
5.3	A TEGDMA hatása a ROS homeosztázisra .....	74
5.3.1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelés NADH-termelő (CI-függő) légzési szubsztrátok esetén... 74	
5.3.2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelés FADH <sub>2</sub> -termelő (CII-függő) légzési szubsztrátok esetén (Succ és $\alpha$ -GP) és a reverz elektron transzport (RET) gátlásának következményei 76	
5.4	A Komplex I (CI) gátlása és a NAD(P)H szint kapcsolata TEGDMA-val kezelt mitokondriumokban.....	79
5.5	ATP termelés a TEGDMA-val kezelt mitokondriumokban .....	80
5.6	Komplex I aktivitás a mitokondriumokban TEGDMA jelenlétében .....	81
6.	Következtetések .....	83
7.	Összefoglalás.....	84

8. Summary .....	85
9. Irodalomjegyzék.....	86
10. Saját publikációk jegyzéke.....	109
11. Köszönetnyilvánítás .....	110

## Rövidítések jegyzéke

$\alpha$ -GP: alfa-glicerofoszfát

$\alpha$ -KG: alfa-ketoglutarát

$\alpha$ -KGDH: alfa-ketoglutarát dehidrogenáz

$\alpha$ -KGDHc: alfa-ketoglutarát dehidrogenáz komplex

$\alpha$ -GPDH :  $\alpha$ -glicerofoszfát-dehidrogenáz

AK: adenilát- kináz

ANT: adenin-nukleotid transzlokáz

AP5: P<sup>1</sup>,P<sup>5</sup>-di(adenozin-5') - penta-foszfát

ART: Atraumatic restorative treatment (atraumatikus restauratív technika)

BSA: bovine serum albumin (marha szérum albumin)

BisGMA: biszfenol A-glicidil dimetakrilát

CI: mitokondriális komplex I, NADH-koenzim Q oxidoreduktáz

CII: mitokondriális komplex II, szukcinát dehidrogenáz

CIII: mitokondriális komplex III, koenzim Q-citokróm c reduktáz

CIV: mitokondriális komplex IV, citokróm c oxidáz

CAT: karboxiatraktilát

DC: degree of conversion (konverziós mérték)

DMSO: dimetil-szulfoxid

DTNB: 5,5'-dithiobisz (2-nitrobenzoát)

$\Delta$ pH: a mitokondrium belső membránjának két oldala közötti pH gradiens

$\Delta\Psi_m$ : membránpotenciál

EGTA: etilén-glikol-bisz ( $\beta$ -aminoetil-éter)- N,N,N',N'-tetraecetsav

FET: forward electron flow; előre irányuló elektronáram

FCCP: karbonilcianid-*p*-trifluorometoxi-fenilhidrazon

GM: glutamát és malát

GSH: glutation

GSSG: glutation -diszulfid

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hidrogén-peroxid

HEPES: 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetánszulfonsav

HQME: hidrokinon-monometil-éter

HRP: horseradish peroxidase, tormaperoxidáz

KoA: koenzim-A

OXPHOS: oxidatív foszforiláció

P<sub>i</sub>: anorganikus foszfát

pmf: protonmotoros erő

RET: reverse electron flow; reverz elektrontranszport

ROS: reaktív oxigénszármazék

SDH: szukcinát-dehidrogenáz, komplex II

SLP: substrate level phosphorylation; szubsztrát szintű foszforiláció

Succ: szukcinát

TEGDMA: trietylén-glikol-dimetakrilát

UDMA: uretán-dimetakrilát

## 1. Bevezetés

### 1.1 A fogászatban előforduló tömőanyagok jelene és a használatuk során felmerülő kérdések

Az emberi élettartam folyamatos növekedése és a populáció egyre idősebbé válása miatt időtálló, biokompatibilis anyagokra van szükség a fogorvoslásban. A hiányzó fogszövetek és a fogak pótlására felhasznált anyagok sajnos még mindig nem felelnek meg mindenben az elvárásoknak. A direkt restauratív anyagok mechanikai tulajdonságai, biokompatibilitása és adhéziója a fogszövetekhez általában nem ideális, további fejlesztésre szorul. Az amalgám esetében ehhez hozzájárul a nem kedvező esztétika, illetve a tömés elkészítése és az eltávolítása során a keletkező veszélyes hulladék kezelése. 2013-ban az ENSZ Környezetvédelmi Programjában hangsúlyozta a higany emberi szervezetre és az embert körülvevő környezetre gyakorolt káros hatását [1]. Az Európai Unió 2017 májusában fogadta el a Minamata Egyezményen alapuló, higanyra vonatkozó rendeletét, amely a fogászati amalgám kivezetését szabályozza [2]. Az Európai Bizottság atraumatikus konzerváló kezelést (Atraumatic restorative treatment - ART) javasol a kezdődő fogszuvasodás ellátására higany-mentes anyagokkal [3], ezzel hangsúlyozva az üvegeionomer cementek (glass ionomer cements - GICs) fontos szerepét. Az üvegeionomer cementek használata költséghatékony, környezetbarát, megelőzheti a szekunder caries létrejöttét és segíti a dentin mineralizációját [4, 5]. Az elmúlt évtizedekben megnőtt az igény az esztétikus tömések iránt nemcsak a frontfogak, hanem az őrlőfogak esetén is [6]. A páciensek növekvő esztétikai elvárásai miatt a műgyanta (rezin) bázisú kompozitok kerültek előtérbe az őrlőfogak esetén is a konzervatív fogászatban [6]. A kompozíciós tömőanyagok szerves töltőanyagokból (pl. kvarc, kerámia, lítium-alumínium szilikát részecskék stb.), szerves rezin mátrixból (pl. biszfenol A-glicidil dimetakrilát (Bis-GMA), uretán-dimetakrilát (UDMA), trietilén-glikol-dimetakrilát (TEGDMA)), és a kettő közötti kötést biztosító szilánfázisból állnak [7-9]. A kompozitok az elmúlt időszakban jelentős fejlődésen mentek át, azonban biokompatibilitásuk megkérdőjelezhető, hiszen a mai napig nem megoldott a tökéletes polimerizációjuk. Ennek következménye a mechanikai és a kémiai degradáció [7, 9], amelynek során monomerek szabadulnak fel a tömőanyagból. A monomerek közül a TEGDMA a legnagyobb arányban kioldódó

monomer, amely az adhezívekből és a kompozitokból felszabadulva befolyásolhatja a sejtek metabolikus állapotát, DNS károsodást és apoptózist okozhat *in vitro* [10-16]. Az eredmények azt mutatják, hogy a rezin monomerek ártalmasak és kölcsönhatásba lépnek a specifikus sejtfunciók komplex szabályzó rendszerével. Még mindig kevés adat áll rendelkezésre a TEGDMA citotoxikus mechanizmusának pontos megértésére [9, 17], azonban az irodalomban leírt káros hatások felvetik egy közös mechanizmusnak a jelenlétét, amely megértésére kutatásunk középpontjába az izolált mitokondriumokat állítottuk.

A következő alfejezetekben röviden ismertetem az amalgám kivezetését és a lehetséges alternatívák tulajdonságait és szerepét a fogászatban, amelyek alkalmazása számos kérdést vet fel napjainkban a fogorvoslásban. Munkám célja, hogy az irodalomban leírt TEGDMA rezin monomer biológiai hatásainak hátterében megbúvó mechanizmusokra fényt derítsen, és ezt bemutassam a dolgozatomban. A disszertációban külön alfejezetet szánok a bevezetőben a bioenergetikának (1.5 alfejezet), mivel ez elengedhetetlenül fontos a TEGDMA toxikus hatásainak megértéséhez.

## 1.2 Az amalgámok és kivezetésük

A caries az egész világon elterjedt krónikus betegség, amelynek kezelése globálisan nagy kihívást jelent a közegészségügyben [18]. A fogszuvasodás a keményszövet demineralizációs és remineralizációs ciklusainak eredőjeként jön létre, ahol az elváltozás kezdetben reverzibilis, majd a mélybe jutva irreverzibilis roncsolódást okoz.

Az amalgámot már több mint 150 éve alkalmazzák a fogászatban a fogszuvasodás ellátására a fog keményszöveteinek helyreállításában, kedvező mechanikai tulajdonságai és a tartóssága miatt. Használata és sikerességi aránya jól dokumentált az irodalomban, költséghatékony tömőanyagként számít a kisórló- és órlózóna ellátásában. Visszaeső felhasználási tendenciája leginkább a nem esztétikus megjelenésével és a higanytartalmával függ össze [19]. Az amalgám egy vagy több fém higannyal alkotott ötvözet, ahol az amalgám összekeverése 60% fémreszelékből és 40% higanyból történik. A leggyakrabban felhasznált amalgámötvözetek jellemzően 40-70% ezüstöt, 12-30% ónt, 12-30% rezet, 0-5% indiumot, 3% higanyt és elenyésző mennyiségű (1%)



cinket és palládiumot (1%) tartalmaznak [20]. A konvencionális amalgám megkeverésekor az ezüsből és ónból álló gamma fázis ( $\gamma$  fázis) kapcsolatba kerül a higanyal és két új fázis jön létre: az ezüsből és higanyból álló  $\gamma_1$ , illetve az ónból és a higanyból álló  $\gamma_2$  fázis [21]. Megkülönböztetünk alacsony (2-5%) réztartalmú konvencionális és magas (12-30%) réztartalmú,  $\gamma_2$ -fázis mentes amalgámokat a réztartalom alapján [21]. Mindkét csoportra jellemző a kémiai és az elektrokémiai korrózió, amely nemcsak a tömésben levő repedések mentén, hanem a plakkal borított tömés felszínén is létre jöhet [22].

Az amalgám sok összetevője közül a higanytartalom miatt tört ki az „amalgám háború”, ahol az emberi szervezetet ért káros hatások megítélése már a kezdetektől fogva nem egységes. A higany a bőrrel való érintkezéssel, inhalációval, a táplálékkal és a placentán keresztül kerülhet be az emberi szervezetbe [23]. A tömésekből felszabaduló higany a reakcióba nem lépett higany párolgásával ill. a  $\gamma_1$ -fázis fokozatos átalakulásával van összefüggésben. A higanyleadás mennyiséget a rágás, a parafunkciók, a fogmosás, a korrózió és más fémötvözetek jelenléte (elektrokémiai korrózió) emelheti meg. Ennek mértéke szoros összefüggésben áll a szájüregben levő amalgámtömések számával, az életidejünkkel, a tömések felületének nagyságával és nem utolsósorban a fogcsikorgatással (stresszkorrózió) [24]. Az amalgámok esetében az elemi és szerves higany (Hg) felszabadulása jellemző, ahol a nyálból a tápcsatornába kerülő és felszívódó higany mennyisége elenyésző [25, 26]. Az étellekkel (főként tengeri halak fogyasztása következtében) szerves és leggyakrabban metilezett higany (MeHg) ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) formában jut be a Hg a szervezetbe és tovább a táplálékláncba [26]. Az élelmiszerrel bevitt, táplálékból felszívódó szerves higany mennyisége hatszorosa a már elkészült amalgámtömésekből felszabaduló szerves higany felszívódásának [27]. A higany nemcsak a fogászatban felhasznált amalgámötvözetekben fellelhető, hanem felszabadulhat még például az oltóanyagokból és az energiatakarékos izzólámpákból [23]. A higany toxicitása az egész világot súlytó probléma, mivel számos neurológiai problémát, kognitív zavarokat és autoimmun betegségeket okozhat [23, 26].

Az egész világot foglalkoztató „amalgám kérdés” és „amalgám háború” nagy befolyással van a fogászati tömőanyagok felhasználására és folyamatos fejlesztésére. A fogászati amalgámmal kapcsolatos problémák két csoportra oszthatók. Az amalgámmal kapcsolatos legnagyobb veszély az amalgám tömések eltávolítása a szekunder caries

vagy csonkfelépítés miatt merül fel, mivel ilyenkor a higany a tömések eltávolításával a fogászati kezelőegységen keresztül a csatornarendszerbe, míg a szelőztetés során a levegőbe jut. A keverés közben higanygőz keletkezik, ami ellen a tökéletesen záródó kapszulás kiszerezés nyújthat védelmet. A tömés kondenzálásakor, a polírozásnál és a restaurátumok eltávolításánál javasolt vízűtést, elszívót és kofferdam-izolálást alkalmazni. A helytelenül tárolt és fel nem használt amalgám maradék esetében is higany szabadulhat fel. A fogászati rendelőből kikerülő higany környezetre való káros hatása kevésbé vitatott. Az amalgám-szeperatorok használatával jelentősen csökkenthető a vizekbe jutó higany mennyisége [28]. A fogorvosokat és a fogászatban dolgozó egészségügyi szakembereket a higany felszabadulása fokozottabban terheli, ez azonban a nemzetközi irodalom alapján nincs egyértelmű összefüggésben a feltételezett mellékhatásokkal [29, 30]. Az amalgámtömésekkel összefüggésben felmerülő káros hatásokról - a stroke-ról és a szív-, érrendszerrel összefüggő megbetegedésekről, a neurotoxicitásról, a vesekárosodásról és a sclerosis multiplexről - szóló feltételezések nem igazolódtak be az [31-33]. A páciensekre gyakorolt hatást illetően az elvégzett vizsgálatok során nem sikerült semmilyen összefüggést találni az egyes tünetek, betegségek és a szájban meglévő amalgámtömések között [21, 31-35], csak allergia esetén vet fel az alkalmazása problémákat. A higanyallergia előfordulása szerencsére nagyon ritka, aminek előfordulását bőrpróbával lehet igazolni [34]. Az amalgámtömések körül előforduló orális lichenoid lézió általában egyoldali megjelenésű, lokális mellékhatás [36].

A fogászati amalgámban előforduló higany mennyiség jelenti az Unióban a legnagyobb mértékű higanyfelhasználást. A tömés elkészítése és eltávolítása során a higany a csatornahálózatba kerül, ezáltal jelentős környezetszennyező forrás. Az Európai Unió 2017 tavaszán fogadta el a Minamata Egyezményen alapuló Higanyra vonatkozó Szabályozást [2]. „A rendelet a higany, a higanyvegyületek és a higanykeverékek felhasználására és tárolására, valamint kereskedelmére, a hozzáadott higanyt tartalmazó termékek gyártására és felhasználására, valamint kereskedelmére, továbbá a higanyhulladék kezelésére vonatkozó intézkedéseket és feltételeket állapít meg annak érdekében, hogy biztosított legyen az emberi egészség és a környezet magas szintű védelme a higany és a higanyvegyületek antropogén eredetű kibocsátásaival szemben”

[2]. A szabályzat magába foglalja az amalgám használatának csökkentését (a kapszulázott forma előírását, az amalgámszeparátorok kötelező alkalmazását stb.), a tagországok felhívását saját nemzeti program kidolgozására, amely az amalgám teljes kivezetésének tervét mutatja be. A WHO szerint az amalgám elhagyása az alternatívák minőségi fejlesztésétől függ. Az adhezív fogászat a leggyorsabban fejlődő és változó területe a fogászatnak, ami nagy valószínűséggel a közeljövőben is fontos kérdés marad, ezért átfogó tanulmányokra van szükség a kompozitok biokompatibilitását tekintve [37, 38].

A fogászatban előforduló tömőanyagokat csoportosíthatjuk a felhasználásuk alapján. Az indirekt restaurációkat a fogtechnikai laboratóriumban készíti el a technikus a mintán. A direkt restaurációkat ezzel ellentétben a fogorvos készíti el a szék mellett. Az indirekt restaurációk anyagául szolgálhatnak pl. nemesfém ötvözetek, kerámiák és kompozitok. A plasztikus tömőanyagok csoportjába tartoznak az amalgámok, az üvegeionomer cementek, a rezinnel módosított üvegeionomer cementek, a rezin bázisú kompozitok, a kompomerek és az ormocerek. Számos fémötvözet és esztétikus kerámia áll rendelkezésre az indirekt restaurációkhoz, amelyek ugyan hosszútávú megoldást nyújtanak a páciensek számára, azonban nagyon költségesnek számítanak. Véleményünk szerint az indirekt eljárások a magas költségeik miatt nem váltják ki a direkt eljárásokat, főleg a közfinanszírozott rendelőkben, mivel ez irreális költségeket jelentene a pácienseknek a finanszírozott eljárásokkal szemben. Az amalgám kivezetése során fontos szerepet töltenek be a mindennapos fogászati ellátásban az üvegeionomer cementek (1.3 alfejezet) és a rezin bázisú kompozitok (2.4). Disszertációm az amalgám lehetséges alternatívájaként szereplő kompozitokra teszi a fő hangsúlyt, és azok nemzetközi irodalomban említett toxikus hatásainak háttérében álló biokémiai mechanizmusokra keresi a választ a kísérletek alapján.

### **1.3 Üvegeionomer cementek létjogosultsága az amalgámok helyett**

Az üvegeionomer cementek por komponense kalcium-alumínium-fluor-szilikát vagy stroncium-alumínium-fluor-szilikát üveg. A folyadék állhat poliakrilsavból vagy más összetett molekulából pl. itakonsav, maleinsav vagy metakrilsav [39]. A por és a

folyadék összekeverésével egy háromfázisú sav-bázis reakció jön létre, amelynek során az anyag megkeményedik; kalcium-, alumínium- és fluorid ionok szabadulnak fel, amikor a sav reagál az üvegrészecskékkel [39,40]. Az ionok leadása folytatódik a reakció után is, és függ a környező kémhatástól. A felszabaduló fluoridionok remineralizációs hatással bírnak, a zománcba beépülnek és ezzel megelőzhetik a szekunder caries kialakulását [4, 5]. Az üvegeionomer tömések előnyös tulajdonsága, hogy kémiaiilag kötnek a fog felszínéhez, és nem változik a térfogatuk a kötési folyamat során, kivéve a fényrekötő változatokat [4]. A tömőanyag hidrophil, nedvességtűrő, a tömés elkészítése kevésbé technikaszennitív, mint a kompozit töméseké. A hagyományos üvegeionomer cementekhez metakrilát műgyantabázist (rezin) adtak hozzá a szilárdságuk fokozására [4, 41], vagy magas viszkozitású üvegeionomer cementeket illetve fényrekötő felületi lakkokkal kombinált termékeket javasolnak a restaurációk elkészítéséhez. Ezek az anyagok magasabb hajlítószilárdsággal rendelkeznek továbbá kopásállóbbak, mint a hagyományos üvegeionomer cement tömések [5, 41]. Az anyag alkalmazása költséghatékony, környezetbarát, csökkenti a szekunder caries előfordulását és elősegíti a dentin mineralizációját [39]. A magas viszkozitású üvegeionomer cementek indikációs területe jelenleg a minimál invazív, atraumatikus restauratív kezelési technikák (például a preventív célú barázdazárás maradófogokban vagy a restauratív célú egyfelszínű tejfog tömés stb.) [4]. Ennek a minimál invazív beavatkozásnak az a célja, hogy megelőzze a caries léziók kialakulását, illetve megakadályozza azok mélyebbre terjedését a dentinbe. További szerepe, hogy a dentinben előforduló szuvas léziókat minimál invazív úton állítsa helyre. Kielbassa és mtsai összefoglaló közleményükben kifejtik, hogy a rezin bázisú lakkal bevont üvegeionomer cement restaurációk elkészítése ígéretes amalgám alternatívaként szolgálhat a szuvas lézió kiterjedésétől függően. Jelenleg a nagy kiterjedésű, többfelszínű tömések esetében (maradófogak a moláris zónában) nem javasolt az üvegeionomer cementek alkalmazása, azonban az egyfelszínű tömések esetén költséghatékony megoldásnak számítanak [5, 42]. Egyre több prospektív klinikai összehasonlító vizsgálat jelent meg a közelmúltban a magas viszkozitású üvegeionomer cementek és a különböző nanorészecske-töltöttségű, rezin bázisú védőlakkok kapcsán. Az eredmények biztatóak, azonban további követéses vizsgálatok szükségesek a magasabb evidenciájú eredmények miatt [5].

## 1.4 A műgyanta bázisú kompozitok

A fogászatban az esztétikai és funkcionális követelményeknek megfelelően széles körben használnak kompozitokat a fog caries, fraktúra és erózió okozta, megbomlott szöveti struktúrájának élethű helyreállítására. A kompozit tömések legnagyobb hátránya az amalgámhoz képest a polimerizációs zsugorodás, a tömés készítése során és utána kioldódó rezin monomerek felszabadulása, a fokozott plakk akkumuláció és a nagy arányban előforduló szekunder caries előfordulása [43]. A kompozit tömés elkészítése az amalgámhoz képest technika szenzitívebb [44]. Kevés hosszú távú összehasonlító vizsgálat áll rendelkezésre a kompozit tömések tartósságáról más tömőanyagokkal összehasonlítva, amelyet sok tényező befolyásol. A nemzetközi irodalomban több közlemény támasztja alá, hogy az amalgámtömések tartósabbak (átlagos élettartamuk 6-16 év), mint a műgyanta (rezin) alapú kompozit tömések (5-7 év) [45, 46]. Ezzel szemben Opdam és mtsai, Palotie és mtsai az őrlőfogakba készített kompozit tömések esetén az amalgámhoz hasonló sikerességet figyelt meg. Ez valószínűleg az újabb kompozit tömőanyagok megjelenésének és a fejlesztéseknek köszönhető, mivel a mechanikai tulajdonságaik jelentősen javultak [6, 47, 48]. A Cochrane adatbázisában Rasines Alcaraz és mtsai metaanalízise 3265 kompozit tömést és 1935 amalgámtömést hasonlított össze maradó őrlőfogak esetén 10 közlemény alapján. A szerzők hangsúlyozzák, hogy a kompozitok esetén több hiba fordul elő, és magasabb a rizikó a szekunder caries előfordulására, mint az amalgámtömések esetében, azonban ezek az eredmények alacsony evidenciájúak. A szerzők nem találtak elegendő bizonyítékot az amalgám és a kompozit tömések kapcsán felmerülő káros hatások bizonyítására sem (pl. a kiválasztást befolyásoló, neurodegeneratív hatás stb.). Több hosszú távú követéses vizsgálatra van szükség a legmodernebb fejlesztésű kompozitokkal és a legújabb technikákkal, műszerekkel, hogy az eredmények megfelelő evidencián alapulhassanak [49]. Lempel és mtsai 10 éves követéses vizsgálat során hasonlítottak össze II. osztályú kavitásba készült, négyféle mikrohibrid kompozitot. Mind a négyféle mikrohibrid tömés elfogadható klinikai tartósságot mutatott a tíz éves követési periódusban, ahol a túlélési ráta > 97.8% volt. A kompozit tömések hibáinak hátterében leggyakrabban a szekunder caries és a törés állt [50].

Az elmúlt időszakban az őrlőfogakba készülő nagyméretű, rezin alapú kompozit tömések elkészítési technikájának egyszerűsítése és felgyorsítása érdekében „bulk-fill” kompozitokat állítottak elő a gyártók az iniciátor rendszer optimalizációjával illetve a töltőanyag összetétel (nagyobb méretű fillerek vagy transzlucens fillerek) megváltoztatásával. Ezek az anyagok akár egy rétegben aplikálhatók az üregbe, és egy lépésben megvilágíthatók. Használatukkal időt lehet spórolni a tömés elkészítése során, azonban a biokompatibilitásuk, a mechanikai és az esztétikai tulajdonságaik nem jobbak a hagyományosan tömöríthető kompozitoknál és élettartamuk sem olyan hosszú, mint az amalgámoké [51, 52].

#### **1.4.1 A kompozitok anyagtani összetétele**

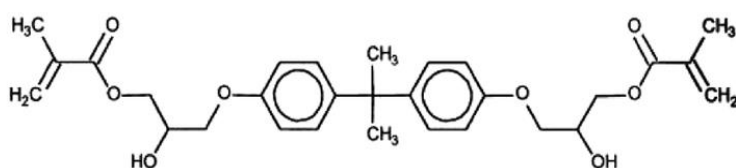
A kompozitok rezin bázisú restauratív anyagok, amelyek a fogászatban nélkülözhetetlen szerepet játszanak a fog keményszöveteinek funkcionális és élethű esztétikai helyreállításában [8]. A 60'-as években való megjelenésük óta jelentős fejlődésen mentek keresztül, azonban a mai napig nem megoldott a polimerizációjuk, aminek következménye a mechanikai és kémiai degradáció, ami az anyag összetételében keresendő. 1962-ben Rafael Bowen fejlesztette ki a hidrofób dimetakrilát monomert, az A-glicidil dimetakrilátot (Bis-GMA), amely meghatározó alkotóeleme a rezin bázisú restauratív anyagoknak [52]. A rezin bázisú esztétikus tömőanyagok három különböző alkotóelemből állnak: szerves mátrix fázisból, szerves anorganikus diszperz fázisból (töltelékanyagból) és kapcsoló fázisból, ami a mátrixot a töltelékanyaghoz kapcsolja (szilán fázis). Az iniciátor-akkcelerator rendszer szintén fontos eleme a kompozitoknak, mivel ez indítja be a polimerizációt [53, 54].

##### **1.4.1.1 Szerves mátrix**

A fogászatban széleskörűen alkalmazott rezin monomerek elegye (Bis-GMA, TEGDMA, HEMA (hidroxietil-metakrilát), UDMA) jó mechanikai tulajdonságokat, gyors polimerizációt, könnyű kezelhetőséget és a zománchoz való rögzülést tesz lehetővé az esztétikus tömőanyagokban, a bondrendszerekben és a rögzítő cementekben [55]. Ezek a molekulák reaktív kettőskötéssel rendelkeznek mindkét végükön. A

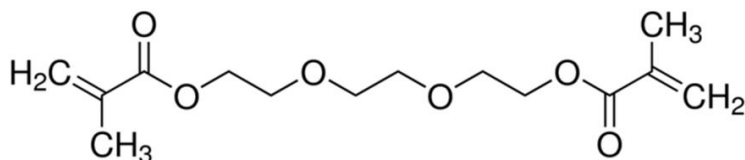
polimerizáció során a monomer alegységekből keresztkötéseket tartalmazó térhálós polimerhálózat alakul ki, ami a fotoiniciátorokat tartalmazó esztétikus tömőanyagok esetében fény hatására (468 nm hullámhosszon) következik be [56, 57]. Az elkészült kompozit tömésekben maradó, nem reagált monomerek csökkenthetik az anyagok klinikai tartósságát, oxidáció és hidrolitikus lebomlásuk révén a tömések elszíneződését és kopását fokozhatják. A folyamatos anyagfejlesztés következtében egyre javulnak a kompozitok tulajdonságai, azonban elengedhetetlenül fontos az adott gyártó leírásának megfelelően a polimerizálási idő betartása [54, 57-60]. A polimerekből felszabaduló anyagok (pl. adalék anyagok, monomerek, lebomlási termékek) irritálhatják a lágyszövetet, baktérium akkumulációt és allergiás reakciót okozhatnak [61]. Geurtsen részletesen tanulmányozta a fogászati rezin molekulák kioldódását és a néhányuk által okozott in vitro citotoxikus, genotoxikus, mutagén és ösztrogénszerű hatásokat illetve a fogbélüregre, a fogínyre és az orális mukózásra való mellékhatásokat [53].

A korábban alkalmazott kompozitok metakrilát bázisúak voltak, amelyek szilikátokat és üveggömböcskéket tartalmaztak. Az esztétikus restauratív anyagokban előforduló egyik leggyakoribb monomer a Bis-GMA, amely nagy molekulatömegű (molekuláris tömeg (MW) = 512 g) nagyon reaktív és erősen viszkózus vegyület. A magas viszkozitás miatt alacsony konverziós mértéket (degree of conversion = DC) eredményez a monomer jelenléte a molekula csökkent diffúziós képessége miatt [62] (1. ábra). A Bis-GMA a hozzáadott töltelékanyag mennyiségét is befolyásolja ezáltal [55]. A tömőanyagokban levő monomerek polimerizációs arányát a DC értékükkel jellemezhetjük, amely a rezin monomerek alifás, telítetlen kettős kötéseinek telített kötéssé való átalakulásának %-os arányát mutatja meg. Ez az érték a felhasznált kompozittól függően változhat 35-77%-ig és befolyásolhatja az anyag biokompatibilitását, továbbá a mechanikai és esztétikai tulajdonságait [63]. A fejlesztéseknek köszönhetően a piacon jelenleg már számos, nem-bisfenol A metakrilát bázisú kompozit is elérhető a fogászatban [63], amelyre nem tértek ki részletesen a disszertációban.



**1. ábra:** A Bis-GMA szerkezeti képlete (forrás: [https://www.google.hu/search?q=Bis-GMA&rlz=1C1GGRV\\_enHU751HU751&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKewjfpYuNm\\_zdAhXOI1AKHZA0CXEQ\\_AUIDigB&biw=1920&bih=938#imgrc=vSW5gYNWWeffFM](https://www.google.hu/search?q=Bis-GMA&rlz=1C1GGRV_enHU751HU751&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKewjfpYuNm_zdAhXOI1AKHZA0CXEQ_AUIDigB&biw=1920&bih=938#imgrc=vSW5gYNWWeffFM) (accessed: 2018.10.10.)

A viszkozitás csökkentése céljából alacsony molekulású, hígító komonomert, TEGDMA-t (2. ábra) (MW = 286 g) is adnak az esztétikus tömőanyagokhoz. A TEGDMA előfordulási gyakorisága a kompozitokban, a rezin bázisú üveginomer cementekben és a bond rendszerekben magas, 25-50%. [10, 64]. A TEGDMA amfipatikus molekula (2. ábra), amely alacsony viszkozitása miatt pozitívan befolyásolja az anyag szerkezetét és lehetővé teszi a töltőanyag koncentráció növelését [8, 10]. Nagyobb mennyiségben nemkívánatos tulajdonsága a polimerizációs zsugorodás fokozása, amelynek következménye a tömés élettartamának csökkenése [54, 65]. A Bis-GMA polimerizációs zsugorodásával (5.2%) összehasonlítva, a TEGDMA 12.5%-os térfogat zsugorodással bír [66].



**2. ábra:** A TEGDMA szerkezeti képlete (forrás: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/261548?lang=hu&region=HU> (accessed: 2018.10.10.)



Az elmúlt időszakban a monomer alternatívák fejlesztése a polimerizációs zsugorodás és a polimerizációs stressz csökkentését célozta meg, amely a széli résképződést okozhatja a bondozott felszíneken [52].

#### **1.4.1.2 Anorganikus töltelék fázis**

A fogászati rezin alapú kompozit szerves töltőanyagokból áll, amelyek nagymértékben befolyásolják az esztétikus tömőanyagok mechanikai tulajdonságait: a keménységet, a hajlítószilárdságot, az abráziós ellenállást, a polírozhatóságot, de jelentős hatással vannak a tömőanyag esztétikai tulajdonságaira (refrakciós tulajdonságok) és a polimerizációs zsugorodásra is. A fillerek mennyisége és tulajdonságai fontos meghatározói a tömőanyag esztétikai, fizikai és kémiai tulajdonságainak, ami a részecskék változatos méretének és morfológiájának is köszönhető. A kisebb töltőanyag méret például jobb polírozhatóságot és kopásállóságot biztosít. A leggyakrabban alkalmazott fillerek a kvarc, a szilikon-dioxid, a bórszilikát, a lítium-alumínium-szilikát [54]. Sugárelnyelő képességük miatt (a bárium, stroncium, cirkónium tartalom) a röntgenfelvételeken jól kontrollálható a restaurációk széli záródása, ami lehetővé teszi a szekunder caries felismerését a klinikailag nem vizsgálható felszíneken. A kompozitok csoportosítása történhet a monomerbázis alapján, a töltőanyag részecskemérete szerint (konvencionális töltőanyagok, mikrotöltőanyagok, nanofillerek, mikrotöltőanyag komplexek), a töltőanyag eloszlása szerint (homogén, inhomogén, hibrid, mikrohibrid, nanohibrid kompozitok stb.) és a konzisztenciájuk alapján [67, 68]. A terjedelmi korlátok miatt nem tárgyalom részletesen ezeket a csoportosításokat.

#### **1.4.1.3 Kapcsoló molekula, iniciátor rendszerek, polimerizáció**

A kapcsoló molekula (szilán) alkalmazása a szerves rezin mátrix és a szerves töltőanyag részecskék egymáshoz való kapcsolódását teszi lehetővé [54]. Az epoxi-, vinil- és metilszilánok a fillerek és a rezin molekulák között a felületi feszültség csökkentésével teremtik meg a kapcsolatot. A kompozitok további komponensei az iniciátor-akcelerátor rendszerek. Az iniciátor rendszerek indítják be a polimerizációs folyamatot, amely szabadgyök képződéssel kezdődik. A fényrekötő rendszereknél egy

468 nm hullámhosszúságú fényforrás hatására indul el a reakció a fotoiniciátorok (kámforkinonok-CQ) segítségével [69]. Egy bizonyos koncentrációig az iniciátorok arányának növelésével javítani lehet a szabadgyök képződést és a tömések mechanikai tulajdonságait, azonban a molekula sárgás színe befolyásolhatja a tömések színét [70]. A polimerizáció kezdetén a fotoiniciátor molekulák felbomlanak, miközben a keletkező szabadgyökök felszakítva a monomer molekulák kettőskötéseit aktiválják azokat, amelyek a többi monomer kettőskötéseit szakítják fel a láncreakció sorozatban. A polimerizációs fázisban keresztkötések és lánc elágazódások alakulnak ki. A folyamat során térhálós polimer keletkezik, aminek következtében csökken a molekulák közti távolság és ez zsugorodáshoz vezet. Ennek hatására belső feszülés és stressz alakulhat ki az anyagban az üregbe való adhezív rögzítés során [68, 71]. A zsugorodás következtében kialakuló stressz szorosan összefügg a kompozitok fogszövethez való ragasztásával. Ez deformációt, széli résképződést és mikrorepedéseket okozhat a restaurációkban. A fényhatás következtében kialakuló polimerizálódás még folytatódik a későbbiekben, maximum 24 óráig a sötétben is [72]. A kompozitok még tartalmaznak egyéb adalékanyagokat is, mint például: ko-iniciátor, inhibitor, pigmentek, stabilizátor stb.

#### **1.4.2 A polimerizációs zsugorodás**

A kompozit restaurátumok készítésénél a legnagyobb problémát a polimerizációs zsugorodás okozza, melynek előfordulási aránya 2-6% a konvencionális metakrilát alapú kompozitok esetén [73, 74], míg az új típusú nem-bisfenol A metakrilát alapúaknál az érték lehet kisebb [52, 54]. A polimerizációt számos tényező befolyásolja mint pl.: a megvilágítási idő, a fény intenzitása, a tömőanyag színe és rétegvastagsága, a levegő oxigénje és nem utolsósorban a monomer tulajdonságai, amely tényezőkre nem tértek ki dolgozatomban [8, 75]. Davidson és de Gee kísérleteik alapján megállapították, hogy a töméskészítés kezdeti fázisában a kötés elején a legnagyobb a zsugorodás, ilyenkor az anyag még deformálódásra hajlamos. Ebben a lépésben csak a láncformák alakulnak ki, ahol a molekulák még elmozdulhatnak, majd egy későbbi fázisban az anyag megkeményedik, csökken a kontrakciója, a deformálódásra való hajlama és a

zsugorodás [76]. A polimerizáció azonban sosem tökéletes és mindig maradhatnak telítetlen reziduális monomerek, amelyeknek a felszabadulása és kioldódása a tömés elkészítése után is jellemző a biodegradáció és az erózió kapcsán.

### **1.4.3 A kompozitok biokompatibilitása, a polimerizációs zsugorodás és a biodegradáció egyes következményei**

A fogászati anyagok biokompatibilitása az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb érdeklődést keltett a nemzetközi irodalomban [77]. A biokompatibilitás azt jelenti, hogy a gazdaszerkezetbe épített bioanyag hosszútávon funkcióstabil és megőrzi az eredeti tulajdonságait a használat során, továbbá megmutatja, milyen hatást gyakorol a szerkezet szöveteire funkció közben [78].

Ahogy azt korábban az amalgámok kivezetése fejezetben (1.2) említettem, napjainkban a kompozitok egyre nagyobb szerephez jutnak a fogászatban. A kompozitok elmúlt időszakban való jelentős fejlődése ellenére megkérdőjelezhető a biokompatibilitásuk, amelynek oka az elégtelen polimerizáció mellett a hosszútávú kémiai és biológiai degradációjuk [7]. A polimerizációs zsugorodás, a kioldódó metakrilát monomerek (TEGDMA, UDMA, HEMA, Bis-GMA stb.) és a kompozitok degradációja (kémiai, mechanikai, enzimatis, fényhatásra és hőhatásra kialakuló) felelősek a fő klinikai hátrányokért, mint a fog és a tömés határán kialakuló *mikroleakage* következtében jelentkező *locus minoris resistanciae* [66]. A monomerek elsősorban az inkomplett polimerizáció során szabadulnak fel [7, 79, 80], azonban monomer kioldódás fordulhat elő a degradáció és az erózió során is, amely a tömés egész élettartama alatt jelentkezik [53, 79, 81, 82]. A polimerizációs zsugorodás lehet a fő oka a posztoperatív fájdalomnak, a mikrorepedéseknek, a csücsök letörésnek, a restauráció és a fog felszíne között kialakuló mikro résznek, ami kedvez a szekunder caries kialakulásának [57, 83-85]. A koleszterin-észteráz és a pszeudo-kolinészteráz képesek lebontani a kompozit tömőanyagok monomer alkotórészeit, amelyek ezután metakril molekulák felszabadulását eredményezhetik [80, 86]. A polimerek degradációs mechanizmusait több közlemény tárgyalja [80, 82, 87], melyet nem részletezek a terjedelmi korlátok miatt. Kivételt képez a bisfenol A (BPA) rövid tárgyalása, amit fontosnak tartok, mivel

az egyik legnagyobb mennyiségben gyártott vegyület a világon [88] és a kompozitok biodegradációja során is felszabadulhat. A biszfenol-A-etoxilát-dimetakrilátot (BisDMA) tartalmazó rezin bázisú kompozitokból (ami általában a barázdázáró anyagokban fordul elő) [89-92] a hirdrolitikus és enzimikus folyamatok hatására BPA és metakrilsav oldódik ki a nyálba [92]. Ez jellemzően a tömések elkészítését követő 24 órában történik, majd ezután kis mennyiségben folyamatosan szabadulhat még fel [92]. Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) 2015-ben meghatározta azt a kritikus ideiglenes BPA felszabadulás határértéket a szájüregben ( $4\mu\text{g}/\text{testsúly kg}/\text{nap}$ ), amely a vesében elváltozásokat okozhat [93]. Az Új és Újonnan Azonosított Egészségügyi Kockázatok Tudományos Bizottsága (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR)) „A bisphenol A biztonságossága az orvosi eszközökben” című összefoglalójában (2015) leírja, hogy a fogászati anyagokból hosszútávon felszabaduló BPA mennyisége alatta van a tolerálható értéknek és elhanyagolható egészségügyi mellékhatásokkal jár (EFSA) [93].

A szájüregi flóra savtermelő baktériumai által termelt sav oldja a fog keményszövetét és gyengíti a kompozit töméseket. A kariogén bakteriális adhézió és a biofilm akumuláció a tömőanyagok felszínén szoros összefüggésben áll a szekunder caries kialakulásával [94]. A legnagyobb arányú dentális plakk képződés a kompozit tömések felszínén jellemző összehasonlítva az amalgám- és az üvegeionomer restaurációkkal [95]. A rezin bázisú kompozitok metakrilát polimer összetétele lehetővé teszi a nyál proteinek tapadását és a baktériumok kolonizálódását supra- és subgingiválisan is, ezért elősegítheti az ínygyulladást és a bakteriális plakk lokális felhalmozódását [96]. A kompozitokból felszabaduló -BisGMA és a TEGDMA- bomlástermékei megváltoztathatják *S. mutans* proliferációját és anyagcseréjét, így elősegíthetik a biofilm képződését [97]. A biofilm keletkezése során a kariogén baktériumok okozta savtermelés megváltoztathatja a kompozit felszínét, porózusabbá és érdesebbé téve tovább fokozhatja a baktériumok tapadását és retencióját [98].

Ramezani és mtsai *in vivo* kimutatták, hogy az amalgám és a kompozit restaurációk esetén megnövekedik a nyálban a totál antioxidáns kapacitás (TAC) (a nyál egyik diagnosztikus biomarkere a totál antioxidáns kapacitás) szintje, mivel az esztétikus tömésekből kioldódott rezin molekulák ill. az amalgámtömésekből kioldódó Hg

hatására fokozódik az oxidatív stressz a szájüregben. A kompozitok esetében a megnövekedett oxidatív stressz következtében a nyál  $\text{Ca}^{2+}$  ion szintje is kifejezettebben csökken, mint az amalgámoknál. Ez veszélyeztetheti a fog keményszöveteinek remineralizációját a demineralizációs fázist követően. Ezért a fogorvosoknak fel kell hívnia a páciensek figyelmét, hogy nagyobb hangsúlyt fektessenek a szájhygiénére a tömés elkészülése után [99].

Mivel a kompozitok sok különböző alkotóelemből állnak, ezért nagyon nehéz megítélni a toxicitásukat, amelyet az irodalomban *in vitro* körülmények között gingivális fibroblasztokon vizsgáltak a legtöbb esetben. A monomerek és a kompozitok számos összetevője esetén is felmerül az allergia szerepe a káros hatások hátterében. A szabad monomerek előfordulása az emberi szervezetben elenyésző koncentrációjú és valószínűleg nem mutatható ki szisztémás káros hatás az allergiától eltekintve [9]. A monomerek citotoxicitását és genotoxicitását az elmúlt évtizedekben kiterjedten tanulmányozták. A legtöbb tanulmány a rezin összetevőknek a sejtek alapvető funkcióira való hatását vizsgálta: pl. a sejtproliferációt, az enzimaktivitások gátlását, a sejtmembrán integritását, a sejt metabolizmusát (DNA-, RNA- és a fehérje szintézist), a sejt életképességét, a genotoxicitást és az ösztrogénszerű hatásokat stb [87]. Ezeket a hatásokat már Geurtsen – [81] és Schweikl és mtsai [100] részletesen összefoglalták. A legtöbb tanulmányban a monomerek toxikus hatásait sejt kultúrákon vizsgálták, ahol a monomerekre nézve a citotoxicitás sorrendje a következő volt: BisGMA > UDMA > TEGDMA > HEMA [53, 87].

A fogászati anyagok kapcsán végzett biokompatibilitásra irányuló kutatások száma napjainkban egyre nő, amelyek a leggyakrabban *in vitro* citotoxicitást és genotoxicitást vizsgáló módszerek. A téma releváns; egyre fokozódik az érdeklődés az irodalmi adatok kapcsán nemcsak a kutatókban, hanem a fogorvosok körében is.

#### **1.4.4 A TEGDMA rezin monomer hatásai**

A preventív- és a konzerváló fogászatban, továbbá a fogpótlások ill. fogszabályozó készülékek rögzítésekor a ragasztó cementekben is előfordulva nagy jelentőséggel

bírnak a rezin monomerek. Az inkomplett polimerizációnak köszönhetően reziduális monomerek (TEGDMA, HEMA) szabadulnak fel milimoláris mennyiségben a pulpában és a nyálban, amelyek kapcsolatba léphetnek a szájüregi szövetekkel és bekerülhetnek a gasztrointesztinális rendszerbe [7, 101]. A szájüregben még a megfelelő polimerizálási időt is betartva hosszú ideig jelen lehetnek a monomerek. Lipofil szerkezetüknek köszönhetően könnyen penetrálhatnak a sejtmembránon keresztül. Az elégtelen polimerizálódást követő monomer kioldódás mellett, a nyál hidrolitikus enzimeit és a savas környezet hónapokkal és évekkel később is további monomer felszabadulást okozhat a tömésekből. A monomerek a dentinen keresztül befolyásolhatják a pulpa sejtek működését [11-13, 100, 102].

A TEGDMA amfifil jellegű molekula, amely a legnagyobb arányú kioldódással rendelkezik a rezin monomerek között [10-13]. A dentin vastagságától és a polimerizálódás minőségétől függően a TEGDMA akár a 4mM-t is elérheti a nyálban és a pulpában [102-104]. A klinikailag manifesztálódó kontakt allergiáktól eltekintve a monomerek szisztémás, vérben való jelenléte az előbb említetteknél nagyságrendekkel alacsonyabb [7], ezért a TEGDMA hatására bekövetkező szisztémás mellékhatások valószínűleg elhanyagolhatók [12]. A monomerek közül a HEMA, a Bis-GMA, a BPA és a TEGDMA metakrilát molekulák válhatnak ki allergiás reakciókat, amelyek kontakt dermatitis és stomatitis formájában manifesztálódhatnak. Ez a jelenség gyakrabban fordul elő a fogorvosok és a fogászati asszisztensek, fogtechnikusok esetében, mint a pácienseknél [61, 105, 106]. Ashan felhívja közleményében a figyelmet a fogászati kompozitok és a rezin bondok okozta túlérzékenység kockázatára, ahol a monomerek felszabadulását csökkenteni lehet a rendelőben a megfelelő elszívással, a páciensek esetében kofferdam izolálással és megfelelő kompozit rétegzési technikával; a fogászatban dolgozóknak pedig megfelelő védőfelszerelés biztosításával. Ezenkívül fontos a fogászati rendelői szellőzés biztosítása és az anyagok biztonságos tárolása, amely segítségével korlátozható a monomer expozíció [61].

A szájüregben a TEGDMA és a HEMA különböző sejtfunkciókat és a sejtek életképességét befolyásolja [9, 100, 107, 108]. A TEGDMA befolyásolhatja a sejtek metabolikus állapotát, DNS károsodást, nekrozist és apoptózist okozhat [14, 109]. Korábban arról számoltak be, hogy a TEGDMA a sejtekben stressz választ indíthat el,

fokozza a reaktív oxigén származékok (ROS) képzését és az eukarióta sejtekben glutation (GSH) depléciót okozhat in vitro [100, 110, 111]. A TEGDMA genotoxikus [15] [21] és mutagén hatásai valószínűleg a ROS képzés okozta DNS-károsodások következményei, mivel a toxikus hatások eliminálhatóak voltak számos kísérletben antioxidánsok jelenlétében [9, 112-115]. A TEGDMA már szubtoxikus koncentrációkban is genotoxicitást okoz [87]. Schweikl és mtsai a mikronukleuszok számának dóziszfüggő növekedését figyelték meg TEGDMA, HEMA kezelés következtében [116]. Eckhardt és mtsai leírták, hogy a TEGDMA oxidatív DNS károsodást okozhat, amit a 8-oxoguanin keletkezése jelez (*1. táblázat*). Eredményeik alapján az ERK1 / 2-es MAP-kinázok és a p38 és a JNK stressz kinázok aktivitása közötti egyensúly valószínűleg központi tényező a sejthalál és a túlélés szabályozásában a TEGDMA-val kezelt sejtenyészetekben [15]. Kimutatták, hogy a TEGDMA apoptózist [117, 118] vagy nekrotikus sejthalált [118-121] is okozhat, az alkalmazott koncentrációtól függően (*1. táblázat*). Számos tanulmány bizonyítja, hogy a monomer okozta apoptózis a ROS képzés okozta oxidatív stresszel van összefüggésben [111, 122, 123]. Az eddigi eredmények alátámasztják, hogy az antioxidánsok jelenléte (pl. NAC, aszkorbinsav, A és E vitamin (Trolox) stb.) csökkenti a TEGDMA okozta citotoxikus hatást [111, 115, 124, 125]. Mindezek az eredmények a ROS központi szerepét feltételezik a TEGDMA citotoxicitásának és genotoxicitásának hátterében és a sejthalálához vezető útvonalak kiváltásában [100]. A TEGDMA már alacsony koncentrációban specifikus odontoblast funkciókat gátol (pl. alkalikus-foszfátáz aktivitást, mátrix mineralizációs kapacitást,  $Ca^{2+}$  lerakódást) [108]. A kísérletek azt mutatták, hogy a TEGDMA nagyon alacsony koncentrációkban képes befolyásolni a fogból eredetű fibroblasztok élettani differenciálódási folyamatát odontoblasztokká és hatással van a normál mineralizációs folyamatokra [107]. A TEGDMA toxikus hatásait összefoglaló táblázattal szemléltetem munkámban, amely a teljesség igénye nélkül mutatja be és csoportosítja a toxikus hatásokat (*1. táblázat*), figyelembe véve a legfontosabb hatásmechanizmusokat.

## 1. táblázat: A TEGDMA toxikus hatásai

TEGDMA rezin monomer koncentráció	Tanulmány Szerző	Oxidatív stressz A redox homeosztázist érintő hatások	Bioenergetikai hatás	Apoptózis / Nekrózis	Genotoxikus hatás	Vizsgált objektum	Mérési módszer
<u>0-2 mM</u>	<u>Inamitsu H et al.</u> <u>2017 [126]</u>				Gátolja a NFATc1 gén expresszióját – oszteoklaszt differentiáció gátlás	Egér csontvelő eredetű makrofágok és monocyta sejtvonal (RAW-D)	Western blot
<u>0.5 mM</u>	<u>Engelmann et al.</u> <u>2001 [14]</u>		A sejtek metabolikus állapotát befolyásolja, a nukleozid di- és nukleozid trifoszfátok arányát növelte			Egér 3T3-fibroblaszt	NMR spektroszkópia
<u>0-3 mM</u>	<u>Stanislawsky et al.</u> <u>2003 [111]</u>	Citotoxikus  GSH szint csökkenés  ROS termelés fokozódás				Humán gingivális fibroblasztok (HGFs) és h. pulpális eredetű fibroblasztok (HPFs)	MTT  Spektrofotométer (mBCI)  Spektrofoto- méter (DCFH- DA)
<u>0-3 mM</u>	<u>Spagnuolo et al.</u> <u>2004 [118]</u>			Apoptózis/Nekrózis koncentráció függő		HPFs	FACs (Annexin V-PI)
<u>0-3 mM</u>	<u>Lefevre et al.</u>	Citotoxikus				HGFs	MTT



	<b><u>2004 [127]</u></b>	Glutation transzferáz (GSTP1) enzim modulálás –GSH depléción					Spektrofotometria
<b><u>0-3 mM</u></b>	<b><u>Lefeuvre et al. 2005 [128]</u></b>	Citotoxikus Oxidatív stressz Lipid peroxidáció	Mitochondriális károsodás  Mitochondriális membránpotenciál csökkenés			HGFs	LDH meghatározás  GSH meghatározás  ATP szint mérés/spektrofotométer  Rhodamine 123
<b><u>0-5 mM</u></b>	<b><u>Chang et al. 2012 [119]</u></b>	Citotoxikus		Apoptózis/ Nekrózis	Sejtciklusban késés  COX-2 expresszió-, PGE(2) és PGF (2 $\alpha$ ) termelés fokozás	Humán eredetű pulpa sejtek	2,5-diphenyl-tetrazolium bromide assay  Flow citometria  Western blot
<b><u>1-100<math>\mu</math>M</u></b>	<b><u>Ginzkey C et al. 2015 [129]</u></b>		Sejt életképesség csökkenés a legmagasabb koncentrációban	Apoptózis	Genotoxikus a legmagasabb koncentrációban  Klasztogén hatás a citotoxikusnál 100szor alacsonyabb koncentrációban	Humán limfocita	Comet assay  Flow citometria

<u>1-3 mM</u>	<b><u>Schweikl et al. 2008 [123]</u></b>	ROS termelés fokozódás			Sejtciklusban késés  Génmoduláció a GEMKLHL24,DDIT4,TGIF,DUSP5,ATF3 génekben (a sejt szerkezetért, a sejtproliferációért, a sejthalálért és a stresszválaszért felelős gének) és a TXNIP génben (a redox egyensúlyért felelős gén)	Normal bőr fibroblaszt	FACs (DCFH-DA)  FACs (PI)
<u>0.4-5 mM</u>	<b><u>Lee et al. 2006 [130]</u></b>	Koncentrációfüggő citotoxicitás GMA>TEGDMA>HEMA N-acetilcisztein (NAC) antioxidáns csökkentette a citotoxicitást		Apoptózis  NAC preventív hatása	Koncentrációfüggő genotoxicitás  NAC preventív hatása	V79-4 kínai hörcsög fibroblaszt sejtvonal  RPC-C2A patkány dentális pulpa eredetű sejt	MTT  Mikronukleusz teszt / DNS gélelektroforézis  Flow citometria
<u>3-5 mM</u>	<b><u>Eckhardt et al.2009 [15]</u></b>	Oxidatív DNS károsodás	Sejt életképesség csökkenés	Apoptózis  Redox szenzitív mitogén aktivált protein kinázok (MAPKs)aktiválás  NAC preventív hatása	ROS indukálta DNS károsodás, 8-oxoguanin szintemelkedés  Késés a sejtciklusban(G1-2 fázisban)	THP-1 monocyta	MTT  OxyDNA Assay
<u>3 mM</u>	<b><u>Krifka S et al. 2012 [16]</u></b>		Sejt életképesség csökkenés	MAPK aktiválás p53 aktiválás- Apoptózis - NAC		RAW267.7 egér makrofág sejtek	Western blot

				preventív hatás			
<u>3 mM</u>	<u>Krifka S et al. 2011 [131]</u>		Gátolja ill. aktiválja a c-Jun, ATF-2 és ATF-3 (MAPK) transzkripciós faktorok expresszóját a különböző sejtvonalakon	Apoptózis p53 expresszió fokozódás	DNS károsodás következtében MAPK aktiválás ill. gátlás-transzkripciós faktorok aktiválódása ill. gátlása→ Apoptózis	Humán pulpa eredetű sejt Immensejtek RAW264.7 makrofágok	Western blot
<u>0.05-0.25 mM</u> <u>1mM</u>	<u>A. Bakapoulou et al. 2011 [64]</u>	Citotoxikus			A humán tejfog eredetű őssejtek odontogén differenciálódásának és a mineralizáció gátlása  Reparatív dentinképzés gátlás	Humán tejfog pulpa eredetű őssejtek	MTT STRO-1, CD146, CD34, CD45 őssejt markerek jellemzése flow citometriával

Ezek a nemzetközi eredmények felvetik egy olyan közös mechanizmus és talán olyan molekuláris célpont lehetőségét a TEGDMA citotoxikus hatásának hátterében, amely felelős lehet a leírt celluláris hatásokért. Az irodalomban e jelenség mögött meghúzódó mechanizmusok azonban még kevésbé ismertek. A közelmúltban Yeh CC és munkatársai leírták a NADPH oxidáz 4 (NOX 4) szerepét a TEGDMA-indukálta apoptózis és ROS termelés hátterében [132]. Lefeuvre M és munkatársai korábban mitokondriális membránpotenciál csökkenést és fokozott ROS-képződést tapasztaltak a TEGDMA adását követően gingiva fibroblasztokon [128]. A mitokondrium károsodása jelentősen befolyásolhatja a sejtek életképességét, mivel a csökkent ATP szint nekrotikus sejthalálhoz vezethet. A mitokondriális károsodás emelheti a ROS szintjét, ami a DNS-károsodáshoz vezet és apoptózist okozhat [133].

Tekintettel arra, hogy az apoptózisban, a sejtek életképességének meghatározásában, a ROS képzésben és eliminálásban a mitokondriumoknak nagyon fontos szerepük van, logikusnak látszik, hogy a TEGDMA toxicitásában mitokondriális célpontokat keressünk. Figyelembe véve, hogy a mitokondriális károsodás lehet primer vagy szekunder, és ez a különbség nem mindig egyértelműen vizsgálható sejtes rendszerekben, ezért izolált mitokondriumokat választottunk a vizsgálataink középpontjába. Feltételezésünk szerint a TEGDMA legtöbb toxikus hatása a kedvezőtlen bioenergetikai paraméterekre és a ROS-termelés fokozódásra vezethető vissza. Valószínű, hogy a mitokondriális diszfunkciók felelősek a nekrotikus [134, 135] vagy apoptotikus sejthalálért [136]. Az alacsony koncentrációjú komplex I (CI) gátlók általában apoptózist indukálnak, míg ugyanazok a vegyületek magasabb koncentrációban nekrotikus sejthalált okozhatnak [137].

A mitokondriumok szerepe a sejt ROS termelésében jól ismert [138]. Különböző mechanizmusok és molekuláris célpontok felelősek a mitokondriumok fokozott ROS képzéséért [139, 140]. Kutatásaink során a TEGDMA alacsony, milimólos koncentrációit alkalmaztuk az izolált agyi mitokondriumokon, és a mitokondriumok legfontosabb bioenergetikai funkcióit a mitokondriális  $H_2O_2$  homeosztázis ( $H_2O_2$  termelés és elimináció) mérésével párhuzamosan értékeltük. Feltételezésünk szerint a mitokondriális légzési láncban a CI gátlása felelős a TEGDMA legtöbb citotoxikus hatásáért.

#### 1.4.5 A kompozitok fejlesztése

A kompozitokat 40 éve alkalmazzák a fogászatban, ennek köszönhetően kevesebb irodalmi adat áll rendelkezésre a hosszútávú utánkövetéses vizsgálatokból illetve a mellékhatásokat figyelembe véve, mint az amalgámról. A legtöbb beszámoló in vitro kutatási eredményeket mutat be a kompozitok biológiai hatásairól (ld. 1.4.3, 1.4.4 alfejezetek), ezért több in vivo követéses vizsgálat és a tömőanyagok további fejlesztése szükséges. Opdam és mtsai olyan összehasonlító tanulmányokat és követéses vizsgálatokat javasol, amelyek 2-3 évnél hosszabb utánkövetéssel rendelkeznek, mivel a szekunder fogszuvasodás előfordulása, ami a restaurációk sikertelenségének legfőbb oka, leginkább ennyi idő elteltével okoz problémát [141]. A klinikai vizsgálatok követésében fontos szerephez juthatnak az intraorális digitális lenyomatot készítő szkennelőfejek, amelyek a restaurációkról és a környező fog- és lágyszövetekről felvételt készítve lehetővé teszik az objektív minőségi követéses vizsgálatokat több független kutató bevonásával [141].

Jelenleg nem létezik a fogászatban tökéletes anyag az amalgám helyettesítésére. A kompozitok fejlesztését számos tényező határozza meg napjainkban. A rezin alapú esztétikus tömőanyagok további fejlesztései jelenleg a műgyanta formula fejlesztését, a tömőanyag időállóságát, a kötési idő redukálását, a magasabb fokú polimerizáció elérését, a BPA és a többi rezin monomer felszabadulásának kiküszöbölését és a fogszövetek gyógyítómechanizmusát támogató hatást célozzák meg [142]. Az új bioaktív anyagok fejlesztése közül a legfontosabbak a bakteriális biofilm képződésének gátlását, a zománc és dentin remineralizációját, a pulpszövet, a csont- és lágyszövetek regenerációját segíthetik elő [141]. Zhang és mtsai először mutattak ki vizsgálataikban egy új fehérje taszító kompozitot (2-metakriloxietil-foszforilkolint – MPC), amely csökkenti a szájüregi biofilm képződését, ezért ígéretesnek bizonyulhat a savtermelés csökkentésében. Az anyag további alkalmazásával valószínűleg kevesebb szekunder fogszuvasodás fordul majd elő a jövőben és a subgingivális széli záródású tömések esetén a kevesebb dentális plakk jelenléte miatt kevesebb gingivitis alakul ki. Ehhez azonban még további követéses vizsgálatok eredményei szükségesek [143].

Schmalz és mtsai összefoglaló közleményükben felhívják a figyelmet a fogászatban –a fogászati kezelés és fogtechnikai laborfolyamatok során felszabaduló- 1 és 100 nm közötti nanorészecskék lehetséges mellékhatásaira is, amelynek célszerve a tüdő. Ezzel kapcsolatban több kutatásra hívják fel a figyelmet elsősorban a célzott beteg csoportokban [144].

## **1.5 Bioenergetika**

### **1.5.1 A mitokondrium felépítése és működése**

A mitokondriumok külső és belső membránnal határolt sejtalkotók, amelyek mozgásra és osztódásra képesek. A mitokondriumok a sejtek energiatermelésében játszanak fő szerepet, miközben működésük hozzájárul a sejtes stresszválasz kialakulásához, autofagocitózist és apoptózist indíthatnak be. A mitokondriumok a sejtekben dinamikus, összekapcsolt hálózatot alkothatnak, és a többi sejtalkotóval szoros kapcsolatban állnak. Nem meglepő tehát, hogy a mitokondriális diszfunkció kulcsfontosságú szerepet játszik számos betegség patomechanizmusában, beleértve a neurodegeneratív kórképeket és az anyagcserezavarokat is [145], amelyre nem térek ki dolgozatomban, mert nem kapcsolódik a témámhoz.

A mitokondriumok külső membránja fele-fele arányban fehérjékből és lipidekből épül fel és permeábilis az intermedier anyagcsere számos termékére. A metabolitok feltételezhetően szabad diffúzióval juthatnak át a porin fehérje nagy átmérőjű csatornáin keresztül a citoplazmából a mitokondrium belső membránjáiig. A belső membrán szerkezete 75%-ban fehérjékből áll, amelyen az ionok és a legtöbb molekula megfelelő transzporterek segítségével juthat át. A mitokondriális belső membrán két oldala között jelentős ionkoncentráció gradiens és pH-különbség jön létre [145]. A belső membránban helyezkednek el a légzési komplexek (a légzési lánc elektronátvivő rendszere), a különböző transzport fehérjék és az ATP-szintáz. A mátrixtérben található a különböző mitokondriális anyagcsere folyamatok enzimeit (pl. a citrátkör, a zsírsav oxidáció enzimeit).

A mitokondriumok -a sejtek erőművei- a lebontó anyagcsere központjai. Bennük zajlik a sejtlégzés, és képződik a protonmotoros erő (pmf) terhére az ATP az oxidatív foszforiláció során, amely a sejt energiaszükségletének jelentős részét fedezi. A mitokondriumban oxidálódnak a citoplazmában keletkezett piruvát, a zsírsavak és az aminosavak, amely folyamatok során a termelődött redukált koenzimeket (NADH, FADH<sub>2</sub>) a légzési komplexek oxidálják, majd az oxidáció során felszabadult energia jelentős része ATP termelésre fordítódik. Az így keletkezett ATP az adenin nukleotid transzlokázon keresztül a citoplazmába jut, ahol a különböző enzimszisztemek használják fel energiaigényes folyamatokhoz [145-147].

A szervezetbe bevitt tápanyagok (szénhidrátok, fehérjék, zsírok) biztosítják az energiát a különböző élettani folyamatokhoz. A glükóz - miközben 2 ADP molekula foszforilálódik ATP-vé - a citoplazmában a glikolízis során piruváttá bomlik. A folyamat során NADH keletkezik. A citoplazmában keletkezett NADH a malát-aszpartát ingán és az  $\alpha$ -gilerofoszfát-dehidrogenáz ( $\alpha$ -GPDH) ingarendszeren kerül be a mitokondriumba, ahol az oxidatív foszforiláció zajlik. A piruvát bekerül a mitokondriumba és a piruvát-dehidrogenáz enzimszisztem acetil-koenzim A-vá (acetil-KoA) alakítja át. A zsírsavak mitokondriális  $\beta$ -oxidációja során, amelyet NADH illetve FADH<sub>2</sub> képződése kísér, szintén acetil-KoA keletkezik. Az acetil-KoA belép a citrátkörbe és átalakul, az acetilcsoportok C atomjai CO<sub>2</sub>-vé oxidálódnak a mitokondriális mátrixban. A folyamat során keletkező NADH illetve a FADH<sub>2</sub> (redukáló ekvivalensek) a mitokondrium belső membránjában található elektrontranszfer láncot táplálják elektronokkal. A belső membránban elhelyezkedő elektrontranszport lánc négy komplexből áll (CI-IV), amelyek a növekvő redoxpotenciáljuk sorrendjében helyezkednek el. Ezeket a komplexeket a lipid jellegű koenzim-Q (vagy ubikinon (UQ)) és a kis molekulatömegű fehérje, a citokróm-c kapcsolja funkcionálisan össze. Az UQ a belső membránban, a citokróm-c az intermembrán térben helyezkedik el [147,148]. A légzési láncot redukáló ekvivalensek táplálják elektronokkal. A CI elektron donorja a NADH + H<sup>+</sup>, amelynek forrása elsődlegesen a citrátciklus dehidrogenázai: az izocitrát-dehidrogenáz, az  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz és a malát-dehidrogenáz. Az izolált mitokondriumok NADH + H<sup>+</sup>-t generáló légzési szubsztrátjai a glutamát, a malát, az  $\alpha$ -KG és a piruvát. A CI NADH kötő helye a mátrix felőli oldalon helyezkedik el, majd az elektronok a CI-ről az UQ-ra

kerülnek. Az UQ az elektronokat a CIII-ra szállítja, ahonnan az elektronok a citokróm-c-re jutnak el, majd a CIV-re kerülve az oxigén vízzé redukálásában vesznek részt.

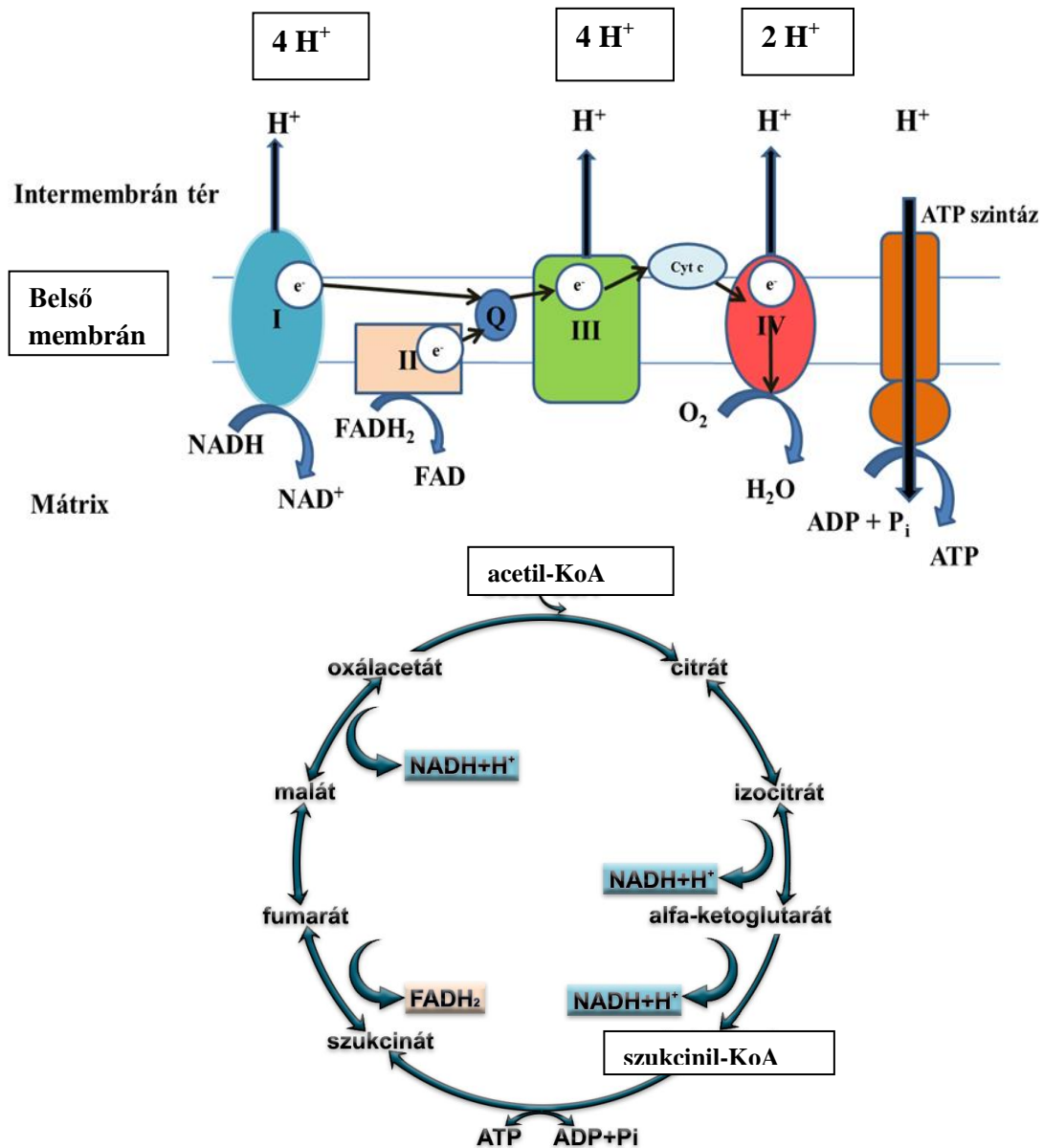
A CII-ben a  $\text{FADH}_2$  az elektron akceptor, az elektron donor pedig a szukcinát. A belső membrán külső oldalán található  $\alpha$ -GPDH enzimben is FAD oxidoredukció játszódik le  $\alpha$ -glicerofoszfát légzési szubsztrát jelenlétében. A keletkező  $\text{FADH}_2$  molekula az elektronjait vagy a CII-nek adja át (oxidálódik), majd az elektronok az UQ-on keresztül a CIII-ra kerülnek vagy  $\alpha$ -GP oxidációja esetén közvetlenül a UQ-ra kerülnek. Ezt követően a fent említett úttal megegyezően az elektronok a CIV felé vándorolnak. A NADH-ról, illetve a  $\text{FADH}_2$ -ről az elektronok a belső membrán légzési komplexein keresztül, oxidoredukciók sorozatán keresztül jutnak el a végső elektron akceptorra, az  $\text{O}_2$ -re, amelynek során  $\text{H}_2\text{O}$  keletkezik. A glicerín-3-foszfát-dehidrogenázról is juthatnak be elektronok az UQ-on keresztül a légzési láncba, amely folyamat a citoplazmában keletkező NADH transzportjában játszik szerepet (FAD-dal működő oxidoreduktáz). A zsírsav oxidációban szerepet játszó acil-KoA-dehidrogenáz flavoproteinről az elektronok szintén az UQ-ra kerülhetnek és így csatlakoznak a légzési láncba, folytatva útjukat a CIV felé.

A légzési komplexek az elektrontranszferhez kapcsoltnak  $\text{H}^+$ -t pumpálnak ki az intermembrán térbe, amely elektrokémiai gradiens kialakulásához vezet [145, 146, 147]. A CI és a CIII a NADH +  $\text{H}^+$  oxidációja közben 4-4 proton kipumpálását végzi, míg a CII nem képes protonok kipumpálására. A terminális elektron akceptor az  $\text{O}_2$  a légzési láncban, amely a CIV-en redukálódik vízzé, miközben két protont távolít el a mátrixból. Így egy NADH molekula oxidálódásakor 10 proton, míg a  $\text{FADH}_2$  oxidálódásakor (a CII-n) 6 proton kipumpálása történik az intermembrán térbe.

Az elektron áramlás alapvető szerepet játszik a mitokondriumok fiziológiás működésében. Így a mátrix és az intermembrán között proton gradiens és elektromos potenciálkülönbség alakul ki, amit elektrokémiai potenciálnak (pmf) nevezünk. A pmf terhére ATP szintézis és számos ion transzport folyamat (pl.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}_i$ ) történhet [149, 150]. A mitokondriumok összes transzport folyamata - az ún. kemiozmotikus elmélet alapján - az elektrontranszporthoz kapcsolt  $\text{H}^+$  gradiens kialakulásának köszönhetően [149, 150]. A protonok a protoncsatornát tartalmazó ATP-szintázon keresztül jutnak vissza a mátrixba, aminek következtében csökken a protongradiens és közben az ADP



ATP-vé foszforilálódik. Ha a mitokondrium szerkezete és membránja ép, akkor a belső membrán két oldala között kialakuló protongradiens összekapcsolja az oxidációt és a foszforilációt (3. ábra).



**3. ábra:** A kemiozmotikus elmélet sematikus ábrája és a citrátkör működése. Az ATP szintézist a mitokondrium belső membránjában elhelyezkedő ATP-szintáz végzi a protonmotoros erő (pmf) terhére. A pmf-t a légzési láncban az elektront szállító légzési komplexek redox potenciál különbsége generálja, ami proton kipumpálást tesz lehetővé az CI, III és IV keresztül a mátrixból az intermembrán térbe. Ennek következtében

proton koncentráció különbség és pH különbség (elektrokémiai potenciálkülönbség) alakul ki a belső membrán két oldala között. A folyamat következtében kialakuló gradiensnek az energiája, a pmf fedezi az ATP-szintáz által katalizált reakcióban az ADP foszforilációját ATP-vé. Cyt c: citokróm c, KoA: koenzim A, CI: komplex I, CII: komplex II, szukcinát-dehidrogenáz, CIII: komplex III, CIV: komplex IV, Pi: anorganikus foszfát. Succ: szukcinát, Q: ubikinon, koenzim Q.

A mitokondriumok fontos szerepet játszanak még a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis szabályozásában [151], illetve az oxidatív stressz kialakulásáért felelős reaktív oxigénszármazékok termelésében is, amelyet a következő alfejezetben mutatok be [140, 152].

### 1.5.2 A reaktív oxigénszármazékok

Reaktív oxigénszármazékok (reactive oxygen species: ROS) azok a nagy kémiai reaktivitással rendelkező vegyületek, amelyek oxigént tartalmaznak. Legtöbbjük párosítatlan spinű elektronnal rendelkező szabadgyök, amely a stabil szerkezetének eléréséhez elektront von el vagy ad át más vegyületnek, erélyes oxidálószernek számítanak. Elsősorban az elektrontranszferhez kötött folyamatokban, mint pl. a mitokondriális légzési láncban az elektronok egy része a szabályzott „szabályos” elektron áramlás irányából kikerül, és spontán reakcióba léphet az oxigénnel. Ennek a folyamatnak a során tökéletlenül redukált oxigénszármazékok keletkeznek (ROS) [153, 154]. A reaktív oxigénszármazékok két nagy csoportra oszthatók: az oxigén tartalmú szabadgyökök ill. a nem szabadgyök oxigéntartalmú vegyületekre, amelyek instabilak, erősen reaktívak és sejtkárosodásokat okozhatnak. In vivo a teljesség igénye nélkül a következő oxigéntartalmú szabadgyökök keletkeznek: a szuperoxid anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), a hidroxilgyök ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), a peroxilgyök ( $\text{RO}_2^{\cdot}$ ), a hidroperoxilgyök ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ). A nem szabadgyökök csoportjába tartozik a hidrogén-peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), amely ugyan nem rendelkezik párosítatlan spinű elektronnal, de a ROS más vegyülettel reakcióba lépve szabadgyök keletkezhet belőle [154].

A reaktív oxigénszármazékok nagyfokú reakciókészségük miatt módosíthatnak biológiailag fontos molekulákat, például fehérjéket, lipideket, nukleinsavakat. Az

aminosavak oxidálódásával megváltoztathatják a fehérjék szerkezetét, aktiválni vagy inaktiválni képesek transzkripciós faktorokat, membráncsatornákat, enzimeket. A nukleinsavakkal reakcióba lépve különböző módosulásokat okozhatnak; mint például DNS fehérje keresztkötéseket, kettős szálú DNS töréseket [147]. A sejten belül több sejtoranellum is termel ROS-t, mint például az endoplazmatikus retikulum, a sejtmag, a peroxiszóma és a mitokondrium, amelyek mind a ROS képzésében, mind az eliminálásában is szerepet játszanak [140]. A mitokondriumok jelentős ROS termelő források, ahol a ROS az alapanyagcsere melléktermékeként keletkezik és folyamatosan termelődik, ezért fő endogén ROS forrás. Miközben az aerob szervezet a működése során oxigént használ fel, elkerülhetetlen a ROS termelése, mivel az oxigén erős elektron felvevő képességgel rendelkezik. Normál körülmények között is előfordulhatnak olyan állapotok, amikor az  $O_2$  redukciója nem tökéletes és egy elektron redukciójával szuperoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) keletkezik, amely akár spontán, akár a mitokondriális mangán-szuperoxid-dizmutáz és réz-cink-szuperoxid dizmutáz hatására  $H_2O_2$ -vé alakul [154]. A  $H_2O_2$  tovább alakulhat hidroxilgyökké ( $OH^{\cdot}$ ), amely a természetben előforduló legerősebb reaktív vegyület [155].

### **1.5.3 A mitokondriumok ROS képzése és a mitokondriumok szerepe a reaktív oxigén származékok képzésében**

A mitokondrium fontos szerepe a ROS képzésében már a hetvenes években felmerült, mivel a mitokondrium használja fel a legtöbb  $O_2$ -t [156]. A mitokondriumban a ROS szintézis az alapanyagcserével van szoros összefüggésben és annak melléktermékeként keletkezik [140]. Az endoplazmás retikulum és a peroxiszóma ugyan több ROS-t szintetizál mint a mitokondrium, a mitokondriális ROS termelés változó intenzitású és folyamatos, így az endogén ROS képzés fő forrása [140]. A mitokondriumok ROS képzése szorosan összefügg a citrátkörben történő oxidációval és az ATP szintézissel. Normális körülmények között a mitokondrium belső membránjában a légzési lánc működése eredményeképpen az  $O_2$  négy elektron felvételével vízzé redukálódik a CIV közreműködésével. A folyamat során azonban létre jöhetnek olyan állapotok, amikor az  $O_2$  redukciója tökéletlen és a ROS keletkezése elkerülhetetlen [157]. Domináns reaktív

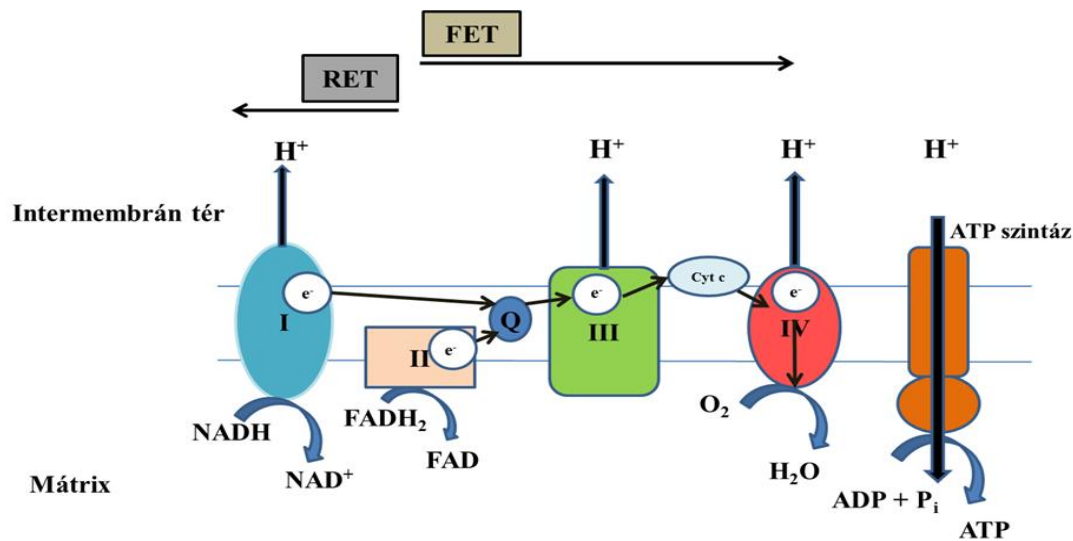
oxigén származék a  $O_2^{\cdot-}$ , a  $OH^{\cdot}$  és a  $H_2O_2$ , amelyek közül a  $OH^{\cdot}$  a legerősebben reaktív vegyület, a Fenton-reakció során hidroxilgyökké ( $HO_2^{\cdot}$ ) alakul [158].

Brand és mtsai közleményükben 13 ROS termelő helyet írnak le a mitokondriumban, amelyek a mitokondriális mátrix illetve az intermembrán tér felé irányítottan képeznek ROS-t [159]. Munkámban a teljesség igénye nélkül mutatom be a fő mitokondriális ROS termelő és elimináló rendszer tagjait, amelyek ismerete szorosan kapcsolódik a vizsgálatainkhoz. Míg a CI és az  $\alpha$ -KGDH normál körülmények között a legfontosabb ROS termelő, addig a CIII esetében annak gátlása okoz nagyon magas ROS termelést [154, 160].

### 1.5.3.1 Reverz irányú elektron transzport (RET)

A mitokondriumok szerepe a ROS termelésben jelentős, amelynek nagy részét a reverz elektron transzport (reverse electron transport - RET) adja, ami magas membránpotenciál mellett működik, ADP hiányában, vagy ha az összes ADP ATP-vé alakult. A  $FADH_2$ -t generáló légzési szubsztrátokról (Succ és  $\alpha$ -GP) az elektronok nagy része a UQ-n keresztül

ül a III. és a IV. komplexen át kerül az  $O_2$ -re, ami a *pmf* képzéséhez járul hozzá (előre irányuló elektronáram; forward electron transport - FET) (4. ábra). Az elektronok kisebb hányada visszafelé a CI-re áramlik az UQ-on keresztül és a  $NAD^+$ -t redukálja (4. ábra). Ehhez az energiát a *pmf* szolgáltatja. Ezt nevezi az irodalom reverz elektron transzportnak (RET) [161] (4. ábra). A legmagasabb ROS termelést izolált mitokondriumban ADP nélkül és szukcinát jelenlétében mutatták ki, amely a RET-hez kötődött [162, 163]. Ez utóbbi jelentős ROS képzéssel párosul, amely membránpotenciál függő [164] és energiaigényes, mivel magas  $\Delta\psi_m$  szükséges az elektronok ellentétes irányú transzportjához. A ROS termelés tehát fokozódik a  $\Delta\psi_m$  emelkedésével. Már 10%-os  $\Delta\psi_m$  csökkenés 90%-os ROS termelés csökkenést okoz [140, 164, 165]. A RET során termelődő ROS-t a  $\Delta pH$  is befolyásolja [166]. Tretter és mtsai a RET-t rotenonnal gátolta vizsgálataiban [167], aminek hatására a  $NADH/NAD^+$  arány nőtt és fokozódott a ROS termelés  $NADH$ -függő szubsztrátok esetén.



**4. ábra:** A légzési lánc és a citrátkör felépítése. Rövidítések: Q: ubikinon, koenzim Q, Cyt c: citokróm c, CI: komplex I, CII: komplex II, szukcinát-dehidrogenáz, CIII: komplex III, CIV: komplex IV, Pi: anorganikus foszfát. Succ: szukcinát, FET: forward electron transport – előre irányuló elektronáram, RET: reverse electron transport – reverz elektrontranszport.

### 1.5.3.2 $\alpha$ -KGDH komplex

Az  $\alpha$ -KGDH enzim komplex a mitokondriális mátrix belső felszínén helyezkedik el, amely a  $\alpha$ -KG oxidációját katalizálja szukcinil-KoA-vá és a reakcióban a  $\text{NAD}^+$  az elektron akceptor ( $\alpha\text{-KG} + \text{NAD}^+ + \text{KoA} \rightarrow \text{szukcinil-KoA} + \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{CO}_2$ ) [140]. Ez az enzim a citrátkör legfontosabb, sebesség meghatározó enzime (leglassúbb) [168]. Az  $\alpha$ -KGDH enzimet a  $\text{H}_2\text{O}_2$  gátolja, és működése nagyon érzékeny a ROS-ra [169]. Az enzimkomplex 3 alegységből áll hasonlóan a piruvát-dehidrogenáz enzimkomplexhez (PDHc). Az E3 alegysége flavint tartalmaz, ami az enzimkomplex ROS termeléséért felelős magas  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  arány jelenlétében, hasonlóan a PDH hoz. Ha például a légzési lánc károsodik gátlószer hatására, akkor a  $\text{NADH}$  arány megemelkedik, ami a

citrátkör lelassulását okozza. Ennek következtében fokozódik az  $\alpha$ -KGDH  $O_2^-$  és  $H_2O_2$  termelése. [168, 170]. Az  $\alpha$ -KGDH E3 alegysége mellett az E1 és E2 flavin tartalmú alegysége is feltételezhetően részt vesz a ROS termelésben a PDH-hoz hasonlóan [170-172].

### 1.5.3.3 Komplex I (NADH-ubikinon oxidoreduktáz; CI) szerepe a ROS termelésben

CI a mitokondriális légzési lánc első tagja, ahonnan az elektronok az FMN prosztetikus csoporton keresztül a vas-kéncentrummal rendelkező fehérjékre kerülnek, miközben a CI a  $NADH+H^+$ -t oxidálja  $NAD^+$ -á. Ebben a folyamatban az UQ az elektron akceptor, amely ubikinollá redukálódik. A folyamat során a CI fehérjekomplexein konformáció változás következik be, és protonok pumpálódnak az intermembrán térbe. A CI-en három módon valósulhat meg ROS termelés, amit a kísérleti körülmények jelentősen befolyásolnak [140]:

- a)  $FADH_2$ -függő szubsztrátok (szukcinát,  $\alpha$ -glicerofoszfát) esetén magas membránpotenciál mellett, a RET során [161]. A folyamathoz az energiát a magas membránpotenciál biztosítja és a koenzim Q (UQ) redukációjához  $FADH_2$ -függő szubsztrátok szükségesek.
- b) Ép légzési lánc esetén,  $NADH$ -függő szubsztrát esetén, ADP hiányában, magas membránpotenciál mellett [164], amikor a redox-rendszer erősen redukált állapotban van proximálisan a CI proton pumpájától, ami előnyös a molekuláris oxigén egy elektronnal történő redukációjához [173]. A FET során termelődő ROS termelésében feltehetően a CI flavin csoportja vesz részt [174].
- c)  $NADH$ -függő szubsztrátok esetén jelentősen fokozható a ROS képzés rotenonnal (CI gátlószer), amit a  $NADH/NAD^+$  aránya határoz meg [162, 167]. Rotenon jelenlétében nő a  $NADH/NAD^+$  arány, aminek következtében a ROS termelés is fokozódik. Ebben az esetben nem függ a ROS termelés a  $\Delta\psi_m$ -tól, mivel a CI gátlás következtében csökken a  $\Delta\psi_m$  [165, 175].

Összefoglalva, mindhárom kísérleti körülmény esetében a ROS termelés a redox rendszer erősen redukált állapotához kötött.

#### 1.5.3.4 A Komplex II (szukcinát-dehidrogenáz; SDH) ROS termelése

A CII a belső membrán belső (mátrix oldali) felszínén található komplex, amely a szukcinát oxidációját katalizálja fumaráttá, miközben  $\text{FADH}_2$  keletkezik. Ebben a reakcióban az elektron akceptor az UQ. Az SDH az egyetlen citrátköri enzim, amely a mitokondriális légzési lánchoz tartozik (CII). A Succ oxidációja során keletkező ROS jelentős része a RET-en keresztül a CI-ről származik ADP hiányában vagy olyan körülmények között, amikor magas a mitokondriális membránpotenciál (lásd előbb). A RET ADP hiányában, magas membránpotenciál esetén indul meg  $\text{FAD}^+$ -hoz kötődő szubsztrátok esetében [176]. Ilyenkor az elektronok egy része forward irányba (FET) az  $\text{O}_2$ -hoz áramlik és a *pmf* kialakulásához járul hozzá, míg az elektronok másik része a CI felé áramolva a  $\text{NAD}^+$ -t redukálja és a folyamat során ROS termelődik [177]. Az enzimkomplex másik jelentős ROS termelő forrása az enzim  $\text{II}_F$ -alegysége [177, 178].

#### 1.5.3.5 A Komplex III (CIII, koenzim Q-citokróm c redukáz) szerepe a ROS termelésben

A CIII protonpumpa aktivitással rendelkező légzési komplex, amely a légzési lánc harmadik komplexe, a redukált koenzim Q-t oxidálja (koenzim Q-vá) és az elektronokat a citokróm c-hez szállítja. A reakció több lépésben zajlik, amit Q ciklusnak neveznek, amelynek során ROS termelődik [154]. Az enzim antimycinnel történő gátlása a ROS képződést sokszorosára aktiválja, a membránpotenciál drasztikus esése mellett. A ROS képződésért a CoQ ciklusban keletkező labilis szemikininon szuperoxidképzése felelős.

#### 1.5.3.6 Az $\alpha$ -glicerofoszfát ( $\alpha$ -GPDH) szerepe a mitokondriális ROS termelésben

Az  $\alpha$ -GPDH a mitokondriális belső membrán külső, intermembrán tér felőli részén helyezkedik el és FAD prosztetikus csoportot tartalmaz. Az  $\alpha$ -GPDH az  $\alpha$ -glicerofoszfát ingát képezi és részt vesz a mitokondriumokba irányuló redukáló ekvivalens szállításban. Az enzim az  $\alpha$ -GP inga része és biztosítja, hogy a sejt glikolízise folyamán keletkező NADH képes legyen oxidálódni a mitokondriumokban. Az  $\alpha$ -GPDH inga fontosságát az adja, hogy ha ez az inga, vagy a hasonló funkciót végző „malát-aszpartát inga” nem működik, akkor a glikolízis során keletkező  $\text{NADH} + \text{H}^+$  nem a

mitokondriumban használódik fel, hanem a piroszőlősavat redukálja laktáttá. Ilyenkor a tejsav távozik a sejtekből, nem képes részt venni az aerob metabolizmusban, ilyen értelemben elveszik a citrátkör számára.

Az  $\alpha$ -GPDH az  $\alpha$ -GP oxidációját katalizálja dihidroxiaceton-foszfáttá, miközben a  $\text{FAD}^+$  redukálódik és az elektronok az UQ-ra kerülnek, ahonnan három fő irányba áramolhatnak. Erre később visszatérek a dolgozatban. Ez a reakció szerepet játszik a lipid metabolizmusban és a fent említett inga működésének alapját képezi. Az  $\alpha$ -GP-tal energetizált mitokondriumok esetén megnövekedett ROS termelést figyeltek meg [140, 167, 179]. A elektronok a  $\text{FADH}_2$ -ről az UQ-ra kerülnek és innen 3 irányba áramolhatnak. A CI felé mehetnek, ha magas a membránpotenciál, ilyenkor a RET folyik. A RET nagyon jelentős szerepet tölt be ebben az esetben az  $\alpha$ -GP-tal lélegeztetett izolált agyi mitokondriumok ROS képzésében [180]. Az  $\alpha$ -GPDH komplex saját ROS termelő forrásként is szerepelhet, hasonlóan a CII-hoz. Az elektronok az UQ-ról a CIII-ra és a CII-re is kerülhetnek, amelyek így a ROS termelés forrásai lesznek [180]. A komplex elsősorban szuperoxidot ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )-t termel, ami átalakulhat  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vé [181].

#### **1.5.4 A mitokondriális ROS eliminációja**

##### **A $\text{H}_2\text{O}_2$ eliminációja**

A szervezetben a ROS keletkezése mellett olyan ROS elimináló mechanizmusok is jelen vannak, amelyek normál körülmények között elősegítik a ROS képződés és elimináció közötti egyensúlyi állapot fenntartását. Ha ez az egyensúlyi állapot megbomlik a pro- és antioxidáns rendszerek között, akkor oxidatív stressz jön létre [138, 159, 176, 182], amely irreverzibilis fehérje és DNS károsodást (pl. egy-, illetve kettősszálú DNS-töréseket, DNS-fehérje keresztkötéseket stb.), membránkárosodást (lipidperoxidáció), egyéb fehérje szerkezet módosulást és funkcióvesztést okozhat. Ez patológias állapotot idézhet elő. A mitokondriális ROS homeosztázis zavara, az oxidánsok túlsúlya számos patológias állapotban játszik fontos szerepet, beleértve például az ischemia-reperfúzió folyamat sérülést, (az ischemiás kórképeket) [183-185],



a legtöbb neurodegeneratív kórképet (pl. Alzheimer kór [186-189], az atherosclerost [190], a cardiomyopathiát [191], diabetes [192], a daganatos megbetegedést [193, 194], az öregedést [159, 195].

Az emlősökben a mitokondrium több szintű ROS védelmi rendszerrel rendelkezik, amely enzimatikus illetve nem enzimatikus úton működik. Az elimináló mechanizmusok tárháza széles spektrumú, amelyek közül csak a legfontosabbakat szeretném a dolgozatomban bemutatni. Vizsgálatainkban a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mérések során nemcsak a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést vizsgáltuk a különböző légzési szubsztrátok esetén, hanem az eliminációját is az izolált mitokondriumon, mivel a mitokondrium jelentős H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elimináló hatással bír.

#### **1.5.4.1 E-vitamin, α-tokoferol**

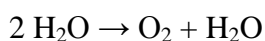
Az E-vitamin zsírban oldódó vitamin, amely a membránokat védi a lipid-peroxidációtól, amely a redukált koenzim Q segítségével vagy a vízzoldékony víz és membrán határán elhelyezkedő aszkorbinsav segítségével regenerálódik [140].

#### **1.5.4.2 Mangán-szuperoxid diszmutáz (MnSOD)**

A MnSOD a mitokondrium mátrixában található és az (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) eliminációjában vesz részt, amely folyamat során azt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vé alakítja át. Az MnSOD a vas-kén centrumot tartalmazó enzimeket védi a mitokondriumban [140].

#### **1.5.4.3 Kataláz**

A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifikálásában játszik szerepet, amelynek során O<sub>2</sub> és H<sub>2</sub>O keletkezik, azonban a mitokondriumban [196] (kivéve a szív mitokondriumban) ez elhanyagolható szereppel bír [197]. Rágcsálókban a kataláz aktivitás a májban a legmagasabb, ezt követi a vese, tüdő, szív és az agy [198].



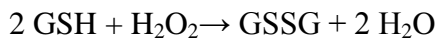
#### **1.5.4.4 Glutation**

A glutation (GSH) egy tripeptid (glutamil-cisztinil-glicin), amely aktív tiol (-SH) csoporttal rendelkezik. A GSH a citoszolban termelődik és transzportálódik a mitokondriumba a megfelelő GSH, dikarboxilát és az α-KG transzportereken keresztül [199, 200]. A mitokondrium tartalmazza az összes GSH mennyiség megközelítően 10-12%-át a sejtben, de a viszonylag kevés mátrixtér miatt a mitokondrium GSH

koncentrációja nagyobb lehet a citoplazmáénál [201]. A mitokondrium két úton használja fel a redukált GSH-t. A GSH vagy enzimatikus reakciókban vesz részt elektron donorként (pl. toxinok eltávolítása glutation-S-transzferázzal,  $\text{H}_2\text{O}_2$  eliminálása a klasszikus glutation peroxidáz által (Gpx1)), vagy nem enzimatikus úton reakcióba lép a ROS-sal és semlegesíti az  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -t és a  $\text{OH}^{\cdot}$ -t [140, 201, 202]. Végül a GSH oxidálódik GSSG-vé (glutation-diszulfid) mindkét reakcióban (oxidált glutation). Mivel oxidált GSSG forma nem tud kijutni a citoszolba, ezért a mitokondriumban vissza kell redukálnia GSH-vá [203]. Ezt a reakciót - NADPH redukáló ekvivalens felhasználásával - a glutation-reduktáz (GR) katalizálja.

#### 1.5.4.5 Glutation peroxidáz

Az enzim a mitokondrium mátrixában és az intermembrán térben található meg.



#### 1.5.4.6 Glutation reduktáz

Specifikusan a GSSG GSH-vá való visszaalakulását katalizálja az enzim a mitokondriális mátrixban ( $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{ GSH} + \text{NADP}^+$ ) [204], ahol a NADPH forrást három enzim biztosítja: a mitokondriális izocitrát-dehidrogenáz, az almasav enzim és a mitokondrium belső membránjához kötött nikotinamid-nukleotid-transzhydrogenáz [205, 206]. Így a ROS eliminációjához az izocitrát-dehidrogenáz esetében hozzájárulhat a citrátköri szubsztrátok (malát, izocitrát) oxidációja során keletkező energia is. Ilyenkor az energia a ROS eliminációra fordítódik a NADPH és a GSH felhasználásának segítségével, ahelyett, hogy ATP szintetizálna.

#### 1.5.4.7 Peroxiredoxinok vagy tioredoxin-függő peroxid reduktázok

A peroxiredoxinok (Prx) a citoszolban elhelyezkedő  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t redukáló enzimek, amelyek a  $\text{H}_2\text{O}_2$  eliminálásában vesznek részt [207]. A folyamat során keletkező Prx oxidált formáját a tioredoxin redukáz alakítja vissza, amelynek elektron donorja a  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ . A GSH rendszerhez hasonlóan az enzimek működése a mitokondrium metabolikus állapotától függ.

## 2. Célkitűzések

Az amalgám kivezetése nagyon aktuális téma napjainkban. Dolgozatom elején megpróbáltam választ keresni a lehetséges tömőanyag alternatívákat illetően, amelyek közül napjainkban a rezin bázisú kompozitok felhasználása terjedt el széleskörűen Magyarországon. A kompozitok biodegradációja miatt az anyag mechanikai tulajdonságai, biokompatibilitása még ma sem tökéletes, további fejlesztésre szorul. A kompozitok számos alkotóelemet tartalmaznak, ami miatt nagyon nehéz megítélni a toxicitásuk háttérében álló mechanizmusokat, amelyet az irodalomban *in vitro* körülmények között vizsgáltak a legtöbb esetben gingivális fibroblasztokon.

Munkám célja a kompozitokból legnagyobb arányban kioldódó TEGDMA rezin monomer nemzetközi irodalomban leírt citotoxikus és genotoxikus hatásainak háttérét megvizsgálni, mivel még mindig kevés adat áll rendelkezésre a TEGDMA citotoxikus mechanizmusának pontos megértésére.

Az irodalomban leírt káros hatások, a ROS-termelés fokozódás, a feltételezett ROS okozta DNS károsodás és az apoptózis háttérében közös célpontot feltételeztünk. Tekintettel arra, hogy az apoptózisban, a sejtek életképességének meghatározásában, a ROS képzésben és eliminálásban a mitokondriumoknak nagyon fontos szerepük van, logikusnak látszott a TEGDMA toxicitásában mitokondriális célpontokat keresni. Feltételezésünk szerint a TEGDMA legtöbb toxikus hatása a kedvezőtlen bioenergetikai paraméterekre és a ROS-termelés fokozódásra vezethető vissza. Ezért kísérleteinkben izolált agyi mitokondriumokon vizsgáltuk meg a TEGDMA bioenergetikai hatásait és vele párhuzamosan a ROS homeosztázist. Megvizsgáltuk a TEGDMA hatását a mitokondriális  $O_2$  fogyasztásra és a membránpotenciálra NADH- illetve  $FADH_2$  -függő légzési szubsztrátok jelenlétében. Ezzel párhuzamosan kísérleteinkben tanulmányoztuk a TEGDMA hatását a ROS termelésre, miközben az eliminációt is figyelemmel kísértük. A TEGDMA ATP szintézisre és GSH szintre kifejtett hatását szintén vizsgáltuk kutatásunk során.

Kísérleteink során a következő kérdéseket szeretnénk volna megválaszolni:

- Hogyan befolyásolja a TEGDMA az izolált agyi mitokondriumokon (*in vitro*) végzett kísérletekben a mitokondriális O<sub>2</sub> fogyasztást CI- illetve CII-függő (NADH-függő illetve FADH<sub>2</sub>-függő szubsztrátok) légzési szubsztrátok esetén?
- Az O<sub>2</sub> fogyasztás vizsgálataival párhuzamosan a TEGDMA hogyan hat a mitokondriális membránpotenciálra ( $\Delta\psi_m$ )?
- Hogyan változik TEGDMA jelenlétében a mitokondriális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés és NAD(P)H szint CI- illetve CII-függő szubsztrátok jelenlétében?
- Kölcsönhatásba léphet-e a TEGDMA közvetlenül a glutationnal (GSH) nem biológiai rendszerben?
- Milyen hatással van a TEGDMA az ATP szintézisre?
- Direkt vizsgálat alátámasztja-e, hogy a TEGDMA gátolja a CI aktivitást?

### 3. Módszerek

#### 3.1 Mitokondrium preparálás

A mitokondriumok izolálása tengeri malac agykéregből történt Percoll grádiens alkalmazásával [167]. A tengerimalacok tartását és eutanáziáját a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Bizottságának előírása szerint végeztük. Az előkészítés során minden műveletet jégen végeztünk.

A tengerimalac dekapitálása után a szeparált agykérget izolációs pufferbe helyeztük, majd ollóval kis darabokra vágtuk és azután többször átmostuk. Az agykérget „A” izolációs pufferben homogenizáltuk, ami a következőket tartalmazta: 225 mM mannitol, 75 mM szacharóz, 5 mM 4-(2-hydroxietyl)-1-piperazinétánszulfonsav (HEPES), 1mM etilén-glikol-bisz (β-aminoetyl-éter)- N,N,N',N'-tetraecetsav (EGTA), pH=7.0. Ezt követte az agyszövet homogenizálása Potter-Elvehjem homogenizátorral, majd a homogenátum centrifugálása 4 °C-on két centrifugacsőben (3 percig; 1,300 g). A felülúszót 20,000 g-n 10 percig centrifugáltuk. Majd a felülúszót eltávolítva a csapadékot 15%-os Percoll oldattal homogenizáltuk és Percoll grádienszt készítettünk alulról felfelé csökkentve a rétegek koncentrációját: 40, 23 V/V %-os, majd a legfelső réteg a mintát is tartalmazó 15 V/V %-os Percoll oldat. Ezt követően a grádienszt 8 percen át 30,700 g-n centrifugáltuk. A mitokondriumban gazdag frakciót eltávolítottuk a 23 és 40 V/V %-os réteg határfelületéről és „A” izolációs pufferben szuszpendáltuk, amit újbóli centrifugálás követett (10 percig; 16,600g-n). Így távolítottuk el a maradék Percoll oldatot. Majd a felülúszót kiöntöttük és a csapadékot szuszpendáltuk „A” izolációs pufferben és újracentrifugáltuk (10 perc; 6,300 g). Az utolsó centrifugálást követően a mitokondriumot tartalmazó csapadékot EGTA-mentes (225 mM mannitol, 75 mM szacharózt és 5mM HEPES-t tartalmazó, pH=7.4) „B” izolációs pufferben szuszpendáltuk, majd a szuszpenziót jégbe helyeztük és hűtőszekrényben (4 °C) tároltuk. A méréseknél 0,05 mg/ml vagy 0,1 mg/ml mitokondriális fehérje koncentrációt alkalmaztunk.

### 3.2 Mérési médium

A méréseket 37 °C-on végeztük „A” mérőoldatban, amely a következő összetevőket tartalmazta: 125 mM KCl, 20 mM HEPES, 2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> és 0,025% BSA (m /V)%, zsírsavmentes marha szérum albumin (bovine serum albumin: BSA). A mitokondriumokat a következő szubsztrátokkal energetizáltuk: alfa-ketoglutarát ( $\alpha$ -KG) vagy glutamát-malát (GM) vagy szukcinát (Succ); mindegyik 5 mM koncentrációban.

### 3.3 A mitokondriális O<sub>2</sub> fogyasztás mérése

A mitokondriális légzést Oxygraph-2k Clark-típusú polarográfiás oxigénelektóddal mértük [208] (Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria). Az oxigén elektródokat telített oxigénkoncentráció esetén és nulla oxigén koncentrációval kalibráltuk. A 100 %-os oxigénkoncentrációt a kamrák levegővel történő telítésével, míg a 0%-os O<sub>2</sub> koncentrációt Na-ditionit hozzáadásával értük el. A méréseket 0.1 mM EGTA-t, 125 mM KCl-t, 20 mM HEPES-t, 2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-t, 1 mM MgCl<sub>2</sub>-t és 0.025% BSA-t tartalmazó mérőoldatban végeztük (pH=7,0). A mérések során 0.5, 1.0, 2.0 és 5 mM TEGDMA koncentrációkat alkalmaztunk, kontroll vegyületként dimetil-szulfoxidot (DMSO) adtunk a kísérleteink során. A mérések digitalizálásához DatLab4 szoftvert alkalmaztunk (Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria).

### 3.4 A mitokondriális membránpotenciál mérése ( $\Delta\psi_m$ )

A mitokondriális membránpotenciált ( $\Delta\psi_m$ ) Safranin O fluoreszcens festékkel (2  $\mu$ M) detektáltuk. A safranin lipofil kationos festék, amely a membránpotenciálnak megfelelően oszlik meg a mitokondrium belső membránjának két oldalán. A mitokondriális membránpotenciál kiépülésével pl. légzési szubsztrát adását követően a Safranin O az extramitokondriális térből a mátrixba diffundál, ott oligomerek képződnek, amelyek elnyelik a fluorofór által emittált fényt, aminek következtében a

fluoreszcenciájuk csökken. A fluoreszcenciát 37 °C-on, 495 és 585 nm-es excitációs és emissziós hullámhosszon Hitachi F-4500 spektrofotométerrel detektáltuk (Hitachi High Technologies, Maidenhead, United Kingdom) [209].

### **3.5 A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és a NAD(P)H mérése párhuzamosan**

#### **3.5.1 A mitokondriális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és a NADP(H) termelés mérése**

Az izolált mitokondriumok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képződését Amplex UltraRed fluoreszcens festékkel mértük [176]. Ebben a vizsgálatban az Amplex UltraRed (3 μM) - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és tormaperoxidáz (horseradish peroxidase - HRP) (5 U/2 ml) jelenlétében - átalakul fluoreszcens vegyületté, rezorufinná. Két ml mérési médiumhoz 3 μM Amplex UltraRed reagenst, 5 U/2 ml HRP-t, majd ezt követően 0.1 mg fehérje/ml mitokondriumot adtunk. Glutamáttal és maláttal (5-5 mM), ill. szukcináttal (5 mM) energetizált mitokondriumok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelését határoztuk meg TEGDMA jelenlétében és hiányában. A mérések során 0.5, 1.0, 2.0 és 5 mM TEGDMA koncentrációkat alkalmaztunk, kontroll vegyületként DMSO-ot.

A fluoreszcenciát PTI Deltascan fluoreszcencia spektrofotométerrel (Photon Technology International, Lawrenceville, New Jersey, USA) detektáltuk 37 °C-on 550 és 585 nm excitációs, ill. emissziós hullámhosszon. Minden mérést kalibráltunk 100 pmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel a kísérletek végén.

Méréseinkben a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termeléssel egyidőben, ugyanabban a küvettában a NADH szintet is tudtuk mérni, 340 és 466 nm-es gerjesztési és emissziós hullámhosszon a NAD(P)H autofluoreszcencia detektálásával.

#### **3.5.2 A mitokondriális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eliminációja**

A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitokondriális eliminációját Tretter és mtsai közleményében leírt protokoll szerint mértük [210]. A glutamát és maláttal energetizált mitokondriumokat (0,1 mg fehérje/ml) előinkubáltuk 5 percig TEGDMA (5 mM) vagy DMSO jelenlétében. 5 perc

eltelte után  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t (10  $\mu\text{M}$ ) adtunk a rendszerhez, majd 50  $\mu\text{l}$ -es mintákat vettünk 30 másodperces időközökben 2 percig, és a maradék  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t detektáltuk Amplex UltraRed fluoreszcens módszerrel, az előző pontban (4.5.1) leírtakhoz hasonlóan. A méréseket ismert mennyiségű  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vel kalibráltuk minden mérés végén.

### 3.5.3 A redukált glutation fogyasztás mérése

A redukált glutation (GSH) mérése a GSH szabad SH-csoportjának és a 5,5'-dithiobisz (2-nitrobenzoát) (DTNB) közötti reakción alapul. A GSH meghatározása 100 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH=7.5) pufferben történt. A mérések előtt frissen készített 100 mM GSH törzsoldatot 50-szeresére hígítottuk és TEGDMA (5 mM) vagy DMSO jelenlétében inkubáltuk 15 percig 37 °C-on. Az inkubációs elegyből mintát vettünk és a keletkezett TNB-t (5'-thio-2-nitrobenzoát sav) spektrofotometerrel mértük 412 nm hullámhosszon [211].

### 3.6 Az ATP szintézis mérése

Az izolált mitokondriumok ATP termelését egy kapcsolt enzimrendszer segítségével detektáltuk, amely hexokinázra és glükóz-6-foszfát- dehidrogenáz enzimekre épült [212]. A vizsgálati mérőoldathoz 3 mM  $\text{NADP}^+$ -t, 1,5 U hexokinázt, 0,5 U glükóz-6-foszfát-dehidrogenázt, 5 mM glükózt és 200  $\mu\text{M}$  2-amino-foszfono-fentanoát-ot (adenilát kináz inhibitor) adtunk hozzá. A mitokondriumokhoz (0,05 mg / ml) ADP-t (2 mM), glutamátot és malátot (5-5 mM) vagy szukcinátot (5 mM), és TEGDMA-t (5 mM) adtunk. Ezt követően az ADP ATP-vé alakult át, amely elhagyta a mitokondriumot az adenin nukleotid transzlokázon (ANT) keresztül. A hexokináz enzim által katalizált reakcióban ATP jelenlétében a glükózból glükóz-6-foszfát képződött, majd a glükóz-6-foszfát tovább alakult 6-foszfoglukonáttá a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzim hatására; miközben a  $\text{NADP}^+$   $\text{NADPH}$ -vá redukálódott. A  $\text{NADPH}$  képződés arányos az ATP szintézissel, 1:1 sztöchiometriai arányban, kalibráció után. A mérés során a



NADPH abszorbanciáját mértük JASCO spektrofotométerrel (ABL & E-JASCOV 650, Tokió, Japán) 37 °C-on és 340 nm-en ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 3.7 A mitokondriális Komplex I (CI) aktivitás mérés

A CI aktivitásának mérése során a Ragan és Hatefi módszerét alkalmaztuk [213]. A vizsgálat során a NADH  $\text{NAD}^+$  átalakulását lehet detektálni, miközben az elektron-akceptor a koenzim Q1. A mitokondriumokat standard mérőoldatban inkubáltuk, majd ezt követően háromszor fagyasztottuk és engedték fel őket. A minták fagyasztása és felengedése azért szükséges a kísérletben, mert az intakt mitokondriumhoz adott NADH nem oxidálódik. A CI NADH-oxidáz aktivitása a mitokondriális belső membrán belső felszínén található, így a kívülről hozzáadott NADH számára ez az aktivitás a mitokondrium permeabilizálása nélkül elérhetetlen lenne. Ezután 200  $\mu\text{g}$ -ot a következő médiumban szuszpendáltunk: 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 40  $\mu\text{M}$  koenzim Q1, 1 mM KCN, pH=7.4. 50  $\mu\text{M}$  NADH-val indítottuk el a reakciót, amelyet aztán többször megismételtünk 5 mM TEDGMA vagy 1  $\mu\text{M}$  rotenon jelenlétében. Az abszorbancia-változás kezdeti sebességét 340 nm-en detektáltuk 37 °C-on, JASCO spektrofotométer segítségével.

### 3.8 Anyagok

A TEGDMA-t a VOCO GmbH (Cuxhaven, Németország) bocsájtotta rendelkezésünkre, amit DMSO-ban oldottuk fel a mérésekhez, és az 1 M-os törzsoldatot -20 ° C-on tároltuk. A trietilén glikol-dimetakrilát tisztasága 97%; a fennmaradó 3% trietilén glikol-monometakrilát. A kapott oldat UV-inhibitor tartalma 150 ppm hidrokinon-monometil-éter (HQME) (0,015%), amely egy metakrilát monomer esetében szokásos. A kísérleteink során kontrollként DMSO oldatot alkalmaztunk. A TEGDMA-t DMSO oldószerben oldottuk fel, amely egy erősen poláris résszel és két nem poláris csoporttal rendelkezik, ezzel elősegítve az anyag oldódását mind a vizes és a szerves közegben. A DMSO kontroll esetén a legnagyobb mennyiségű DMSO

mennyiséget adtuk. A DMSO koncentráció kevesebb volt, mint 0.005 V/V%, mivel a TEGDMA oldatban a folyadék egy része DMSO volt, a másik része TEGDMA. A standard laboratóriumi vegyszerek a Sigma (St. Louis, MO, USA), az Amplex UltraRed reagens a Molecular Probes cégtől (Eugene, OR, USA) kerültek beszerzésre.

### **3.9 Statikai analízis**

Az adatok kiértékelése SigmaPlot programmal történt. Az egyszerű összehasonlításokat Student-féle t-próbával értékeltük. A többszörös összehasonlítások esetén az egyszempontos ANOVA variancia analízist alkalmaztuk. Azoknál az adatoknál, amelyek nem követtek normális eloszlást, ott Kruskar Wallis teszt segítségével értékeltünk. A  $p < 0,05$  értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## 4. Eredmények

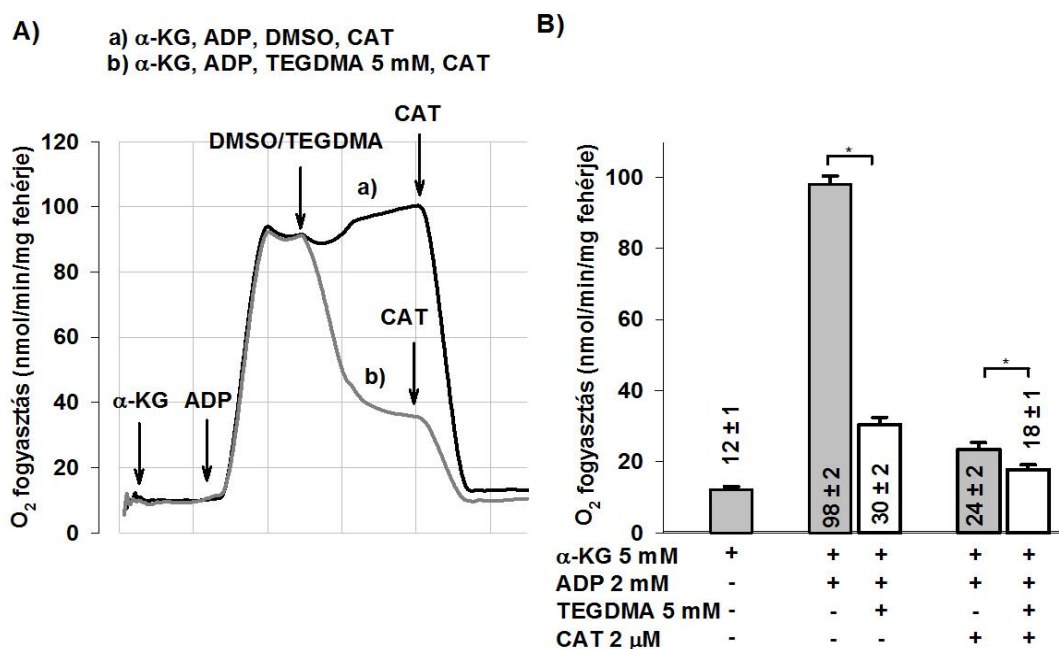
### 4.1 A TEGDMA hatása a mitokondriális légzésre

Az izolált mitokondriumokat  $\alpha$ -KG, GM vagy Succ légzési szubsztrátokkal energetizáltuk. Az  $\alpha$ -KG vagy a GM a mitokondriumba belépve a citrátkörben metabolizálódnak, amely folyamat során NADH keletkezik, ami a CI-en oxidálódik. Az izolált mitokondrium NADH+H<sup>+</sup>-t generáló szubsztrátjai a glutamát, a malát, az  $\alpha$ -KG, míg a Succ oxidációja során termelődő FADH<sub>2</sub> oxidációja a CII-n történik.

A légzési szubsztrátok jelenlétében alaplégzést detektáltunk, majd az oxidatív foszforilációt (oxidative phosphorylation - OXPHOS) ADP-vel (2 mM) indítottuk be. Ezt követően a mitokondriumokhoz TEGDMA-t adtunk. A kísérletek végén karboxiatrakitilátot (CAT) (2 $\mu$ M) adtunk a rendszerhez, amely gátolja az ADP-ATP cserét az ANT gátlásán keresztül [214].

#### 4.1.1 A CI-függő légzési szubsztrátok oxidációja

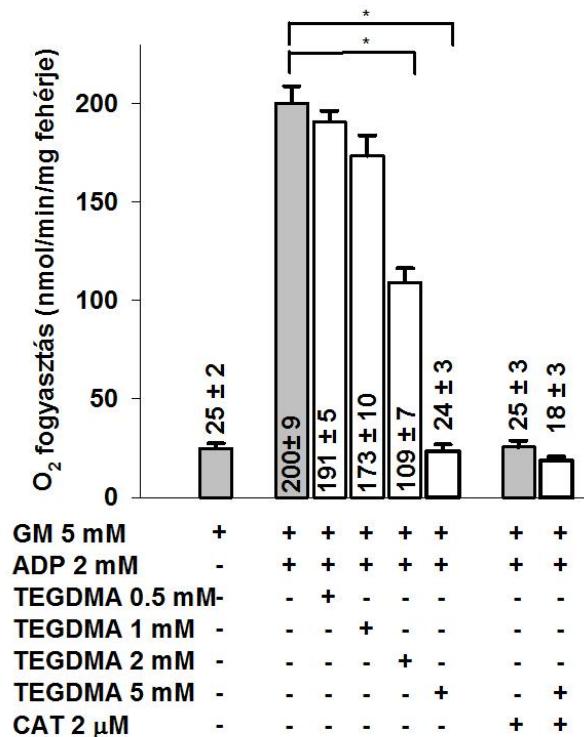
ADP jelenlétében a mitokondriális O<sub>2</sub> fogyasztás jelentősen nőtt (12  $\pm$  1 ről 98  $\pm$  2 nmol/min/mg fehérjére) az  $\alpha$ -KG-tal energetizált mitokondriumban (5. ábra A az eredeti görbével és az 5. ábra B). A magas respirációs kontroll-hányados (respiratory control ratio – RCR) (az ADP hozzáadás előtti és ADP hozzáadás után mért oxigénfogyasztás sebességének aránya) jó minőségű mitokondriális preparációra utal a vizsgálatok során (RCR > 7). A TEGDMA (5 mM) hozzáadása 69%-kal csökkentette a mitokondriális oxigénfogyasztást (98  $\pm$  2-ről 30  $\pm$  2 nmol/min/mg fehérjére) (5. B ábra)  $\alpha$ -KG jelenlétében. Az ANT gátlószer hozzáadásával csökkent a légzés az  $\alpha$ -KG légzési szubsztrát esetén TEGDMA jelenlétében és hiányában (5. ábra, A és B).



**5. ábra:** A TEGDMA hatása az izolált agyi mitokodriumok  $O_2$  fogyasztására alfa-ketoglutarát ( $\alpha$ -KG) légzési szubsztrát jelenlétében. A mitokondriumokat „A” mérőoldatban inkubáltuk, az Anyagok és módszerek (3.3) fejezetben leírtak alapján. ADP-t, TEGDMA-t (szürke b) görbe), kontrollként DMSO-t (fekete a) görbe) és karboxi-atraktilátot (CAT) adtunk a jelzéseknek megfelelően az eredeti görbéken látható módon (A ábra). A TEGDMA hatása (fehér oszlopok) látható összehasonlítva a kontrollal (szürke oszlopok, csak DMSO-t adtunk hozzá, TEGDMA hiányában, B ábra). Az oszlopokon feltüntetett oxigénfogyasztás értékek nmol/min/mg fehérjére vonatkoznak. Az ábrán látható eredmények 4 mérés átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját jelölik nmol/min/mg fehérje egységben az oszlopokon jelölve. Szignifikánsnak jelöltük a  $*p < 0,05$  értékeket a kontrollhoz képest.

A GM-al energetizált mitokondriumban a légzés  $25 \pm 2$ -ről  $200 \pm 9$  nmol/min/mg fehérjére fokozódott ADP hatására. Hasonlóan az  $\alpha$ -KG légzési szubsztrát esetén mért eredményekhez, a TEGDMA (5 mM) adása 88%-kal csökkentette az ADP-stimulált mitokondriális légzést (from  $200 \pm 9$  to  $24 \pm 3$  nmol/min/mg protein) (6. ábra). A

TEGDMA szignifikáns hatása az ADP-stimulált mitokondriális O<sub>2</sub> fogyasztásra már 2 mM koncentrációnál jelentkezett (6. ábra). Ennél kisebb TEGDMA koncentrációk esetében (0,5;1,0 mM) nem tapasztaltunk szignifikáns változást. A CAT csökkentette az oxigénfogyasztást mind a TEGDMA-val kezelt és nem kezelt mitokondriumban. A vizsgálataink során alkalmazott DMSO oldószernek nem volt toxikus hatása a mitokondriumokon. A pufferrel és a DMSO-val végzett kísérletekben azonos hatásokat detektáltunk a méréseink során.

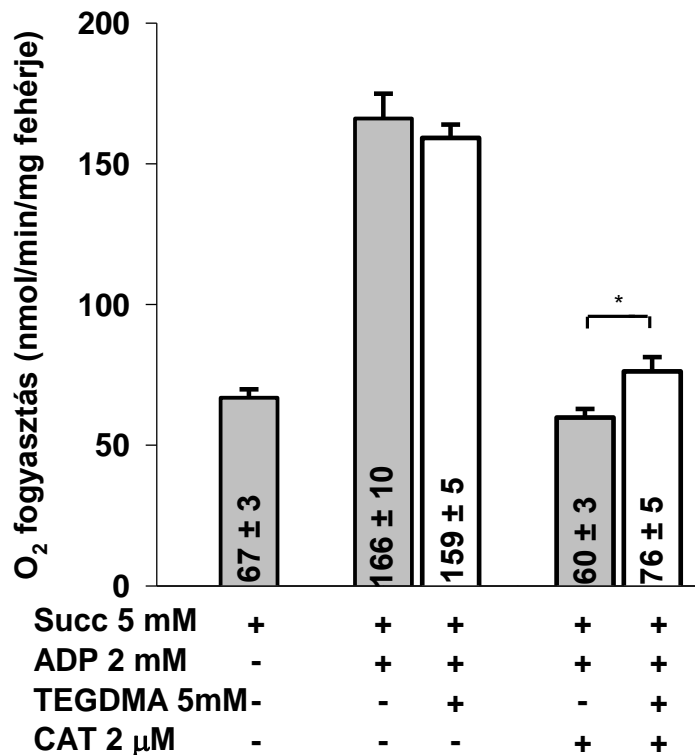


**6. ábra:** A TEGDMA hatása az izolált agyi mitokondriumok O<sub>2</sub> fogyasztására glutamát plusz malát (GM) légzési szubsztrát jelenlétében. A mitokondriumokat „A” mérőoldatban inkubáltuk, az Anyagok és módszerek (3.3) fejezetben leírtak alapján. ADP-t, TEGDMA-t, DMSO-t és karboxi-atraktilátot (CAT) adtunk a mérések során az izolált mitokondriumhoz. A különböző koncentrációjú TEGDMA hatásai (fehér

oszlopok) láthatók a GM-tal lélegeztetett mitokondriumra összehasonlítva a kontrollokkal (szürke oszlopok, az oldószeres kontroll kísérleteket jelöli, TEGDMA hiányában). Az oszlopokon feltüntetett oxigénfogyasztás értékek nmol/min/mg fehérjére vonatkoznak. Az ábrán látható eredmények 4 mérés átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját jelölik A \* a szignifikáns különbséget jelöli a kontrollhoz képest ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2 CII-függő légzési szubsztrát oxidációja

A légzési lánc más, nem NADH-hoz kötött bemenetét használó szubsztrát, a Succ oxidációját vizsgálva az ADP beadása után a TEGDMA nem befolyásolta szignifikánsan az oxigénfogyasztást ( $166 \pm 10$  nmol/min/mg fehérjéről  $159 \pm 5$  nmol/min/mg fehérjére) (7. ábra). Ezek az eredmények alátámasztják azt a feltételezést, hogy a TEGDMA nem gátolja a CII-t a légzési láncban.

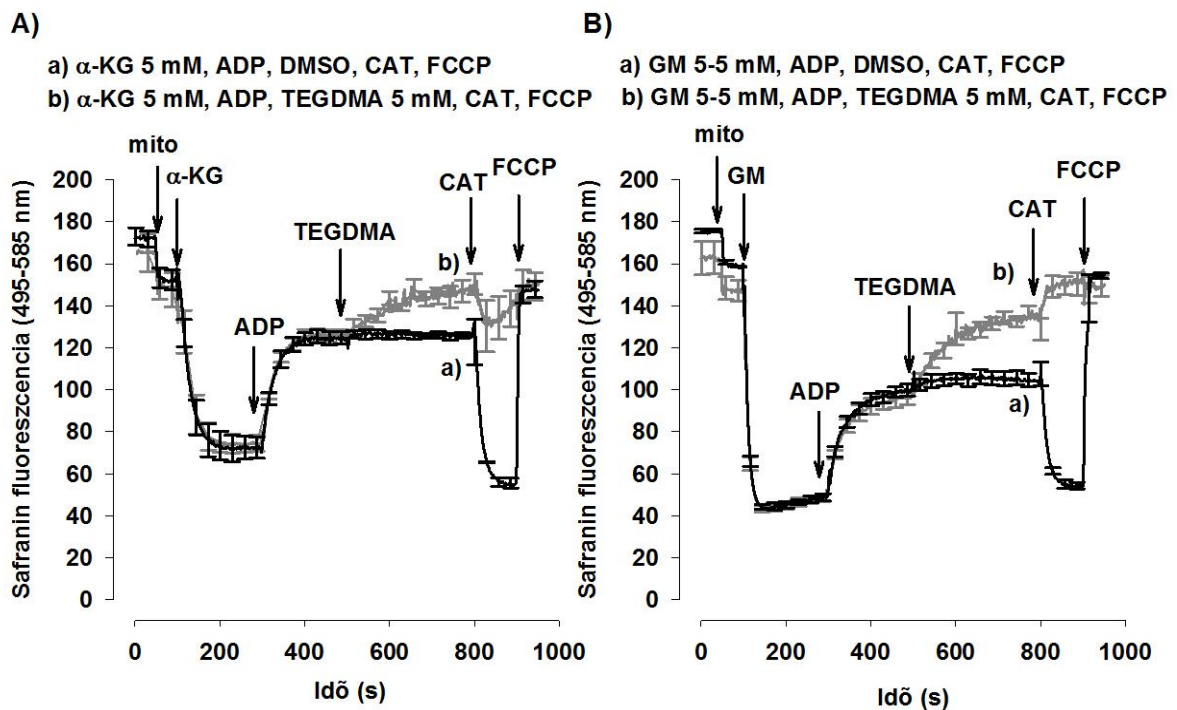


**7. ábra:** A TEGDMA hatása az izolált agyi mitokondriumok O<sub>2</sub> fogyasztására szukcinát (Succ) légzési szubsztrát jelenlétében. A mitokondriumokat „A” mérőoldatban inkubáltuk, az Anyagok és módszerek (3.2) fejezetben leírtak alapján. A TEGDMA hatásai (fehér oszlopok) láthatók összehasonlítva a kontrollokkal (szürke oszlopok, csak DMSO-t adtunk hozzá, TEGDMA hiányában). Az oszlopokon feltüntetett oxigénfogyasztás értékek nmol/min/mg fehérjére vonatkoznak. Az ábrán látható eredmények 4 mérés átlagát ± az átlag standard hibáját jelölik nmol/min/mg fehérje egységben az oszlopokon jelölve. A \* a szignifikáns különbséget jelöli a kontrollhoz képest (p<0,05).

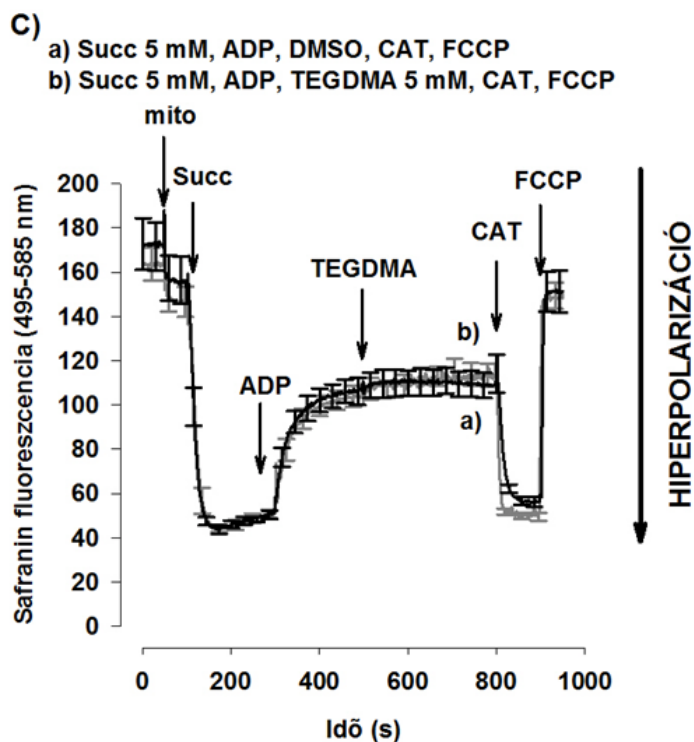
## 4.2 A TEGDMA hatása a mitokondriális membránpotenciálra ( $\Delta\psi_m$ )

A membránpotenciál a mitokondriumok bioenergetikai állapotának egyik fontos jellemzője, aminek a kiépülése alapvető feltétele az ATP szintézisnek. A  $\Delta\psi_m$ -t  $\alpha$ -KG, GM vagy Succ légzési szubsztrátokkal energetizált mitokondriumokon mértük. A kísérleti protokoll megegyezett az oxigénfogyasztás mérésénél használt protokollal (ld. előző alfejezet).

A légzési szubsztrátok jelenlétében a mitokondrium belső membránja hiperpolarizálódott (8. A,B,C ábra), amit a safranin fluoreszcencia csökkenése jelzett. A GM esetén a  $\Delta\psi_m$  magasabb volt, mint  $\alpha$ -KG légzési szubsztrát hozzáadásakor, ami a GM gyorsabb oxidációját tükrözi (8. A,B ábra). Az ADP további hozzáadásakor a membrán mindkét szubsztrát esetén depolarizálódott. Mind az  $\alpha$ -KG és a GM légzési szubsztrátokkal energetizált mitokondriumok esetén a TEGDMA további depolarizációt okozott (8. ábra A,B, b görbe).







**8. ábra:** A TEGDMA hatása az alfa-ketoglutaráttal ( $\alpha$ -KG), (A), a glutamát *plusz* maláttal (GM), (B) és szukcináttal (Succ) (C) légző izolált agyi mitokondriumok membránpotenciáljára safranin fluoreszcens festékkel meghatározva. A mitokondriumokat (0,1 mg fehérje/ml) az Anyagok és módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően mérőoldat A-ban inkubáltuk. A TEGDMA (5mM),  $\alpha$ -KG (5mM), GM (5-5 mM), Succ (5mM), karboxi-atraktilát (CAT; 2  $\mu$ M) és FCCP (250 nM) hozzáadását a rendszerhez nyilak jelzik. A TEGDMA hatását (sötétszürke; b) görbe) összehasonlítottuk a kontroll körülményekhez képest (TEGDMA nélkül, fekete; a) görbe). A görbék a mérések átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatják 4 független mérés alapján.

CAT hozzáadásakor a TEGDMA-val kezelt mitokondriumok teljes depolarizációja következett be, ezzel ellentétben a kontroll mitokondriumokban a CAT a mitokondriális belső membrán hiperpolarizációját okozta. A mitokondrium teljes depolarizációja a szétkapcsolószer karbonilcianid-p-trifluorometoxi-fenilhidrazon (FCCP; 250 nM) hozzáadásával következett be.

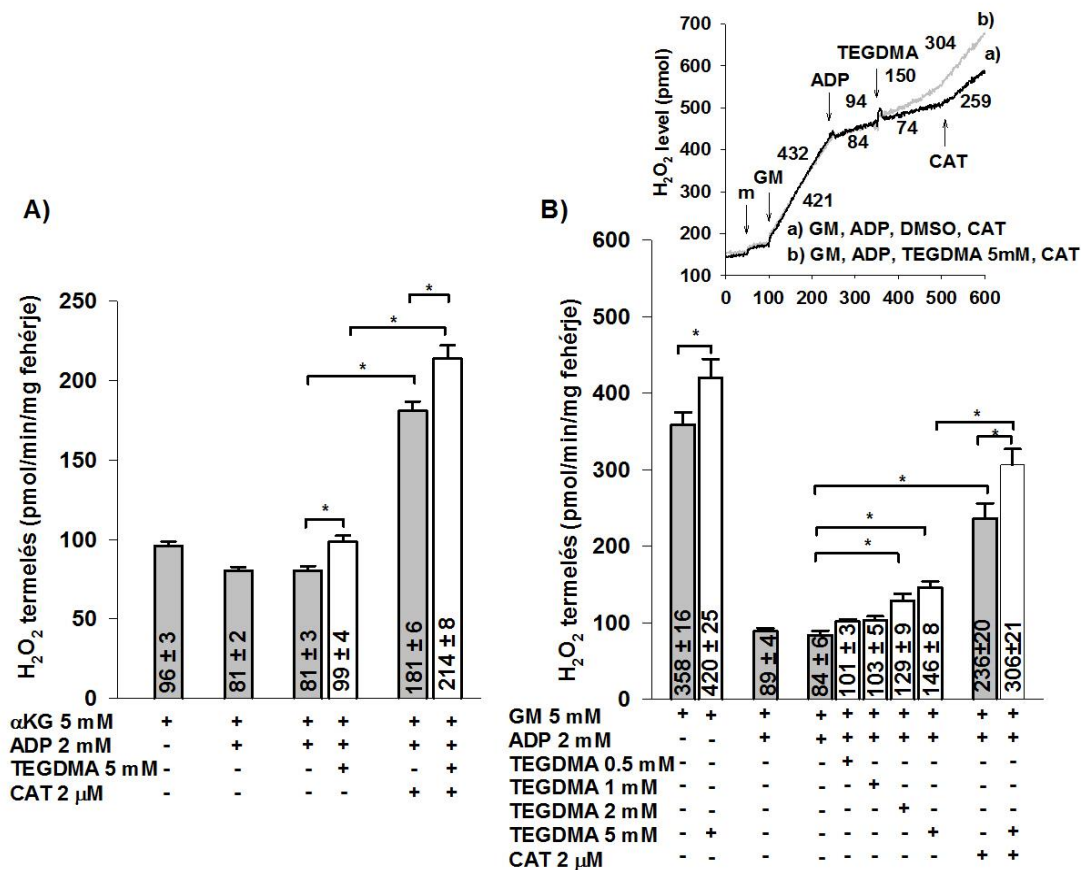
Ellentétben a CI közreműködésével oxidálódó szubsztrátoknál megfigyeltekkel (8. *A, B ábra*), a szukcináttal energetizált mitokondriumban a TEGDMA hatására nem következett be depolarizáció. CAT hozzáadására hiperpolarizálódott a belső membrán a TEGDMA-val kezelt és a kontroll mitokondriumokban is (8. *ábra C*). A  $\Delta\psi_m$  mérési eredmények is alátámasztják azt a feltételezést, hogy a TEGDMA szelektíven gátolja a CI aktivitást.

### 4.3 A TEGDMA hatása a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képzésére és eliminációjára

A nemzetközi irodalomban elfogadott tény, hogy a mitokondrium jelentős szerepet tölt be a redox homeosztázisban [140, 215, 216]. A mitokondrium nemcsak a reaktív oxigén származék (ROS) képzésben vesz részt, hanem a ROS eliminációjában is (ld. Tretter és mtsai összefoglaló közleménye [176]). Az alábbi kísérletekben a mitokondriális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést és eliminációt mértük GM CI-függő légzési szubsztrát jelenlétében, míg a CII-függő légzési szubsztrátok esetén (pl. Succ és  $\alpha$ -GP) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képződést detektáltuk.

#### 4.3.1 A mitokondrium H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelése NADH-termelő (CI-függő) légzési szubsztrátok esetén

A 9. A,B ábrán jól megfigyelhető, hogy a GM és az  $\alpha$ -KG légzési szubsztrátok a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést jelentősen fokozták a mitokondriumokban. A TEGDMA hozzáadására 17%-kal fokozódott a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés ( $358 \pm 16$ -ról  $420 \pm 25$  pmol/min/mg fehérjére) a GM-al energetizált mitokondriumokban, ADP hozzáadása nélkül (9. B ábra). A kísérletek során az ADP hozzáadása csökkentette a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést [167, 217] az  $\alpha$ -KG- és a GM-tal energetizált mitokondriumokban is a mitokondrium belső membránjának depolarizációja miatt. ADP kezelés után TEGDMA hatására a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés 22%-kal fokozódott ( $81 \pm 3$ -ről  $99 \pm 4$  pmol/min/mg fehérjére) az  $\alpha$ -KG-tal energetizált mitokondriumokban (9. ábra A), és 74%-kal fokozódott ( $84 \pm 6$ -ről  $146 \pm 8$  pmol/min/mg fehérjére) a GM-tal kezelt mitokondriumokban (9.B ábra, B index ábra). Már 2 mM TEGDMA esetén is szignifikánsan fokozódott a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés (9.B ábra). Majd ezt követően CAT hozzáadására ismét jelentősen fokozódott a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képződés TEGDMA jelenlétében és kontroll körülmények között is.

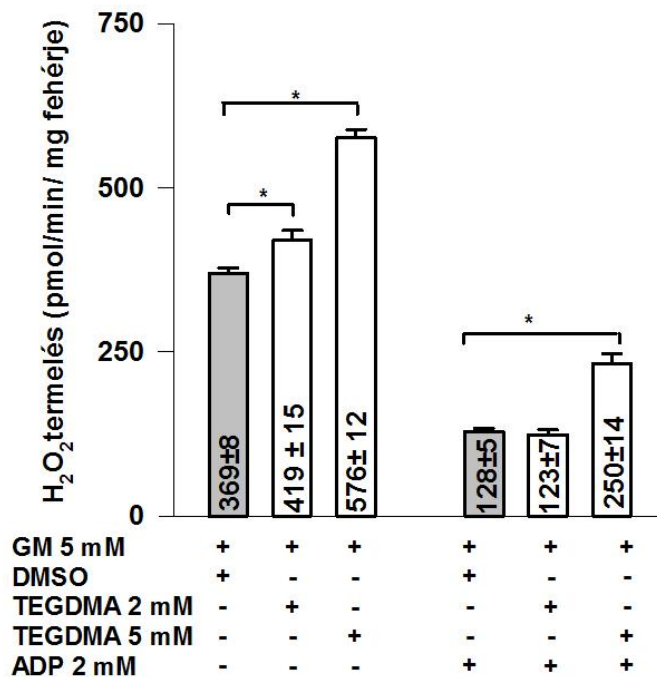


**9. ábra:** A TEGDMA hatása a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelésre alfa- ketoglutaráttal (α-KG; A ábra), glutamát *plusz* maláttal (GM; B ábra) energetizált izolált agyi mitokondriumokban. A B ábrához tartozó index kis ábrán láthatók az eredeti görbék és számok, amelyek a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés arányait ábrázolják (pmol/min/mg fehérje). A GM, ADP, TEGDMA (szürke görbe) vagy DMSO (fekete görbe), a karboxi-atraktilát (CAT) hozzáadását nyilak jelölik (B ábra index ábrája). Az A-B ábrákon a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés látható az oszlopdiaqrammon. Az ábrán látható eredmények 4 mérés átlagát ± az átlag standard hibáját jelölik pmol/min/mg fehérje egységben az oszlopokon jelölve. Szignifikánsnak jelöltük a \*p<0,05 értékeket a kontrollhoz képest.

#### 4.3.2 A TEGDMA előkezelés hatása a ROS termelésre

A torna-peroxidáz (horseradish peroxidase - HRP) – Amplex UltraRed rendszer nem csak a  $H_2O_2$  termelést detektálja, hanem eliminálja is a képződött  $H_2O_2$ -t [176], mérsékelve a  $H_2O_2$  termeléssel összefüggésben levő oxidatív stresszt. Ennek kiküszöbölése érdekében a mitokondriumot TEGDMA-val kezeltük elő 10 percig GM jelenlétében és Amplex + HRP hiányában (10. ábra).

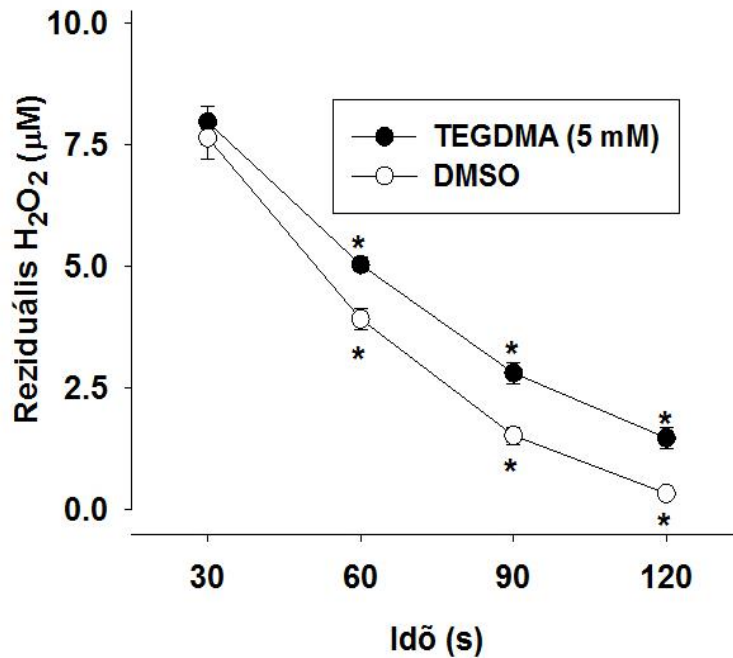
10 perces preinkubálást követően mértük a  $H_2O_2$  termelést Amplex plusz HRP rendszerrel. TEGDMA (5 mM) hatására, ADP nélkül a  $H_2O_2$  képződés 56%-kal fokozódott ( $369 \pm 8$ -ról  $576 \pm 12$  pmol/min/mg fehérjére) GM légzési szubsztrát jelenlétében (10. ábra). Az előinkubált mitokondriumokban 5mM TEGDMA és ADP jelenlétében 95%-al volt magasabb a  $H_2O_2$  képzés, mint TEGDMA hiányában.



**10. ábra:** A TEGDMA előkezelés hatása a mitokondriális  $H_2O_2$  termelésére. A mitokondriumokat 10 percig inkubáltuk elő glutamát plusz malát (5-5 mM) légzési szubsztráttal, „A” mérőoldatban TEGDMA hiányában (szürke oszlop) és TEGDMA jelenlétében (fehér oszlop). 10 perc múlva, torna-peroxidázt (HRP) és Amplex UltraRed-t adtunk a rendszerhez (ld. Anyagok és módszer fejezet) és a  $H_2O_2$  termelést detektáltuk. Az ábrán látható eredmények 7 mérés átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját jelölik pmol/min/mg fehérje egységben az oszlopokon jelölve. Szignifikánsnak jelöltük a  $*p < 0,05$  értékeket a kontrollhoz képest.

### **4.3.3 $H_2O_2$ eliminációja a mitokondriumban NADH-t termelő szubsztrátok esetében**

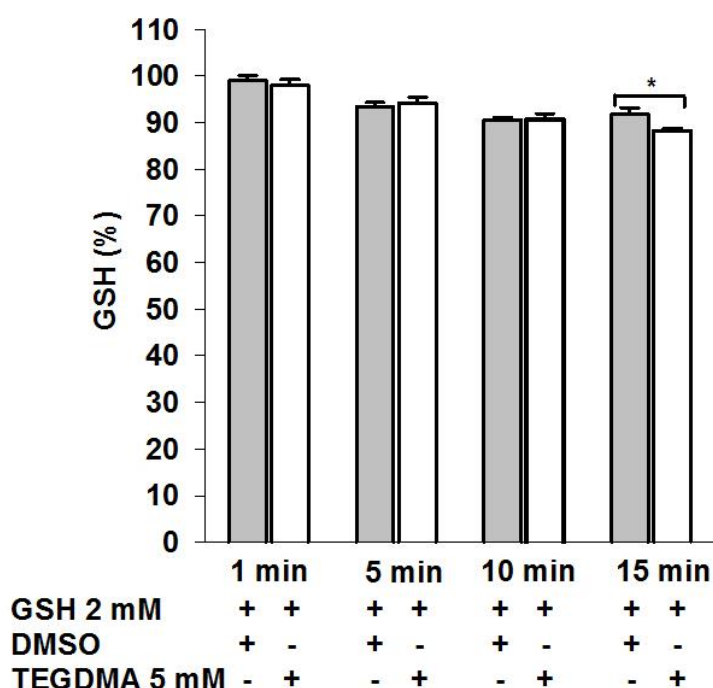
Az izolált mitokondriumok esetében exogén eredetű  $H_2O_2$  hozzáadása mellett és TEGDMA (5 mM) jelenlétében illetve hiányában vizsgáltuk a  $H_2O_2$  eltűnését, ahogy az Anyagok és módszerek című fejezetben (3. fejezet) található. TEGDMA jelenlétében szignifikánsan csökkent a  $H_2O_2$  elimináció (11. ábra) GM légzési szubsztrát jelenlétében.



**11. ábra:** A külsőleg adott  $H_2O_2$  eltávolítása a GM-tal energetizált mitokondriumokban TEGDMA jelenlétében és hiányában történt (5 mM). A mitokondriumokat (0,1 mg fehérje/ml) 5 percig inkubáltuk, majd  $H_2O_2$ -vel (10  $\mu$ M) kezeltük. A visszamaradó  $H_2O_2$  meghatározására mintát vettünk ki különböző időintervallumokban, az Anyag és módszerek fejezetben leírtak szerint. Az ábrán látható eredmények 9 mérés átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját jelölik  $\mu$ M egységben. A szignifikáns eredményeket ( $p < 0,05$ ) csillaggal jelöltük az ábrán.

#### 4.3.4 A TEGDMA és a GSH közötti kölcsönhatás

A korábban leírt kísérletekhez hasonlóan [127], a GSH és a TEGDMA (5 mM) közötti direkt kölcsönhatást vizsgáltuk mitokondrium-mentes mérőoldatban. A 15 percig tartó inkubáció után 3,7%-os GSH koncentráció csökkenést detektáltunk 5mM TEGDMA jelenlétében (12. ábra).



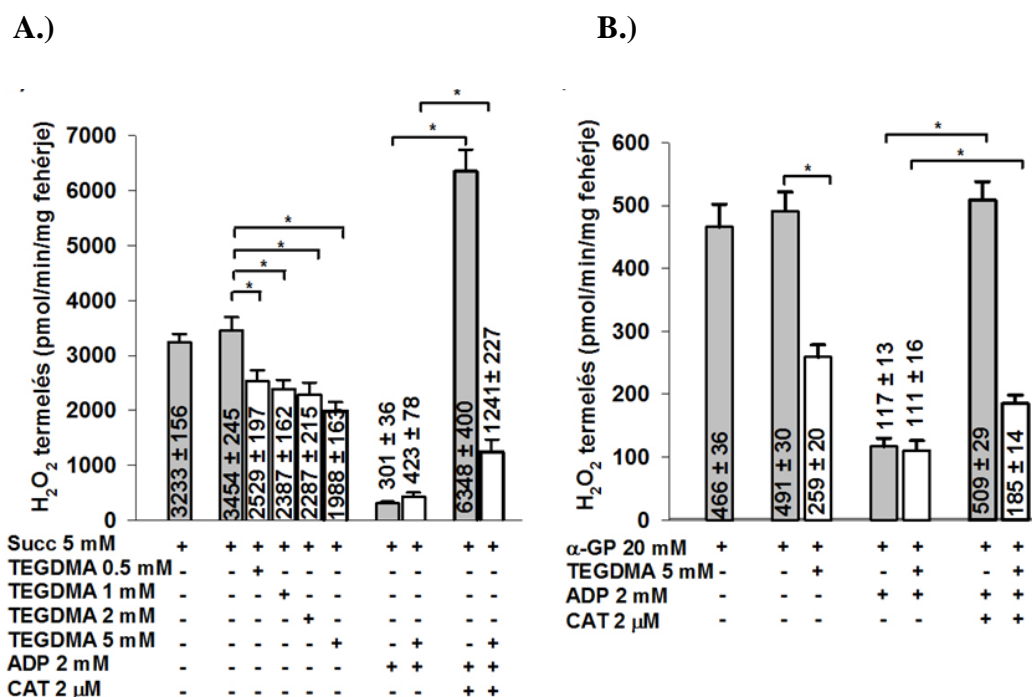
**12. ábra:** A TEGDMA inkubáció hatása a mitokondrium mentes mérőoldat GSH szintjére. A GSH-t (2 mM) TEGDMA-val inkubáltuk 15 percig 100 mM  $K_2HPO_4$  oldatban. Ezt követően megfelelő időközönként mintát vettünk ki és a redukált glutation (GSH) koncentrációt határoztuk meg 5,5'-dithiobisz (2-nitrobenzoát) (DTNB) segítségével, spektrofotométerrel ( $\epsilon_{412} = 13600 M^{-1} cm^{-1}$ ). Az eredményeket az eredeti GSH koncentráció százalékos arányában fejeztük ki. Az ábrán látható eredmények 7 mérés átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját jelölik %-ban. A szignifikanciát ( $p < 0,05$ ) csillaggal jelöltük.



### 4.3.5 A mitokondrium H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelése FADH<sub>2</sub>-termelő (CII-függő) légzési szubsztrátok esetén

#### 4.3.5.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés a szukcináttal energetizált mitokondriumokban

A Succ-tal energetizált mitokondriumokhoz TEGDMA-t vagy DMSO-t adtunk. A TEGDMA (5 mM) 42 %-kal csökkentette a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést (3454 ± 245-ről 1988 ± 163 pmol/min/mg fehérjére) Succ jelenlétében. Már 0,5 mM TEGDMA koncentrációnál szignifikáns H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képződés csökkenés volt megfigyelhető. Az ADP hatására további H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> csökkenés (423 ± 78 pmol/min/mg fehérje) volt detektálható TEGDMA (5 mM) jelenlétében és a DMSO-val kezelt mitokondriumokban (301 ± 36 pmol/min/mg fehérje) (13.A ábra) is egyaránt.



**13. ábra:** A TEGDMA hatása a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelésre szukcináttal (Succ; A ábra) vagy alfa-glicerofoszfáttal (20 mM) ( $\alpha$ -GP; B ábra); FADH<sub>2</sub>-függő légzési szubsztrátokkal energetizált izolált agyi mitokondriumokban. Az A-B ábrákon a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés látható

az oszlopdiagrammon. Az ábrán látható eredmények 4 mérés átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját jelölik pmol/min/mg fehérje egységben az oszlopokon jelölve. Szignifikánsnak jelöltük a  $*p < 0,05$  értékeket a kontrollhoz képest.

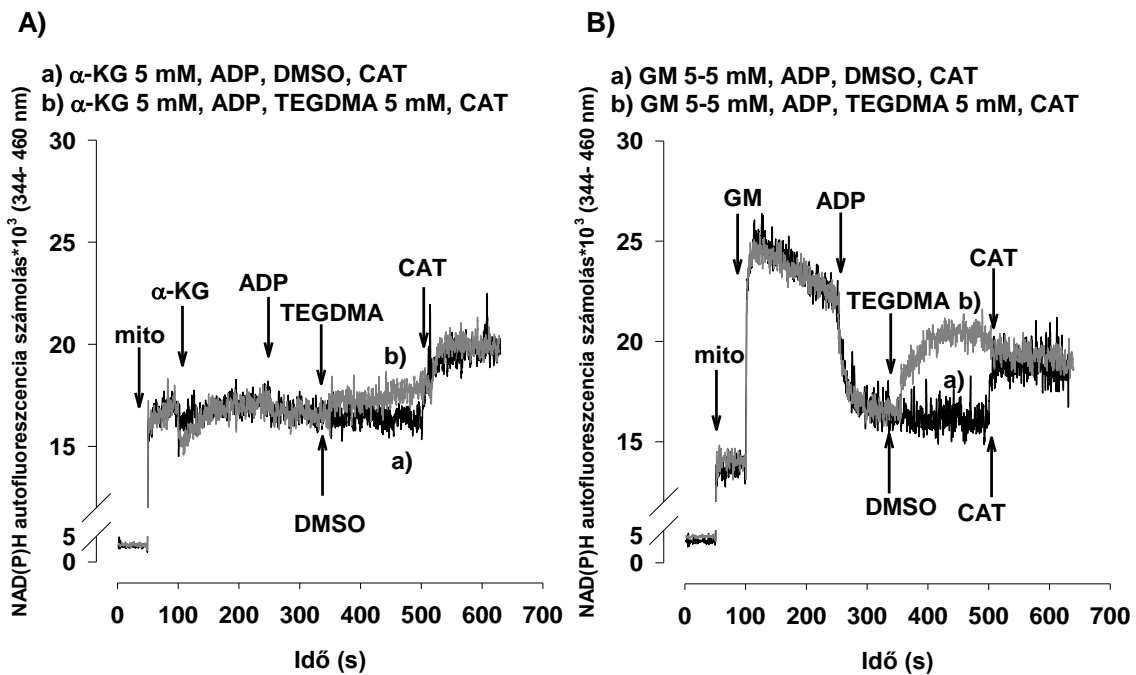
Az ANT gátlásával, CAT hatására a ROS termelés újra fokozódott. A TEGDMA-val kezelt csoportban a  $H_2O_2$  termelődés szignifikánsan alacsonyabb volt ( $1241 \pm 227$  pmol/min/mg fehérje), mint a kontroll csoportban ( $6348 \pm 400$  pmol/min/mg fehérje) (*13.A ábra*), ami arra utal, hogy a TEGDMA gátolta a CI-t.

#### 4.3.5.2 $H_2O_2$ termelés az $\alpha$ -GP-tal energetizált mitokondriumban

Az agyban az  $\alpha$ -GPGH aktivitása nagyon magas [218]. Ez az enzim (hasonlóan a szukcinát-dehidrogenázhoz; SDH) egyrészt elektronokkal látja el a légzési láncot, ahol az elektronok az UQ-ra (koenzim Q) kerülnek, másrészt RET-et is generál. Az  $\alpha$ -GP-tal energetizált mitokondriumban a TEGDMA 47%-os  $H_2O_2$  termelés csökkenést ( $491 \pm 30$ -ról  $259 \pm 20$  pmol/min/mg fehérje) eredményezett (*13.B ábra*). Az ADP beadása csökkentette a  $H_2O_2$  keletkezését mindkét csoportban; ADP jelenlétében nem volt megfigyelhető különbség a DMSO-val vagy a TEGDMA-val kezelt csoportban. Kontroll körülmények között a CAT visszaállította a  $H_2O_2$  termelést arra a szintre, ami az ADP beadása előtt volt detektálható ( $117 \pm 13$ -ről  $509 \pm 29$  pmol/min/mg fehérjére). A TEGDMA-val kezelt mitokondriumokban a CAT fokozta a  $H_2O_2$  termelést ( $111 \pm 16$ -ról  $185 \pm 14$  pmol/min/mg fehérjére), de ez a hatás sokkal kisebb volt, mint a kontroll csoportban (*13.B ábra*).

#### 4.4 A TEGDMA hatása a NAD(P)H szintre

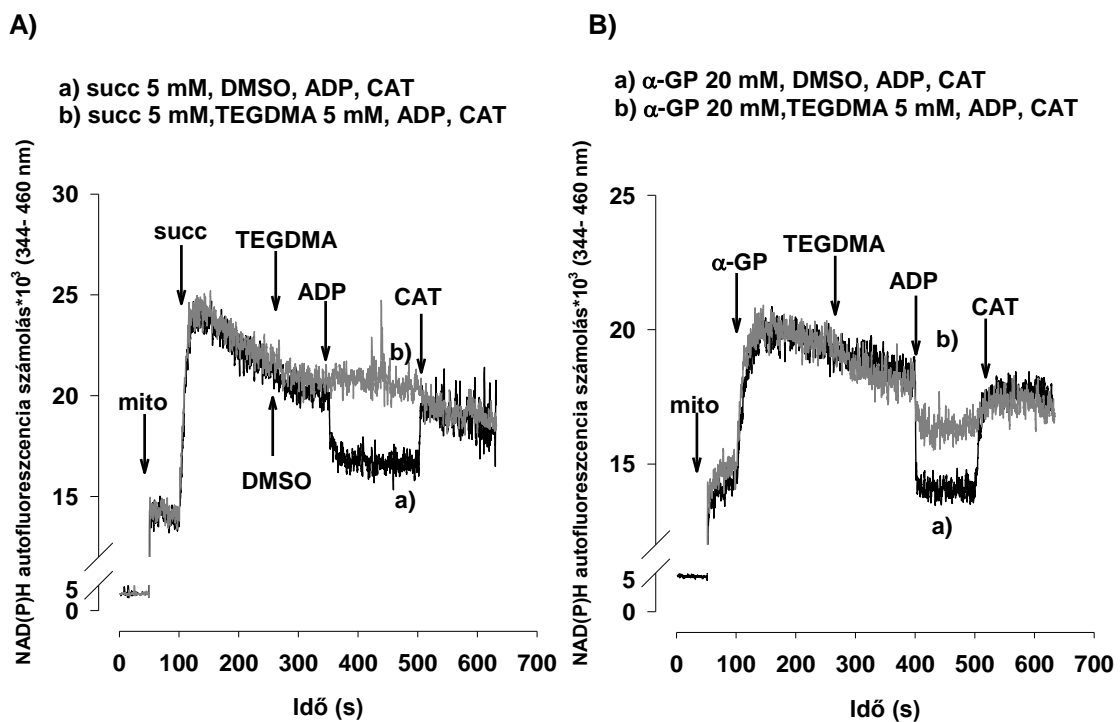
Mind a NADH-t termelő (az  $\alpha$ -KG és a GM), mind a FADH<sub>2</sub>-t termelő szubsztrátok (Succ és  $\alpha$ -GP) adása növelte a mitokondriális NAD(P)H steady state szintet (14.A,B ; 15.A,B ábra). A Succ és az  $\alpha$ -GP hatására fokozódó NAD(P)H szint valószínűleg a RET mechanizmusának köszönhető [219-221]. Az ADP hatására bekövetkező légzésfokozódás a NAD(P)H autofluoreszcencia csökkenésével járt. TEGDMA (5mM) jelenlétében magasabb NAD(P)H autofluoreszcencia volt detektálható mind CI- mind CII-függő szubsztrátok esetén a kontrollesoporthoz viszonyítva (14-15ábra, b) görbék).



**14. ábra:** A TEGDMA hatása a NAD(P)H autofluoreszcenciára az alfa-ketoglutaráttal ( $\alpha$ -KG ) (A) vagy glutamát *plusz* maláttal (GM) (B) energetizált mitokondriumokban. ADP-t (2 mM), TEGDMA-t (5mM) vagy DMSO-t és karboxi-atraktilátot (CAT; 2  $\mu$ M) adtunk a mérések során, amit nyilakkal jelöltünk az ábrán. A vizsgálatok eredeti reprezentatív ábrái láthatók az A-B ábrákon (szürke, b) görbe: TEGDMA jelenlétében; fekete, a) görbe: TEGDMA hiányában).

Az  $\alpha$ -KG-tal energetizált mitokondriumokban a TEGDMA indukálta NAD(P)H autofluoreszcencia növekedése lassú és fokozatos volt (14.A ábra), azonban a GM-tal lélegző mitokondriumban a TEGDMA gyors NAD(P)H szintemelkedést okozott (14.B ábra). CAT jelenlétében nem volt különbség megfigyelhető a NAD(P)H autofluoreszcencia értékekben a kontroll és a TEGDMA-val kezelt mitokondriumokban (14.A-B ábrák).

A TEGDMA jelenlétében a Succ-tal energetizált mitokondriumokban az ADP nem csökkentette a NAD(P)H szintet a kontrollhoz viszonyítva (15.A ábra, b) görbe), ellentétben a TEGDMA-val kezelt  $\alpha$ -GP-tal lélegző mitokondriumokkal, ahol enyhe fokú NAD(P)H szint csökkenés volt megfigyelhető (15.B ábra, b) görbe).



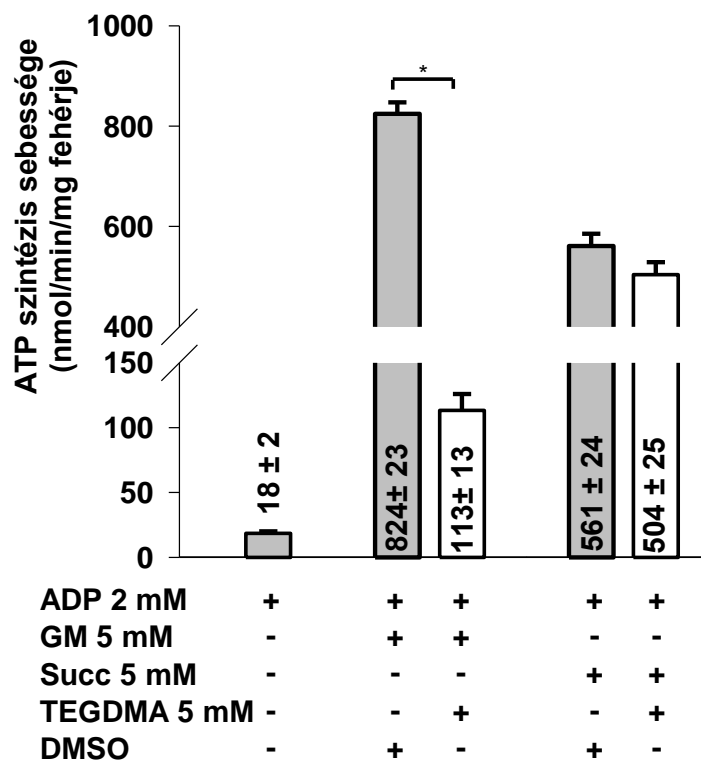
**15. ábra:** A TEGDMA hatása a NAD(P)H autofluoreszcenciára szukcináttal (Succ) (A ábra) vagy alfa-glicerofoszfáttal ( $\alpha$ -GP) (B ábra) energetizált mitokondriumokban. A mitokondriumokat (0,1 mg/ml) különböző légzési szubsztrátokkal inkubáltuk.

TEGDMA-t vagy DMSO-t, ADP-t (2 mM) és karboxi-atraktilátot (CAT, 2  $\mu$ M) adtunk a mérések során, amit nyilakkal jelöltünk az ábrán. A vizsgálatok eredeti reprezentatív ábrái láthatók az A-B ábrákon (szürke, b) görbe: TEGDMA jelenlétében; fekete, a) görbe: TEGDMA hiányában).

#### 4.5 A TEGDMA hatása az ATP szintézisre

A mitokondriumok aktuális bioenergetikai funkcióinak pontosabb jellemzése érdekében az oxigénfogyasztás és  $\Delta\psi_m$  mellett, az ATP termelést is megvizsgáltuk (16. ábra). ADP adása után, a légzési szubsztrátok hiányában, az adenilát-kinázhoz (AK) kapcsolódó ATP szintézist ( $18 \pm 2$  nmol/min/mg fehérje) lehetett detektálni az AK gátlószerének, a  $200 \mu\text{M}$   $\text{P}^1, \text{P}^5$ -di(adenozin-5') pentafoszfát (AP5) jelenlétében, ami nem gátolta teljes mértékben az AK aktivitását.

Az oxidatív foszforilációt a légzési szubsztrátok hozzáadásával indítottuk ADP jelenlétében. A GM-tal energetizált TEGDMA-val kezelt mitokondriumban az ATP termelés 86%-kal csökkent ( $824 \pm 23$ -ról  $113 \pm 13$  nmol/min/mg fehérjére) a kontroll csoporthoz képest.



**16. ábra:** A TEGDMA hatása az ATP szintézisre glutamát *plusz* malát (GM) vagy szukcináttal (Succ) energetizált izolált agyi mitokondriumokban. A fehér oszlopok a TEGDMA hozzáadását jelölik ADP jelenlétében, míg a szürke oszlopok a DMSO mellett mért ATP szintézist jelölik. Az ATP szintézis mértékét az oszlopokon jeleztük nmol/min/mg fehérjére vonatkoztatva. Az ábrán látható eredmények 11 mérés átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját jelölik nmol/min/mg fehérje egységben az oszlopokon jelölve. Szignifikánsnak jelöltük a  $*p < 0,05$  értékeket a kontrollhoz képest.

Ezzel ellentétben, a TEGDMA (5 mM) hozzáadása a Succ-tal légző mitokondriumokban mindössze 10.2 %-os ATP szintézis csökkenést okozott ( $561 \pm 24$ -ről  $504 \pm 25$  nmol/min/mg fehérjére csökkent).

#### **4.6 A TEGDMA hatása a CI aktivitásra**

Ahhoz, hogy megerősítsük hipotézisünket, mely szerint a TEGDMA a CI-t gátolja, közvetlenül a CI aktivitását mértük. A CI aktivitása  $61.8 \pm 3.2$  %-kal és  $70.6 \pm 3.3$  %-kal csökkent a 2 és az 5 mM TEGDMA koncentrációk esetén (az adatokat nem ábrázoltuk).

## 5. Megbeszélés

Az inkomplett polimerizáció és a szájüregben történő biodegradáció következtében kioldódó TEGDMA számos sejtfunkciót hátrányosan befolyásolhat, oxidatív stresszt (ld. Krifka és mtsai összefoglaló közleménye [9]), apoptózist, nekrotikus sejthalált okozhat [113, 121, 222, 223] és genetikai mutációkat idézhet elő [11, 224]. Több rezin molekuláról kimutatták, hogy csökkentik a GSH és egyéb antioxidáns szintet [100]. A sejt proliferáció gátlása, az apoptózis fokozása és az oszteoklaszt differenciáció gátlása [126] mind összefüggésben állhatnak a ROS termelés fokozódásával. Az antioxidánsok - pl. az N-acetil-cisztein (NAC), a Trolox vagy az aszkorbinsav - jótékony hatása is azt a feltételezést erősíti meg, hogy a TEGDMA citotoxikus hatásainak hátterében a megnövekedett ROS termelés állhat [64, 111, 123, 124, 131, 222, 225]. Yeh és munkatársai nemrég összefoglalták közleményükben a TEGDMA okozta NOX4 aktiválódásának szerepét a ROS termelés és az apoptózis hátterében [132]. A fokozódott ROS képzés hátterében álló mechanizmus eddig még nem tisztázott (összefoglaló közlemény [9]).

A mitokondrium részvételét a TEGDMA toxicitásában már korábban feltételezték [128]. A sejt számára nélkülözhetetlen ATP a mitokondriumban termelődik, ezért ez a sejtorganelum elengedhetetlenül fontos szerepet tölt be a sejtek életképességében és a sejthalálban. Tekintettel arra, hogy a ROS képzésben és eliminálásban is fontos szerepük van a mitokondriumoknak (ld. összefoglaló közlemény [138]), logikusnak látszik, hogy a TEGDMA toxicitásában mitokondriális célpontokat keressünk. Ezért kísérleteinkben a TEGDMA hatásait vizsgáltuk a mitokondriumok bioenergetikai paramétereire.



## 5.1 A TEGDMA hatása a mitokondriális légzésre

A mitokondriális légzés érzékeny indikátora a mitokondriális funkcióknak [147]. Az  $\alpha$ -KG- és a GM-tal légző mitokondriumokban a TEGDMA hatására csökkent az oxigénfogyasztás (5.A,B ábra, 6. ábra), miközben a FAD koenzimmel működő, Succ-t oxidáló mitokondriumokban a TEGDMA nem befolyásolta az oxigénfogyasztást (7. ábra). Ebből az következik, hogy a CI-függő szubsztrátok oxidációja gátolt.

Az eredményeink ellentétben állnak egy korábbi megfigyeléssel [226], ahol az izolált, Succ-tal *plus* rotenonnal kezelt mitokondriumok légzését a TEGDMA gátolta. Ennek az ellentmondásnak a hátterében az eltérő kísérleti modell állhat. Az előbb említett közleményben a HL-60 sejteket egy órán keresztül TEGDMA-val preinkubálták, és a mitokondriumokat ezután izolálták és vizsgálták. Az inkubációs idő alatt a mitokondriumok olyan strukturális károsodást szenvedhettek el, amely potenciálisan károsíthatta a Succ-tal energetizált mitokondriális légzést is.

Jelen tanulmányban a CI-függő szubsztrátok jelenlétében megfigyelt csökkent mitokondriális légzés hátterében a következő okok állhatnak: (i) a csökkent ATP-áz aktivitás [227-229], (ii) az ANT gátlása [230], (iii) a légzési szubsztrátok és/vagy a szervetlen foszfátok csökkent transzportja [231], vagy (iv) a CI és / vagy az érintett dehidrogenáz enzimek hiányos működése [232, 233]. A Succ jelenlétében észlelt normális légzés azonban kizárta az i), ii) és részben az iii) pontokban felsorolt okokat. Az oxigénfogyasztás csökkenése mögötti mechanizmus tisztázása érdekében megvizsgáltuk a TEGDMA hatását a mitokondriumok membránpotenciáljára.

## 5.2 A TEGDMA hatása a mitokondriális membránpotenciálra ( $\Delta\psi_m$ )

A mitokondriális membránpotenciál fenntartása kulcsfontosságú a mitokondriumok fiziológias működéséhez. A mitokondriumok a protongradienst az ATP szintézisre, a transzportfolyamatok elősegítésére, az ionok [150], a metabolitok [234] és a fehérjék [235] szállítására használják fel a mitokondriális belső membránon keresztül. Korábbi vizsgálatban Lefeuvre és munkatársai gingivális fibroblaszokon mérték TEGDMA jelenlétében a  $\Delta\psi_m$ -t, és a mitokondriális membrán depolarizációját detektálták [128].

Mivel sejtes rendszerekben a mitokondriumok egyidejűleg különböző légzési szubsztrátokkal lélegeznek, ezért ilyen rendszerekben nagyon nehéz meghatározni a vegyületek valós célpontját.

Jelenlegi vizsgálatainkban a  $\Delta\psi_m$  mérések eredményei szintén alátámasztották, hogy a TEGDMA a CI-t gátolja. A NADH-termelő légzési szubsztrátok oxidációja során a mitokondriumokban a TEGDMA hatására csökkent a  $\Delta\psi_m$  (8.A,B ábra). Ezzel ellentétben a Succ-t oxidáló mitokondriumokban a TEGDMA nem befolyásolta a  $\Delta\psi_m$ -t (8.C ábra).

Ezek az eredmények ismételtén azt bizonyítják, hogy a TEGDMA nem gátolja az ANT-t vagy az ATP-ázst; ugyanis, ha ezeknek a molekuláknak a szelektív gátlószereit alkalmazzuk, akkor a  $\Delta\psi_m$  hiperpolarizálna, függetlenül az alkalmazott légzési szubsztráttól [166]. Az eddigi eredmények összhangban vannak azzal a feltételezéssel, hogy a TEGDMA a CI-t gátolja.

### 5.3 A TEGDMA hatása a ROS homeosztázisra

Amint korábban már tárgyaltuk, általános az egyetértés abban, hogy a TEGDMA a sejtekben oxidatív stresszt okoz, azonban pontos szerepe a redox egyensúly megbomlásában még nem tisztázott. Nemrégiben Yeh és munkatársai azt az eredményt közzölték, hogy a NOX 4 aktiválása kulcsszerepet játszik a TEGDMA okozta ROS termelésben [132].

Feltételezésünk szerint mitokondriális célpontok is részt vesznek a TEGDMA celluláris toxicitásában, amit az bizonyítana, hogy a TEGDMA fokozza a mitokondriális ROS termelést. Ezt a hipotézist vizsgáltuk a következőkben.

#### 5.3.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés NADH-termelő (CI-függő) légzési szubsztrátok esetén

A légzési szubsztrátok hozzáadása a mitokondriumokhoz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést indított el (9. ábra). Az  $\alpha$ -KG és a GM ADP hiányában különböző mértékben fokozta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képződést (9.A,B ábra). A légzési szubsztrát okozta fokozott arányú H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés a GM esetén a gyorsabb oxidációnak (6. ábra) és az ennek következtében kialakuló magasabb  $\Delta\psi_m$ -nak köszönhető (8.B ábra) [217]. Összefüggést találtunk a  $\Delta\psi_m$  és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelődés között (8.A,B ábra és 9.A,B ábra), ami egyezik Starkov és munkatársainak eredményeivel [217]. Az ADP hozzáadása csökkentette a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést az  $\alpha$ -KG- és a GM-t oxidáló mitokondriumokban (9.A,B ábra). Minél magasabb volt a  $\Delta\psi_m$  az ADP hozzáadása előtt, annál nagyobb volt a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés csökkenése (9.A,B ábra). Az ADP után a TEGDMA adása szignifikánsan fokozta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést mindkét légzési szubsztrát használata esetén (az  $\alpha$ -KG esetében 18%-os, a GM esetében 74%-os növekedés volt mérhető a kontrollokhöz képest) (9.A,B ábra).

A CI gátlószerek alkalmazása esetén a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képződés fokozódását figyeltük meg. A CI számos ROS képző hellyel rendelkezik (ld: [159, 162]); a légzési láncban azok az elektron szállító komplexek, amelyek az inhibitor kötőhelyétől proximálisan helyezkednek el nagymértékben redukált állapotban vannak [140]. A ROS-képző hely redukálása növeli az elektron „szökés” valószínűségét. A CI szubsztrátokat (glutamát

*plusz* malát) oxidáló mitokondriumok esetében a TEGDMA jelenléte fokozta a  $H_2O_2$  termelést mind ADP jelenlétében és hiányában (9.B ábra). A fokozott  $H_2O_2$  termelés így elfogyaszthatja az endogén antioxidánsokat, például a GSH-t és gátolhatja a glutationhoz kapcsolódó antioxidáns rendszereket [236].

Összehasonlítva a 9.B és 10. ábrákon látható eredményeket, megállapítható, hogy az Amplex plus HRP mentes, TEGDMA-val történő előinkubálás után a TEGDMA-val előinkubált mitokondriumokban fokozott  $H_2O_2$  termelést mértünk ADP jelenlétében és hiányában is. Ezeket az eredményeket azzal magyarázzuk, hogy Amplex + HRP-rel a mitokondriális  $H_2O_2$  termelés folyamatos nyomon követése nemcsak detektálja, hanem semlegesíti is a keletkező  $H_2O_2$ -t [176], ami enyhíti az oxidatív károsodást. Tekintettel arra, hogy a mitokondriumok fontos szerepet játszanak mind a ROS-képződésben, mind a ROS-eliminációjában, ezért megvizsgáltuk a TEGDMA hatását az exogén  $H_2O_2$  eliminációjára is.

A GM-tal energetizált mitokondriumokban a külsőleg adott  $H_2O_2$  eltávolítását vizsgálva az eredményeink azt mutatják (11. ábra), hogy a TEGDMA jelenlétében az elimináció valóban lassabb, ezért ezek az eredmények tovább erősítik az előinkubációs kísérletből levont hipotézist, hogy a TEGDMA károsíthatja az antioxidáns rendszert. Ez a jelenség a CI gátlásának is tulajdonítható, ami a mitokondriális  $\Delta\psi_m$  csökkenését eredményezi. A CI gátlás miatt a NADH felhalmozódik, növekszik a NADH/NAD<sup>+</sup> arány, ami a citrátkör NADH-függő dehidrogenázait gátolja, így maga után vonva a citrátkör lassulását. A membránpotenciál az energiafüggő transzhydrogenáz enzimek hajtóereje, amelyek elektronokat képes transzportálni az NADH-tól NADP<sup>+</sup> -re [237], így fenntartva a GSH regenerációjához szükséges NADPH szintet. Ha a  $\Delta\psi_m$  csökken, akkor a GSH regenerációhoz nem lesz elegendő NADPH.

Az még mindig nem világos, hogy a TEGDMA közvetlenül vagy közvetetten befolyásolja-e az antioxidáns rendszert. Lefeuvre és munkatársai közleményükben a TEGDMA GSH-ra gyakorolt közvetlen hatását vizsgálták [127], és azt találták, hogy a TEGDMA (3 mM) GSH-val történő inkubálása csökkentette a GSH koncentrációját a sejtek hiányában. Az inkubálás után egy és három óra elteltével szignifikáns GSH koncentráció csökkenést detektáltak.

Vizsgálatainkban újra értékeltük ezt a kérdést, ahol 2 mM GSH-t 5 mM TEGDMA-val inkubáltuk 15 percig a mérőoldatban. Szignifikáns, ám kismértékű változást találtunk 15 perccel az inkubáció után; a GSH koncentráció 3.7%-al csökkent (12. ábra).

A TEGDMA glutation szintre való hatásának kétféle potenciális módja képzelhető el:

- a). a GSH direkt oxidációja TEGDMA által,
- b). a TEGDMA és a GSH direkt kémiai koordinációja.

A TEGDMA kémiai szerkezete nem indokolja a fokozott GSH oxidációt. Ezzel ellentétben a TEGDMA és a GSH kémiai koordinációja a TEGDMA és a GSH kémiai szerkezetei alapján nem zárható ki. Ez a koordináció potenciálisan csökkentheti az elérhető GSH koncentrációt. Ehhez a csökkenéshez nem szükségszerű, hogy a GSH-ban levő SH-csoport feltétlenül direkt kapcsolatban legyen a TEGDMA bármelyik atomjával, mert akkor az adduktban nem lesz elérhető a tiol csoport. Ez hozzájárulhat véleményünk szerint kis mértékben a mitokondriumtól függetlenül az oxidatív stresszhez.

Lefeuvre és munkatársainak eredményei alapján a gingivális fibroblasztok alacsony koncentrációjú TEGDMA-val (0,3 mM) való inkubációja jelentős mennyiségű GSH fogyást eredményezett, ami a 30. percig több mint 50% -kal csökkent. Az *in vitro* és a sejtes kísérletek összehasonlítása azt mutatja, hogy a GSH szint csökkenése nem a TEGDMA-val való közvetlen kölcsönhatás (kötődés) következménye. Vizsgálataink eredményei mitokondriális célpontot feltételeznek a TEGDMA hatásmechanizmusában. A fent említett [127] TEGDMA okozta citotoxicitás háttérében álló mechanizmus és a saját eredményeink nem zárják ki egymást.

### **5.3.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés FADH<sub>2</sub>-termelő (CII-függő) légzési szubsztrátok esetén (Succ és $\alpha$ -GP) és a reverz elektron transzport (RET) gátlásának következményei**

A légzési lánc FADH<sub>2</sub>-hoz kötött bemenetét használó szubsztrátokról is a legtöbb elektron a végső elektron akceptorra, az O<sub>2</sub>-re kerül a Komplex III- és IV-en keresztül. Ilyenkor az elektronok nagy része a szukcinát-dehidrogenáztól (SDH) előre (forward

irányba; forward electron transport – FET) megy az O<sub>2</sub> felé és a *pmf* képzéséhez járul hozzá.

Kísérletesen bizonyított, hogy ADP hiányában, Succ oxidációjakor magas membránpotenciál keletkezik, amely lehetővé teszi az elektronok egy részének áramlását a koenzim Q-ról a CI-re, a normál iránytól eltérően. Ezt a jelenséget reverz elektrontranszportnak (reverse electron transport - RET) [161, 238] nevezzük, amely a  $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$ -vá történő redukcióját eredményezi a CI-en. A folyamat során ADP hiányában jelentős mennyiségű ROS termelődik, miközben a mitokondrium Succ-ot, vagy  $\alpha$ -GP-ot oxidál [140, 218].

A RET jelentősége fiziológias körülmények között nem egyértelmű, mert úgy vélik, hogy a sejtekben mindig van elég ADP ahhoz, hogy a RET feltételei ne valósuljanak meg megfelelően. A patológias körülmények során pl. iszkémia reperfúzióban ismert olyan mechanizmus, amely esetén iszkémia során megfordul a SDH, aminek köszönhetően felhalmozódik a Succ. Reperfúzió alatt azonban visszafordul a SDH, ami oxidálja a felhalmozódott Succ-tot, így fokozza a RET-en keresztül a ROS termelést [239].

A mi kísérleteinkben a RET-et eszköznek használtuk fel azon bizonyítékok sorában, amelyekkel a TEGDMA CI-re való hatását kívántuk igazolni.

Ilyen körülmények között a mitokondriális membránpotencial elég magas ahhoz, hogy az elektronok a CII-ről a CI felé áramoljanak, ami a ROS termelés nagymertekű fokozódásban nyilvánul meg. A CI-függő légzési szubsztrátok esetén nincs RET, ezért ott nagyságrendekkel alacsonyabb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést tapasztaltunk, mint Succ és  $\alpha$ -GP légzési szubsztrátok jelenlétében.

Vizsgálatainkban a TEGDMA 42% -kal csökkentette a mitokondriális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés mennyiségét a Succ-tal való légzés során, illetve 47% -kal  $\alpha$ -GP esetén (13.A,B ábra). Rotenonnal (CI gátlószer) történő gátlás során a RET megszűnik és az ekkor detektálható ROS termelés a FET-nek köszönhető [240]. Fontos megjegyezni, hogy CI gátlásakor (pl. rotenon) a magas NADH/NAD<sup>+</sup> arány esetén a citrátköri dehidrogenázok is részt vehetnek a ROS termelésben [139]. TEGDMA adása esetén kísérleteinkben a rotenonhoz hasonló hatást feltételeztünk és tapasztaltunk.

Az  $\alpha$ -GPDH, amint azt munkacsoportunk korábban bizonyította, jelentős mértékű független ROS képző aktivitással bír. Bár az  $\alpha$ -GP oxidációja sokkal lassabb, mint a Succ-é, mégis képes arra, hogy RET-et alakítson ki. Így az  $\alpha$ -GP oxidációja során keletkező  $H_2O_2$  intenzitása CI gátlók jelenlétében (pl. rotenon) csökkenthető [139]. Jelen munkában a TEGDMA pontosan ezt a rotenon-szerű hatást mutatta, további bizonyítékot szolgáltatva a CI gátlásra.

Az ADP stimuláció a RET feltételeit megszüntenti kontroll körülmények között. Kísérleteinkben ADP hozzáadására jelentősen csökkent a  $H_2O_2$  termelés. Az ANT gátlása CAT-tal hiperpolarizálta (repolarizálta) a mitokondriális  $\Delta\psi_m$ -et, és ezért visszaállította a RET-t a DMSO-val kezelt kontrollcsoportban. Az ANT gátlás ROS képzést fokozó hatása TEGDMA jelenlétében jóval kevésbé volt hatékony a kontroll csoporthoz képest. Ez a jelenség is a CI gátlásával magyarázható (13.A,B ábra).

#### 5.4 A Komplex I (CI) gátlása és a NAD(P)H szint kapcsolata TEGDMA-val kezelt mitokondriumokban

Az  $\alpha$ -KG és GM citrátköri oxidálódása során keletkező NADH-t a CI oxidálja. ADP hiányában a NADH/NAD<sup>+</sup> arány magas, ADP jelenlétében azonban a NADH nagy része oxidálódik (*14.A,B ábra, a) és b) görbe*). A TEGDMA hozzáadása növelte a NADH-szintet mind  $\alpha$ -KG, mind GM légzési szubsztrátok esetén (*14.A,B ábra, b) görbe*). Ez a megfigyelés döntő fontosságú a hatásmechanizmus szempontjából, mivel ez azt jelenti, hogy a TEGDMA gátolja a CI-t, de nem befolyásolja a reakcióhoz kapcsolódó dehidrogenázok működését, mert ha ezt befolyásolná, akkor a NADH-szint TEGDMA hatására nem emelkedne.

CII szubsztrátokkal, magas mitokondriális membránpotenciál esetén a RET biztosított, ami a CI-en keresztül fokozott NADH képződéshez vezet. Az energetizált mitokondriumokhoz adott ADP csökkentette a NADH autofluoreszcenciát az összes vizsgált légzési szubsztrát esetén (*14.A,B és 15.A,B ábra*), mivel (i.) az ADP serkenti a légzést, (ii) a gyorsabb elektron áramlás fokozza a NADH oxidációját, és (iii) az ADP hatására kialakuló membránpotenciál-csökkenés gátolja a RET-et [173].

A TEGDMA eltérő válaszreakciókat eredményezett a mitokondriumokban az energetizáláshoz használt légzési szubsztrátoktól függően. CI-függő szubsztrátok jelenlétében a TEGDMA által gátolt CI-en keresztül az elektronok továbbáramlása csökken a légzési láncban; ennek következtében a NADH nem tud oxidálódni, így mennyisége megnövekszik (*14.A,B ábra*). Succ illetve  $\alpha$ -GP jelenlétében a TEGDMA hozzáadása megelőzte az ADP hozzáadását a mitokondriumokhoz (*15.A,B ábra*), ugyanis arra voltunk kíváncsiak, hogy a TEGDMA hogyan befolyásolja a RET-t. Ha a TEGDMA-t ADP után adtuk volna, akkor nem tudtuk volna megfigyelni a TEGDMA RET-re kifejtett hatását, az ADP okozta depolarizáció miatt. Succ jelenlétében az ADP hozzáadása nem tudta csökkenteni a NADH autofluoreszcenciát a kontroll szintre a CI gátlása miatt felhalmozódott NADH következtében (*15.A ábra*), amely összhangban van Tretter és munkatársainak korábbi eredményeivel [176].



## 5.5 ATP termelés a TEGDMA-val kezelt mitokondriumokban

Annak érdekében, hogy az adenilát-kinázok (AK) mitokondriális ATP-termeléshez való hozzájárulását minimalizáljuk, AK gátlószert, AP5-t alkalmaztunk az ATP termelést vizsgáló kísérleteinkben [241]. Az ADP jelenlétében és a légzési szubsztrátok hiányában az AK-hoz kapcsolt ATP-szintézist tudtuk mérni; tehát az AK aktivitás csak részben gátlódott. Magasabb gátlószerkoncentrációk a mitokondriális funkciókat károsították.

A légzési szubsztrátok (GM vagy Succ) hozzáadása a rendszerhez az oxidatív foszforiláció (oxidative phosphorylation - OXPHOS) megindulásához vezetett. A GM – tal légző mitokondriumokban a TEGDMA 86%-kal csökkentette az ATP szintézist (16. ábra). Ebből az eredményből arra lehet következtetni, hogy a CI gátlást okozó TEGDMA depolarizálta a mitokondriális membránt, és a kisebb proton gradiens következtében csökkent az OXPHOS. Ez a mechanizmus sejtes rendszerekben is csökkent ATP termeléshez, a sejtek bioenergetikai paramétereinek romlásához és végül nekrotikus sejthalálhoz vezethet.

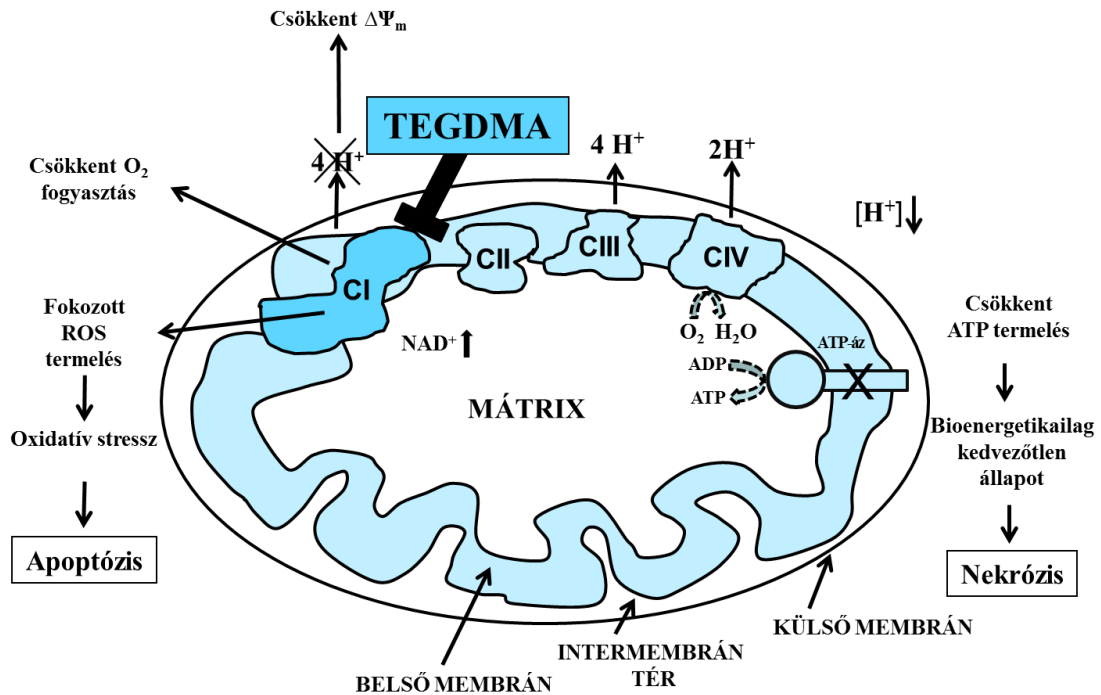
A Succ-tal lélegeztetett mitokondriumok esetén nem csökkent szignifikánsan az ATP termelés, ami összhangban van az eddigi eredményeinkkel; mivel a TEGDMA a CI-t gátolja, az SDH-ről a CII-re kerülő elektronok szabadon áramolhatnak a CIV felé és az elektrokémiai potenciál az ATP termelésre fordítható.

## **5.6 Komplex I aktivitás a mitokondriumokban TEGDMA jelenlétében**

A CI aktivitás közvetlen mérése azt mutatta, hogy a TEGDMA valóban gátolhatja a CI-t. A TEGDMA azonnali hatása arra utal, hogy a CI valóban a rezin monomer elsődleges célpontja lehet. Sherer TB rotenonnal (CI gátló) kezelt sejtekben oxidatív stresszt, glutation csökkenést és DNS-károsodást írt le, ahol az apoptózis előfordulási gyakorisága fokozódott az előbb említett folyamatok következtében [236]. Ye J és mtsai nemrég leírták, hogy a CI különböző gátlószerei képesek fokozni a mitokondriális ROS termelést és MAPK/ NF- $\kappa$ B aktivációt okozhatnak [242]. Ezen túlmenően a CI gátlás mértéke meghatározhatja az indukált sejthalál típusát is. A CI gátlószerei alacsony koncentrációban általában apoptózist indukálnak, míg ugyanazon vegyület nagyobb koncentrációban nekrotikus sejthalált idézhet elő [137].

Kutatásunk a TEGDMA akut hatásaira fókuszált, ugyanakkor az eredmények nem állnak ellentétben Yeh és munkatársainak megállapításaival [132]. A NOX 4 aktivációnak tulajdonítható, TEGDMA által elindított változások kialakulása órákba telhet. Ilyen körülmények között figyelték meg kísérleteikben Yeh és mtsai a NOX4 génexpressziójának változásait [132]. Nemrégiben arról számoltak be, hogy a CI rotenonnal való gátlása serkentheti az NOX2 expressziót [243]. Megállapításunk szerint a TEGDMA azonnali célpontja a CI, és valószínűleg különböző jelátviteli mechanizmusok aktiválása szükséges a NOX izoenzimek aktiválásához.

A légzési láncban a CI-t gátló TEGDMA hatásait és annak következményeit a 17. ábrán foglaltuk össze.



**17. ábra:** A TEGDMA okozta mitokondriális károsodás sematikus ábrája. A TEGDMA elsődleges célpontjának a komplex I-t (CI) azonosítottuk. A CI gátlásának következményei az  $O_2$  fogyasztás csökkenése, a  $H_2O_2$  termelés fokozása, a mitokondriális  $H_2O_2$  elimináció károsodása, aminek oxidatív stressz és apoptózis a következménye. Az ATP termelés csökkenése magas TEGDMA koncentráció mellett nekrotikus sejthalált okozhat. Az egyszerűsítés kedvéért az ábrán nem jelöltük a reverz elektron transzportot (RET). Rövidítések: CI, II, III, IV: légzési komplexek;  $\Delta\Psi_m$  : mitokondriális membránpotenciál.

## 6. Következtetések

Kísérleteink és eredményeink során a TEGDMA rezin monomer célpontjának a CI-t azonosítottuk a mitokondriális elektrontranszportláncban. A mitokondriumok TEGDMA-val történt kezelése a CI-függő oxigénfogyasztás gátlásához, a mitokondriális membrán depolarizációjához és ennek következtében az oxidatív foszforiláció során termelt ATP mennyiségének csökkenéséhez vezet; tehát a TEGDMA bioenergetikai szempontból kedvezőtlen állapotot idéz elő. A TEGDMA CI gátlása fokozza a mitokondriális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ROS) képződést, és korlátozza a ROS eliminációt. További eredményeink szerint a TEGDMA közvetlen reakciója a glutationnal valószínűleg nem a toxicitás fő célpontja.

Tanulmányunk során kimutattuk, hogy a TEGDMA rezin monomer -egy nagyon aktív metakrilát molekula - citotoxikus hatásait a CI gátlása nagymértékben magyarázza. Az irodalomban számos közlemény tárgyalja az antioxidánsok pozitív hatását, amely eliminálhatja a TEGDMA okozta káros hatásokat, és a TEGDMA monomert kiváltó új monomerek fejlesztéséről szóló kutatási eredmények is biztatóak. Véleményünk szerint a TEGDMA rezin monomer valószínű molekuláris célpontjának megtalálása további sikeres anyagfejlesztéshez járulhat hozzá a fogászatban.

## 7. Összefoglalás

Az amalgám kivezetése a környezetvédelem szempontjából kiemelten fontos, megvalósulását a 2017/852-es EU-direktíva szabályozza. Az ötvözet teljes kivezetése mellett további anyagtechnológiai fejlesztések szükségesek az amalgám alternatívák (üvegeionomer cementek és a rezin bázisú kompozitok) kapcsán az ideális tömőanyag kifejlesztésére. A kompozitok elégtelen polimerizációja és biodegradációja következtében legnagyobb arányban kioldódó rezin monomer, a TEGDMA citotoxikus, genotoxikus és oxidatív stressz okozta hatásainak háttérében álló molekuláris célpont megkeresése volt munkánk célkitűzése.

Jelen disszertációban a TEGDMA hatásait vizsgáltuk agyból izolált mitokondriumok alapvető bioenergetikai funkcióira és a ROS homeosztázisra, mivel a ROS képzésben és eliminálásban, az apoptózisban és a sejtek életképességének meghatározásában a mitokondriumok fontos szerepet játszanak.

Új eredményeink a következők:

- A TEGDMA rezin monomer CI-függő légzési szubsztrátok esetén gátolta az  $O_2$  fogyasztást az izolált agyi mitokondriumokban, míg CII-függő szubsztrátok esetén ez nem volt megfigyelhető.
- A TEGDMA adása CI-függő szubsztrátok esetén a mitokondriális membrán depolarizációjához vezetett, aminek következtében az oxidatív foszforiláció során csökkent az ATP termelés.
- A CI-függő légzési szubsztrátokkal energetizált mitokondriumokban fokozódott a ROS termelés és korlátozódott a ROS elimináció TEGDMA kezelés hatására. A TEGDMA a mitokondriális bioenergetika befolyásolásán keresztül és nem közvetlen kémiai reakcióval csökkentette a glutation szintet.
- Vizsgálataink alátámasztották, hogy a TEGDMA molekuláris célpontja a CI a mitokondriális légzési láncban. A CI gátlása megmagyarázza a TEGDMA irodalomban leírt toxikus hatásait.

## 8. Summary

The phase-down of amalgam is an essential factor for reduce environmental mercury pollution, regulated by the EU Directive 2017/852. Along with the complete phase out, the additional amalgam alternatives (glass ionomer cements and resin-based composites) require further material development to develop ideal restorative materials. The aim of the dissertation was to identify a direct molecular target in cytotoxic, genotoxic effects and oxidative stress induced by TEGDMA, which is the most common co-monomer released from resin based composites due to their inadequate polymerization and biodegradation.

In the present thesis, the effects of TEGDMA have been studied on the bioenergetic functions and ROS homeostasis of mitochondria isolated from brain, because mitochondria play an important role in ROS generation and elimination, apoptosis and cell viability. Our new results are as follows:

- In CI-dependent respiratory substrates supported isolated brain mitochondria the O<sub>2</sub> consumption was inhibited by TEGDMA resin monomer. Contrary to that respiration was not influenced by CII substrates.
- The administration of TEGDMA induced the depolarization of the mitochondrial membrane *via* CI substrates, resulting in decreased ATP production during oxidative phosphorylation.
- TEGDMA significantly stimulated the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ROS) generation in CI-dependent respiratory substrates supported mitochondria and also limited the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elimination. However, direct interaction between TEGDMA and reduced glutathione has not been verified in our studies, therefore the decreased GSH level is attributed to the mitochondrial effects of TEGDMA.
- Our study investigated on isolated mitochondria has shown that TEGDMA impairs mitochondrial functions and inhibits CI in the mitochondrial respiration chain. Inhibition of CI explains the cellular toxic effects of TEGDMA described in the literature.

## 9. Irodalomjegyzék

1. United Nations Environment Programme (UNEP). (2013) The Global Mercury Assessment. Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland. Available from: <https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/7984/-Global%20Mercury%20Assessment-201367.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. [A letöltés dátuma: 2018.03.02.]
2. 2017/852/EU: Az Európai Parlament és a Tanács (EU) 2017/852 rendelete - 2017. május 17. (2017) Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0852&from=HU>. [A letöltés dátuma: 2018.03.02.]
3. BIO Intelligence Service. (2012) Study on the potential for reducing mercury pollution from dental amalgam and batteries. Final report prepared for the European Commission - DG ENV. Contract Number 07.0307/2011/59114/SER/C3, 2012.[A letöltés dátuma: 2018.03.02.]
4. Turkun LS, Kanik O. (2016) A Prospective Six-Year Clinical Study Evaluating Reinforced Glass Ionomer Cements with Resin Coating on Posterior Teeth: Quo Vadis? *Oper Dent*, 41: 587-598.
5. Kielbassa AM, Glockner G, Wolgin M, Glockner K. (2017) Systematic review on highly viscous glass-ionomer cement/resin coating restorations (Part II): Do they merge Minamata Convention and minimum intervention dentistry? *Quintessence Int*, 48: 9-18.
6. Opdam NJ, Bronkhorst EM, Loomans BA, Huysmans MC. (2010) 12-year survival of composite vs. amalgam restorations. *J Dent Res*, 89: 1063-1067.
7. Hume WR, Gerzina TM. (1996) Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Crit Rev Oral Biol Med*, 7: 172-179.
8. Ferracane JL. (2011) Resin composite--state of the art. *Dent Mater*, 27: 29-38.
9. Krifka S, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H. (2013) A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials*, 34: 4555-4563.

10. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. (2007) Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*, 28: 3757-3785.
11. Geurtsen W, Leyhausen G. (2001) Chemical-Biological Interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). *J Dent Res*, 80: 2046-2050.
12. Seiss M, Langer C, Hickel R, Reichl FX. (2009) Quantitative determination of TEGDMA, BHT, and DMABEE in eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS. *Arch Toxicol*, 83: 1109-1115.
13. Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, Scheers H, Godderis L, Hoet P, Van Meerbeek B. (2011) How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dent Mater*, 27: 723-747.
14. Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. (2001) Metabolic effects of dental resin components in vitro detected by NMR spectroscopy. *J Dent Res*, 80: 869-875.
15. Eckhardt A, Gerstmayr N, Hiller KA, Bolay C, Waha C, Spagnuolo G, Camargo C, Schmalz G, Schweikl H. (2009) TEGDMA-induced oxidative DNA damage and activation of ATM and MAP kinases. *Biomaterials*, 30: 2006-2014.
16. Krifka S, Hiller KA, Bolay C, Petzel C, Spagnuolo G, Reichl FX, Schmalz G, Schweikl H. (2012) Function of MAPK and downstream transcription factors in monomer-induced apoptosis. *Biomaterials*, 33: 740-750.
17. Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. (2002) Effect of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res*, 63: 746-751.
18. Petersen PE, Lennon MA. (2004) Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dent Oral Epidemiol*, 32: 319-321.
19. Mitchell RJ, Koike M, Okabe T. (2007) Posterior amalgam restorations--usage, regulation, and longevity. *Dent Clin North Am*, 51: 573-589.



20. Bengtsson UG, Hylander LD.(2017) Increased mercury emissions from modern dental amalgams. *Biometals*, 30: 277-283.
21. Bates MN. (2006) Mercury amalgam dental fillings: an epidemiologic assessment. *Int J Hyg Environ Health*, 209: 309-316.
22. Fazekas Árpád. *Megtartó fogászat és endodoncia*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2006: 50-52.
23. Bjorklund G, Dadar M, Mutter J, Aaseth J. (2017) The toxicology of mercury: Current research and emerging trends. *Environ Res*, 159: 545-554.
24. Berglund A. (1990) Estimation by a 24-hour study of the daily dose of intra-oral mercury vapor inhaled after release from dental amalgam. *J Dent Res*, 69: 1646-1651.
25. Goldman A, Frencken JE, De Amorim RG, Leal SC. (2018) Replacing amalgam with a high-viscosity glass-ionomer in restoring primary teeth: A cost-effectiveness study in Brasilia, Brazil. *J Dent*, 70: 80-86.
26. Sherman LS, Blum JD, Franzblau A, Basu N. (2013) New insight into biomarkers of human mercury exposure using naturally occurring mercury stable isotopes. *Environ Sci Technol*, 47: 3403-3409.
27. Nicolae A, Ames H, Quinonez C. (2013) Dental amalgam and urinary mercury concentrations: a descriptive study. *BMC Oral Health*, 13:44.
28. Batchu H, Rakowski D, Fan PL, Meyer DM. (2006) Evaluating amalgam separators using an international standard. *J Am Dent Assoc*, 137: 999-1005.
29. Nagpal N, Bettiol SS, Isham A, Hoang H, Crocombe LA. (2017) A Review of Mercury Exposure and Health of Dental Personnel. *Saf Health Work*, 8: 1-10.
30. Wijesekara LA, Usoof R, Gamage SST, Jayasinghe R, Gamage N, De Silva D, Ekanayake S. (2018) Mercury levels in hair samples of dentists: A comparative study in Sri Lanka. *J Investig Clin Dent*, 9:e12302.
31. Bates MN, Fawcett J, Garrett N, Cutress T, Kjellstrom T. (2004) Health effects of dental amalgam exposure: a retrospective cohort study. *Int J Epidemiol*, 33: 894-902.

32. Eyeson J, House I, Yang YH, Warnakulasuriya KA. (2010) Relationship between mercury levels in blood and urine and complaints of chronic mercury toxicity from amalgam restorations. *Br Dent J*, 208: E7; discussion 162-163.
33. Ahlqwist M, Bengtsson C, Lapidus L. (1993) Number of amalgam fillings in relation to cardiovascular disease, diabetes, cancer and early death in Swedish women. *Community Dent Oral Epidemiol*, 21: 40-44.
34. McGivern B, Pemberton M, Theaker ED, Buchanan JA, Thornhill MH. (2000) Delayed and immediate hypersensitivity reactions associated with the use of amalgam. *Br Dent J*, 188: 73-76.
35. Melchart D, Wuhr E, Weidenhammer W, Kremers L. (1998) A multicenter survey of amalgam fillings and subjective complaints in non-selected patients in the dental practice. *Eur J Oral Sci*, 106: 770-777.
36. Laine J, Kalimo K, Happonen RP. (1997) Contact allergy to dental restorative materials in patients with oral lichenoid lesions. *Contact Dermatitis*, 36: 141-146.
37. SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) (2015) Opinion on the safety of dental amalgam and alternative dental restoration materials for patients and users, 2015. The SCENIHR adopted this opinion at the 10th plenary meeting on 29 April 2015. Available from: [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific\\_committees/emerging/docs/scenih\\_r\\_o\\_046.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_046.pdf). [A letöltés dátuma: 2018.03.02.]
38. McDonald A. (2001) Advances in operative dentistry and fixed prosthodontics. *Prim Dent Care*, 8: 13-16.
39. Khoroushi M, Keshani F. (2013) A review of glass-ionomers: From conventional glass-ionomer to bioactive glass-ionomer. *Dent Res J (Isfahan)*, 10: 411-420.
40. Mickenautsch S, Mount G, Yengopal V. (2011) Therapeutic effect of glass-ionomers: an overview of evidence. *Aust Dent J*, 56: 10-15; quiz 103.
41. Klinke T, Daboul A, Turek A, Frankenberger R, Hickel R, Biffar R. (2016) Clinical performance during 48 months of two current glass ionomer restorative systems with coatings: a randomized clinical trial in the field. *Trials*, 17:239.

42. Kielbassa AM, Glockner G, Wolgin M, Glockner K. (2016) Systematic review on highly viscous glass-ionomer cement/resin coating restorations (Part I): Do they merge Minamata Convention and minimum intervention dentistry? *Quintessence Int*, 47: 813-823.
43. Nedeljkovic I, Teughels W, De Munck J, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL. (2015) Is secondary caries with composites a material-based problem? *Dent Mater*, 31:e247-77.
44. Kovarik RE. (2009) Restoration of posterior teeth in clinical practice: evidence base for choosing amalgam versus composite. *Dent Clin North Am*, 53: 71-76.
45. Mjor IA. (1997) The reasons for replacement and the age of failed restorations in general dental practice. *Acta Odontol Scand*, 55: 58-63.
46. Sunnegardh-Gronberg K, van Dijken JW, Funegard U, Lindberg A, Nilsson M. (2009) Selection of dental materials and longevity of replaced restorations in Public Dental Health clinics in northern Sweden. *J Dent*, 37: 673-678.
47. Palotie U, Eronen AK, Vehkalahti K, Vehkalahti MM. (2017) Longevity of 2- and 3-surface restorations in posterior teeth of 25- to 30-year-olds attending Public Dental Service-A 13-year observation. *J Dent*, 62: 13-17.
48. Opdam NJ, Bronkhorst EM, Roeters JM, Loomans BA. (2007) A retrospective clinical study on longevity of posterior composite and amalgam restorations. *Dent Mater*, 23: 2-8.
49. Rasines Alcaraz MG, Veitz-Keenan A, Sahrman P, Schmidlin PR, Davis D, Ihezor-Ejiofor Z. (2014) Direct composite resin fillings versus amalgam fillings for permanent or adult posterior teeth. *Cochrane Database Syst Rev*, 3: CD005620.
50. Lempel E, Toth A, Fabian T, Krajczar K, Szalma J. (2015) Retrospective evaluation of posterior direct composite restorations: 10-year findings. *Dent Mater*, 31: 115-122.
51. Van Ende A, Lise DP, De Munck J, Vanhulst J, Wevers M, Van Meerbeek B. (2017) Strain development in bulk-filled cavities of different depths characterized using a non-destructive acoustic emission approach. *Dent Mater* 2017, 33: e165-e177.

52. Fugolin APP, Pfeifer CS. (2017) New Resins for Dental Composites. *J Dent Res*, 96: 1085-1091.
53. Geurtsen W. (1998) Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *Eur J Oral Sci*, 106: 687-695.
54. Cramer NB, Stansbury JW, Bowman CN. (2011) Recent advances and developments in composite dental restorative materials. *J Dent Res*, 90: 402-416.
55. Puckett AD, Fitchie JG, Kirk PC, Gamblin J. (2007) Direct composite restorative materials. *Dent Clin North Am*, 51: 659-675.
56. Guimaraes GF, Marcelino E, Cesarino I, Vicente FB, Grandini CR, Simoes RP. (2018) Minimization of polymerization shrinkage effects on composite resins by the control of irradiance during the photoactivation process. *J Appl Oral Sci*, 26: e20170528.
57. Ferracane JL, Hilton TJ. (2016) Polymerization stress--is it clinically meaningful? *Dent Mater*, 32: 1-10.
58. Tanaka K, Taira M, Shintani H, Wakasa K, Yamaki M. (1991) Residual monomers (TEGDMA and Bis-GMA) of a set visible-light-cured dental composite resin when immersed in water. *J Oral Rehabil*, 18: 353-362.
59. Asmussen E. (1983) Factors affecting the color stability of restorative resins. *Acta Odontol Scand*, 41: 11-18.
60. Kopperud HM, Johnsen GF, Lamolle S, Kleven IS, Wellendorf H, Haugen HJ. (2013) Effect of short LED lamp exposure on wear resistance, residual monomer and degree of conversion for Filtek Z250 and Tetric EvoCeram composites. *Dent Mater*, 29:824-34.
61. Ahsan A, Ashley M. (2016) Hypersensitivity to Dental Composites and Resin-Bonding Agents. *Dent Update*, 43: 836-838, 841-842.
62. Peutzfeldt A. (1997) Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci*, 105: 97-116.
63. Khalid H, Syed MR, Rahbar MI, Iqbal H, Ahmad S, Kaleem M, Matinlinna JP, Khan AS. (2018) Effect of nano-bioceramics on monomer leaching and degree of conversion of resin-based composites. *Dent Mater*, 37: 940-949.

64. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. (2011) Effects of HEMA and TEDGMA on the in vitro odontogenic differentiation potential of human pulp stem/progenitor cells derived from deciduous teeth. *Dent Mater*, 27: 608-617.
65. Atai M, Watts DC. (2006) A new kinetic model for the photopolymerization shrinkage-strain of dental composites and resin-monomers. *Dent Mater*, 22: 785-791.
66. Braga RR, Ballester RY, Ferracane JL. (2005) Factors involved in the development of polymerization shrinkage stress in resin-composites: a systematic review. *Dent Mater*, 21: 962-970.
67. Randolph LD, Palin WM, Leloup G, Leprince JG. (2016) Filler characteristics of modern dental resin composites and their influence on physico-mechanical properties. *Dent Mater*, 32:1586-1599.
68. Fazekas Árpád. *Megtartó fogászat és endodoncia*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2006: pp. 58-62.
69. Arikawa H, Takahashi H, Kanie T, Ban S. (2009) Effect of various visible light photoinitiators on the polymerization and color of light-activated resins. *Dent Mater J*, 28: 454-460.
70. Schneider LF, Pfeifer CS, Consani S, Pahl SA, Ferracane JL. (2008) Influence of photoinitiator type on the rate of polymerization, degree of conversion, hardness and yellowing of dental resin composites. *Dent Mater*, 24: 1169-1177.
71. Yamasaki LC, De Vito Moraes AG, Barros M, Lewis S, Francci C, Stansbury JW, Pfeifer CS. (2013) Polymerization development of "low-shrink" resin composites: Reaction kinetics, polymerization stress and quality of network. *Dent Mater*, 29: e169-179.
72. Randolph LD, Steinhaus J, Moginger B, Gallez B, Stansbury J, Palin WM, Leloup G, Leprince JG. (2016) Photopolymerization of highly filled dimethacrylate-based composites using Type I or Type II photoinitiators and varying co-monomer ratios. *Dent Mater*, 32: 136-148.
73. Lang BR, Bloem TJ, Powers JM, Wang RF. (1992) The in vivo wear resistance of 12 composite resins. *J Prosthodont*, 1: 2-10.

74. Watts DC, Cash AJ. (1994) Analysis of optical transmission by 400-500 nm visible light into aesthetic dental biomaterials. *J Dent*, 22: 112-117.
75. Munksgaard EC, Hansen EK, Kato H. (1987) Wall-to-wall polymerization contraction of composite resins versus filler content. *Scand J Dent Res*, 95: 526-531.
76. Davidson CL, de Gee AJ. (1984) Relaxation of polymerization contraction stresses by flow in dental composites. *J Dent Res*, 63: 146-148.
77. Schmalz G, Galler KM. (2017) Biocompatibility of biomaterials - Lessons learned and considerations for the design of novel materials. *Dent Mater*, 33: 382-393.
78. Schmalz G, Garhammer P. (2002) Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues. *Dent Mater*, 18: 396-406.
79. Ferracane JL. (1994) Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil*, 21: 441-452.
80. Santerre JP, Shajii L, Leung BW. (2001) Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med*, 12: 136-151.
81. Geurtsen W. (2000) Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11: 333-355.
82. Gopferich A. (1996) Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, 17: 103-114.
83. Alvarez-Gayosso C, Barcelo-Santana F, Guerrero-Ibarra J, Saez-Espinola G, Canseco-Martinez MA. (2004) Calculation of contraction rates due to shrinkage in light-cured composites. *Dent Mater*, 20: 228-235.
84. Tseng WY, Huang CH, Chen RS, Lee MS, Chen YJ, Rueggeberg FA, Chen MH. (2007) Monomer conversion and cytotoxicity of dental composites irradiated with different modes of photoactivated curing. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 83: 85-90.
85. Davidson CL, de Gee AJ, Feilzer A. (1984) The competition between the composite-dentin bond strength and the polymerization contraction stress. *J Dent Res*, 63: 1396-1399.

86. Jaffer F, Finer Y, Santerre JP. (2002) Interactions between resin monomers and commercial composite resins with human saliva derived esterases. *Biomaterials*, 23: 1707-1719.
87. Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. (2009) Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *Int J Mol Sci*, 10: 3861-3899.
88. Michalowicz J. (2014) Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol*, 37: 738-758.
89. Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. (1996) Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect*, 104: 298-305.
90. Arenholt-Bindslev D, Breinholt V, Preiss A, Schmalz G. (1999) Time-related bisphenol-A content and estrogenic activity in saliva samples collected in relation to placement of fissure sealants. *Clin Oral Investig*, 3: 120-125.
91. Tarumi H, Imazato S, Narimatsu M, Matsuo M, Ebisu S. (2000) Estrogenicity of fissure sealants and adhesive resins determined by reporter gene assay. *J Dent Res*, 79: 1838-1843.
92. Atkinson JC, Diamond F, Eichmiller F, Selwitz R, Jones G. (2002) Stability of bisphenol A, triethylene-glycol dimethacrylate, and bisphenol A dimethacrylate in whole saliva. *Dent Mater*, 18: 128-135.
93. SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) (2015) The safety of the use of bisphenol A in medical devices, 2015. from:[https://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/emerging/docs/scenih\\_r\\_040.pdf](https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_040.pdf) [A letöltés dátuma: 2018.05.05.]
94. Delaviz Y, Finer Y, Santerre JP. (2014) Biodegradation of resin composites and adhesives by oral bacteria and saliva: a rationale for new material designs that consider the clinical environment and treatment challenges. *Dent Mater*, 30: 16-32.
95. de Fucio SB, Puppim-Rontani RM, de Carvalho FG, Mattos-Graner Rde O, Correr-Sobrinho L, Garcia-Godoy F. (2009) Analyses of biofilms accumulated on dental restorative materials. *Am J Dent*, 22: 131-136.

96. Paolantonio M, D'Ercole S, Perinetti G, Tripodi D, Catamo G, Serra E, Brue C, Piccolomini R. (2004) Clinical and microbiological effects of different restorative materials on the periodontal tissues adjacent to subgingival class V restorations. *J Clin Periodontol*, 31: 200-207.
97. Singh J, Khalichi P, Cvitkovitch DG, Santerre JP. (2009) Composite resin degradation products from BisGMA monomer modulate the expression of genes associated with biofilm formation and other virulence factors in *Streptococcus mutans*. *J Biomed Mater Res A*, 88: 551-560.
98. Spencer P, Ye Q, Misra A, Goncalves SE, Laurence JS. (2014) Proteins, pathogens, and failure at the composite-tooth interface. *J Dent Res* 2014, 93: 1243-1249.
99. Ramezani GH, Moghadam MM, Saghiri MA, Garcia-Godoy F, Asatourian A, Aminsobhani M, Scarbecz M, Sheibani N. (2017) Effect of dental restorative materials on total antioxidant capacity and calcium concentration of unstimulated saliva. *J Clin Exp Dent*, 9: e71-e77.
100. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. (2006) Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res*, 85: 870-877.
101. Schmalz G. (1998) The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci*, 106: 696-706.
102. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. (1996) In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod*, 22: 244-248.
103. Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. (1991) Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res*, 70: 1450-1455.
104. Noda M, Wataha JC, Kaga M, Lockwood PE, Volkmann KR, Sano H. (2002) Components of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *J Dent Res*, 81: 265-269.
105. Scott A, Egner W, Gawkrödger DJ, Hatton PV, Sherriff M, van Noort R, Yeoman C, Grummitt J. (2004) The national survey of adverse reactions to dental materials in the UK: a preliminary study by the UK Adverse Reactions Reporting Project. *Br Dent J*, 196: 471-477; discussion 465.



106. Drucker AM, Pratt MD. (2011) Acrylate contact allergy: patient characteristics and evaluation of screening allergens. *Dermatitis*, 22: 98-101.
107. About I, Camps J, Mitsiadis TA, Bottero MJ, Butler W, Franquin JC. (2002) Influence of resinous monomers on the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblasts. *J Biomed Mater Res*, 63: 418-423.
108. Galler KM, Schweikl H, Hiller KA, Cavender AC, Bolay C, D'Souza RN, Schmalz G. (2011) TEGDMA reduces mineralization in dental pulp cells. *J Dent Res*, 90: 257-262.
109. Schweikl H, Schmalz G. (1999) Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. *Mutat Res*, 438: 71-78.
110. Engelmann J, Volk J, Leyhausen G, Geurtsen W. (2005) ROS formation and glutathione levels in human oral fibroblasts exposed to TEGDMA and camphorquinone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 75: 272-276.
111. Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Perianin A. (2003) TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A*, 66: 476-482.
112. Blasiak J, Synowiec E, Tarnawska J, Czarny P, Poplawski T, Reiter RJ. (2012) Dental methacrylates may exert genotoxic effects via the oxidative induction of DNA double strand breaks and the inhibition of their repair. *Mol Biol Rep*, 39: 7487-7496.
113. Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Wang RS, Jeng JH. (2005) Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials* 2005, 26: 745-753.
114. Eckhardt A, Muller P, Hiller KA, Krifka S, Bolay C, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H. (2010) Influence of TEGDMA on the mammalian cell cycle in comparison with chemotherapeutic agents. *Dent Mater*, 26: 232-241.
115. Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G, Schmalz G. (2007) Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater*, 23: 688-695.

116. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. (2001) The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res*, 80: 1615-1620.
117. Reichl FX, Esters M, Simon S, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, Folwaczny M, Glas J, Hickel R. (2006) Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol*, 80: 370-377.
118. Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H. (2004) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA-induced apoptosis in primary human pulp cells. *J Dent Res*, 83: 703-707.
119. Chang HH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Chan CP, Wang TM, Lin PS, Jeng JH. (2012) Effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cytotoxicity, cyclooxygenase-2 expression and prostanoids production in human dental pulp cells. *Int Endod J*, 45: 848-858.
120. Hararli OT, Bayindir YZ, Altunkaynak Z, Tatar A. (2009): Cytotoxic effects of TEGDMA on THP-1 cells in vitro. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 14: e489-493.
121. Huang FM, Kuan YH, Lee SS, Chang YC. (2015) Cytotoxicity and genotoxicity of triethyleneglycol-dimethacrylate in macrophages involved in DNA damage and caspases activation. *Environ Toxicol*, 30: 581-588.
122. Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R. (2007) Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. *Dent Mater*, 23: 34-39.
123. Schweikl H, Hiller KA, Eckhardt A, Bolay C, Spagnuolo G, Stempf T, Schmalz G. (2008) Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials*, 29: 1377-1387.
124. Walther UI, Siagian, II, Walther SC, Reichl FX, Hickel R. (2004) Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines. *Arch Oral Biol*, 49: 125-131.
125. Spagnuolo G, D'Anto V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. (2006) Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials*, 27: 1803-1809.

126. Inamitsu H, Okamoto K, Sakai E, Nishishita K, Murata H, Tsukuba T. (2017) The dental resin monomers HEMA and TEGDMA have inhibitory effects on osteoclast differentiation with low cytotoxicity. *J Appl Toxicol*, 37: 817-824.
127. Lefeuvre M, Bourd K, Lorient MA, Goldberg M, Beaune P, Perianin A, Stanislawski L. (2004) TEGDMA modulates glutathione transferase P1 activity in gingival fibroblasts. *J Dent Res*, 83: 914-919.
128. Lefeuvre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L. (2005) TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials*, 26: 5130-5137.
129. Ginzkey C, Zinnitsch S, Steussloff G, Koehler C, Hackenberg S, Hagen R, Kleinsasser NH, Froelich K. (2015) Assessment of HEMA and TEGDMA induced DNA damage by multiple genotoxicological endpoints in human lymphocytes. *Dent Mater*, 31: 865-876.
130. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC. (2006) Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dent Mater*, 22: 1086-1092.
131. Krifka S, Petzel C, Bolay C, Hiller KA, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H. (2011) Activation of stress-regulated transcription factors by triethylene glycol dimethacrylate monomer. *Biomaterials*, 32:1 787-1795.
132. Yeh CC, Chang JZ, Yang WH, Chang HH, Lai EH, Kuo MY. (2015) NADPH oxidase 4 is involved in the triethylene glycol dimethacrylate-induced reactive oxygen species and apoptosis in human embryonic palatal mesenchymal and dental pulp cells. *Clin Oral Investig*, 19: 1463-1471.
133. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12: 913-922.
134. Kim JS, He L, Lemasters JJ. (2003) Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 304: 463-470.
135. Rasola A, Bernardi P. (2011) Mitochondrial permeability transition in Ca<sup>2+</sup>-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*, 50: 222-233.
136. Parsons MJ, Green DR. (2010) Mitochondria in cell death. *Essays Biochem*, 47: 99-114.

137. Hartley A, Stone JM, Heron C, Cooper JM, Schapira AH. (1994) Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem*, 63: 1987-1990.
138. Andreyev AY, Kushnareva YE, Murphy AN, Starkov AA. (2015) Mitochondrial ROS Metabolism: 10 Years Later. *Biochemistry (Mosc)*, 80: 517-531.
139. Adam-Vizi V, Tretter L. (2013) The role of mitochondrial dehydrogenases in the generation of oxidative stress. *Neurochem Int*, 62: 757-763.
140. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*, 70: 200-214.
141. Opdam NJM, Collares K, Hickel R, Bayne SC, Loomans BA, Cenci MS, Lynch CD, Correa MB, Demarco F, Schwendicke F et al. (2018) Clinical studies in restorative dentistry: New directions and new demands. *Dent Mater*, 34: 1-12.
142. Ferracane JL, Hilton TJ, Stansbury JW, Watts DC, Silikas N, Ilie N, Heintze S, Cadenaro M, Hickel R. (2017) Academy of Dental Materials guidance-Resin composites: Part II-Technique sensitivity (handling, polymerization, dimensional changes). *Dent Mater*, 33: 1171-1191.
143. Zhang N, Melo MAS, Weir MD, Reynolds MA, Bai Y, Xu HHK. (2016) Do Dental Resin Composites Accumulate More Oral Biofilms and Plaque than Amalgam and Glass Ionomer Materials? *Materials (Basel)*, 9 (11).
144. Schmalz G, Hickel R, van Landuyt KL, Reichl FX. (2018) Scientific update on nanoparticles in dentistry. *Int Dent J*, 68: 299-305.
145. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry Sixth Edition. Part II. Bioenergetics and metabolism, Chapter 19. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation.* WH Freeman, New York, 2013: 691-723.
146. Ádám V. *Orvosi Biokémia. Medicina, Budapest, 2016: 710-712.*
147. Victor W. Rodwell, David A. Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, P. Anthony Weil. *Harper's Illustrated Biochemistry, Thirtieth Edition. Section III, Chapter 13. The Respiratory Chain & Oxidative Phosphorylation.* Minion by Cengage® Publisher Services, United States, 2015: 126-138.
148. Brand MD, Nicholls DG. (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*, 435: 297-312.

149. Mitchell P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191: 144-148.
150. Mitchell P. (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1807: 1507-1538.
151. Duchen MR. (2000) Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol*, 529 Pt 1: 57-68.
152. Boveris A, Chance B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, 134: 707-716.
153. Ádám V. Orvosi Biokémia. Medicina, Budapest, 2016: 137.
154. Turrens JF. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552: 335-344.
155. Aikens J, Dix TA. (1991) Peroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem*, 266: 15091-15098.
156. Chance B, Sies H, Boveris A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59: 527-605.
157. Skulachev VP. (1996) Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q Rev Biophys*, 29: 169-202.
158. Fenton, HJH. (1894) Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc Trans*, 65: 899-911.
159. Brand MD. (2016) Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic Biol Med*, 100: 14-31.
160. Turrens JF. (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep*, 17: 3-8.
161. Hinkle PC, Butow RA, Racker E, Chance B. (1967) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XV. Reverse electron transfer in the flavin-cytochrome beta region of the respiratory chain of beef heart submitochondrial particles. *J Biol Chem*, 242: 5169-5173.

162. Votyakova TV, Reynolds IJ. (2001) DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem*, 79: 266-277.
163. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*, 80: 780-787.
164. Starkov AA, Fiskum G. (2003) Regulation of brain mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J Neurochem*, 86: 1101-1107.
165. Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V. (1997) Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr*, 29: 89-95.
166. Komlódi T, Tretter L. (2017) Methylene blue stimulates substrate-level phosphorylation catalysed by succinyl-CoA ligase in the citric acid cycle. *Neuropharmacology*, 123: 287-298.
167. Tretter L, Adam-Vizi V. (2007) Moderate dependence of ROS formation on DeltaPsi<sub>m</sub> in isolated brain mitochondria supported by NADH-linked substrates. *Neurochem Res*, 32: 569-575.
168. Tretter L, Adam-Vizi V. (2004) Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci*, 24: 7771-7778.
169. Tretter L, Adam-Vizi V. (2000) Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J Neurosci*, 20: 8972-8979.
170. Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. (2004) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci*, 24: 7779-7788.
171. Ambrus A, Tretter L, Adam-Vizi V. (2009) Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase-mediated reactive oxygen species generation by lipoic acid. *J Neurochem*, 109 Suppl 1: 222-229.
172. Ambrus A, Nemerita NS, Torocsik B, Tretter L, Nilsson M, Jordan F, Adam-Vizi V. (2015) Formation of reactive oxygen species by human and bacterial

- pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complexes reconstituted from recombinant components. *Free Radic Biol Med*, 89: 642-650.
173. Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochem J*, 368: 545-553.
  174. Brand MD. (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*, 45: 466-472.
  175. Turrens JF, Boveris A. (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*, 191: 421-427.
  176. Tretter L, Ambrus A. (2014) Measurement of ROS homeostasis in isolated mitochondria. *Methods Enzymol*, 547: 199-223.
  177. Ackrell BA, Kearney EB, Singer TP. (1978) Mammalian succinate dehydrogenase. *Methods Enzymol*, 53: 466-483.
  178. Siebels I, Drose S. (2013) Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates. *Biochim Biophys Acta*, 1827: 1156-1164.
  179. Kwong LK, Sohal RS. (1998) Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 350: 118-126.
  180. Tretter L, Takacs K, Hegedus V, Adam-Vizi V. (2007) Characteristics of alpha-glycerophosphate-evoked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in brain mitochondria. *J Neurochem*, 100: 650-663.
  181. Orr AL, Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Brand MD. (2012) A refined analysis of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 287: 42921-42935.
  182. Sies H. (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 91: 31-38.
  183. Duchon MR. (2004) Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes*, 53 Suppl 1: 96-102.
  184. Chouchani ET, Kazak L, Jedrychowski MP, Lu GZ, Erickson BK, Szpyt J, Pierce KA, Laznik-Bogoslavski D, Vetrivelan R, Clish CB et al. (2016)

- Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature*, 532: 112-116.
185. Dare AJ, Logan A, Prime TA, Rogatti S, Goddard M, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ, Murphy MP, Saeb-Parsy K. (2015) The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ decreases ischemia-reperfusion injury in a murine syngeneic heart transplant model. *J Heart Lung Transplant*, 34: 1471-1480.
  186. Coskun P, Wyrembak J, Schriener SE, Chen HW, Marciniack C, Laferla F, Wallace DC. (2012) A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. *Biochim Biophys Acta*, 1820: 553-564.
  187. Chaturvedi RK, Flint Beal M. (2013) Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radic Biol Med*, 63: 1-29.
  188. Fiskum G, Murphy AN, Beal MF. (1999) Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19: 351-369.
  189. Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Oliveira HC, Castilho RF. (2006) Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. *Front Biosci*, 11: 2554-2564.
  190. Wang Y, Tabas I. (2014) Emerging roles of mitochondria ROS in atherosclerotic lesions: causation or association? *J Atheroscler Thromb*, 21: 381-390.
  191. Christiansen LB, Dela F, Koch J, Hansen CN, Leifsson PS, Yokota T. (2015) Impaired cardiac mitochondrial oxidative phosphorylation and enhanced mitochondrial oxidative stress in feline hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 308: 1237-1247.
  192. Al-Lahham R, Deford JH, Papaconstantinou J. (2016) Mitochondrial-generated ROS down regulates insulin signaling via activation of the p38MAPK stress response pathway. *Mol Cell Endocrinol*, 419: 1-11.
  193. Sabharwal SS, Schumacker PT. (2014) Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer*, 14: 709-721.
  194. Ohsawa S, Sato Y, Enomoto M, Nakamura M, Betsumiya A, Igaki T. (2012) Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression through Hippo signalling in *Drosophila*. *Nature*, 490: 547-551.



195. Shadel GS, Horvath TL. (2015) Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell*, 163: 560-569.
196. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem*, 266: 22028-22034.
197. Antunes F, Han D, Cadenas E. (2002) Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in vivo conditions. *Free Radic Biol Med*, 33: 1260-1267.
198. Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. (2004) Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem*, 279: 32804-32812.
199. Chen Z, Lash LH. (1998) Evidence for mitochondrial uptake of glutathione by dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. *J Pharmacol Exp Ther*, 285: 608-618.
200. Martensson J, Lai JC, Meister A. (1990) High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 7185-7189.
201. Wahllander A, Soboll S, Sies H, Linke I, Muller M. (1979) Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases. *FEBS Lett*, 97: 138-140.
202. Dringen R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*, 62: 649-671.
203. Olafsdottir K, Reed DJ. (1988) Retention of oxidized glutathione by isolated rat liver mitochondria during hydroperoxide treatment. *Biochim Biophys Acta*, 964: 377-382.
204. Zoccarato F, Cavallini L, Alexandre A. (2004) Respiration-dependent removal of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in brain mitochondria: inhibition by Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem*, 279: 4166-4174.
205. Vogel R, Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R. (1999) The regeneration of reduced glutathione in rat forebrain mitochondria identifies metabolic pathways providing the NADPH required. *Neurosci Lett*, 275: 97-100.
206. Hoek JB, Rydstrom J. (1988) Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem J*, 254: 1-10.

207. Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, 28: 32-40.
208. Pesta D, Gnaiger E. (2012) High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol*, 810: 25-58.
209. Komary Z, Tretter L, Adam-Vizi V. (2008) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation is decreased by calcium in isolated brain mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1777: 800-807.
210. Tretter L, Biagioni Angeli E, Ardestani MR, Goracci G, Adam-Vizi V. (2011) Reversible inhibition of hydrogen peroxide elimination by calcium in brain mitochondria. *J Neurosci Res*, 89: 1965-1972.
211. Rahman I, Kode A, Biswas SK. (2006) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*, 1: 3159-3165.
212. Tretter L, Horvath G, Holgyesi A, Essek F, Adam-Vizi V. (2014) Enhanced hydrogen peroxide generation accompanies the beneficial bioenergetic effects of methylene blue in isolated brain mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 77: 317-330.
213. Ragan CI, Hatefi Y. (1986) Isolation of the iron-sulfur-containing polypeptides of NADH: oxidoreductase ubiquinone. *Methods Enzymol*, 126: 360-369.
214. Klingenberg M, Falkner G, Erdelt H, Grebe K. (1971) On the relation between adenine nucleotide carrier sites and atractyloside binding in mitochondria. *FEBS Lett*, 16: 296-300.
215. Adam-Vizi V. (2005) Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal*, 7: 1140-1149.
216. Nohl H, Gille L, Staniek K. (2005) Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol*, 69: 719-723.
217. Starkov AA, Polster BM, Fiskum G. (2002) Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J Neurochem*, 83: 220-228.

218. Tretter L, Adam-Vizi V. (2012) High  $\text{Ca}^{2+}$  load promotes hydrogen peroxide generation via activation of alpha-glycerophosphate dehydrogenase in brain mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 53: 2119-2130.
219. Chance B, Hollunger G. (1961) The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. VI. The efficiency of the reaction. *J Biol Chem*, 236: 1577-1584.
220. Gyulkhandanyan AV, Pennefather PS. (2004) Shift in the localization of sites of hydrogen peroxide production in brain mitochondria by mitochondrial stress. *J Neurochem*, 90: 405-421.
221. Tretter L, Takacs K, Kover K, Adam-Vizi V. (2007) Stimulation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation by calcium in brain mitochondria respiring on alpha-glycerophosphate. *J Neurosci Res*, 85: 3471-3479.
222. Krifka S, Petzel C, Hiller KA, Frank EM, Bosl C, Spagnuolo G, Reichl FX, Schmalz G, Schweikl H. (2010) Resin monomer-induced differential activation of MAP kinases and apoptosis in mouse macrophages and human pulp cells. *Biomaterials*, 31: 2964-2975.
223. Noda M, Wataha JC, Lockwood PE, Volkmann KR, Kaga M, Sano H. (2003) Sublethal, 2-week exposures of dental material components alter TNF-alpha secretion of THP-1 monocytes. *Dent Mater*, 19: 101-105.
224. Schweikl H, Schmalz G, Rackebrandt K. (1998) The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutat Res*, 415: 119-130.
225. Spagnuolo G, Desiderio C, Riviuccio V, Amato M, Rossetti DV, D'Anto V, Schweikl H, Lupi A, Rengo S, Nocca G. (2013) In vitro cellular detoxification of triethylene glycol dimethacrylate by adduct formation with N-acetylcysteine. *Dent Mater*, 29: e153-160.
226. Nocca G, De Palma F, Minucci A, De Sole P, Martorana GE, Calla C, Morlacchi C, Gozzo ML, Gambarini G, Chimenti C et al. (2007) Alterations of energy metabolism and glutathione levels of HL-60 cells induced by methacrylates present in composite resins. *J Dent*, 35: 187-194.
227. Chappell JB, Greville GD. (1961) Effects of oligomycin on respiration and swelling of isolated liver mitochondria. *Nature*, 190: 502-504.

228. Estabrook RW. (1961) Effect of oligomycin on the arsenate and DNP stimulation of mitochondrial oxidations. *Biochem Biophys Res Commun*, 4: 89-91.
229. Komary Z, Tretter L, Adam-Vizi V. (2010) Membrane potential-related effect of calcium on reactive oxygen species generation in isolated brain mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1797: 922-928.
230. Vignais PV, Douce R, Lauquin GJ, Vignais PM. (1976) Binding of radioactively labeled carboxyatractyloside, atractyloside and bongkrekic acid to the ADP translocator of potato mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 440: 688-696.
231. Juaristi I, Garcia-Martin ML, Rodrigues TB, Satrustegui J, Llorente-Folch I, Pardo B. (2017) ARALAR/AGC1 deficiency, a neurodevelopmental disorder with severe impairment of neuronal mitochondrial respiration, does not produce a primary increase in brain lactate. *J Neurochem*, 142: 132-139.
232. Oberg KE. (1964) The Inhibition of the Respiration of Brain Mitochondria of Rotenone-Poisoned Fish. *Exp Cell Res*, 36: 407-410.
233. Parker WD, Jr., Haas R, Stumpf DA, Parks J, Eguren LA, Jackson C. (1984) Brain mitochondrial metabolism in experimental thiamine deficiency. *Neurology*, 34: 1477-1481.
234. Palmieri F, Pierri CL. (2010) Mitochondrial metabolite transport. *Essays Biochem*, 47: 37-52.
235. Neupert W, Herrmann JM. (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 76: 723-749.
236. Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov AV, Cookson MR, Greenamyre JT. (2002) An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci*, 22: 7006-7015.
237. Albracht SP, Meijer AJ, Rydstrom J. (2011) Mammalian NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) and nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) together regulate the mitochondrial production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>--implications for their role in disease, especially cancer. *J Bioenerg Biomembr*, 43: 541-564.

238. Azzone GF, Ernster L, Weinbach EC. (1963) Succinate-linked acetoacetate reduction. I. Endergonic reduction of acetoacetate by succinate in liver mitochondria. *J Biol Chem*, 238: 1825-1833.
239. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord ENJ, Smith AC, et al. (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, 515: 431-435.
240. Cino M, Del Maestro RF. (1989) Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: the effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia. *Arch Biochem Biophys*, 269: 623-638.
241. Melnick RL, Rubenstein CP, Motzkin SM. (1979) Measurement of mitochondrial oxidative phosphorylation: selective inhibition of adenylate kinase activity by P1,P5-di-(adenosine-5')-pentaphosphate. *Anal Biochem*, 96: 7-11.
242. Ye J, Jiang Z, Chen X, Liu M, Li J, Liu N. (2016) Electron transport chain inhibitors induce microglia activation through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *Exp Cell Res*, 340: 315-326.
243. Hu W, Tian H, Yue W, Li L, Li S, Gao C, Si L, Qi L, Lu M, Hao B et al. (2016) Rotenone induces apoptosis in human lung cancer cells by regulating autophagic flux. *IUBMB Life*, 68: 388-393.

## **10. Saját publikációk jegyzéke**

### **A PhD értekezés alapját képező tudományos közlemények:**

**Mikulás K,** Hermann P, Gera I, Komlódi T, Horváth G, Ambrus A, Tretter L. (2018) Triethylene glycol dimethacrylate impairs bioenergetic functions and induces oxidative stress in mitochondria via inhibiting respiratory Complex I. Dent Mater, 34: e166-e181.

**IF** (2017): 4.039

**Mikulás K,** Linninger M, Takács E, Kispélyi B, Nagy K, Fejérdy P, Hermann P. (2018) Paradigmaváltás a fogmegtartó kezelésben: az amalgámkorszak vége. Orv Hetil, 42: 1700-1709.

**IF** (2016): 0.349

### **A disszertációtól független közlemény**

**Mikulás K,** Kivovics P, Nagy G, Marton K, Madlena M. (2008) Complex oral rehabilitation of a patient with Witkop's syndrome: an interdisciplinary approach. Oral Health and Dental Management in the Black Sea Countries Vol. VII, No.2.

## 11. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Tretter László Professor Úrnak, aki sok energiával, rengeteg ötlettel segítette munkámat, és akitől a tudományos munkával szembeni igényességet sajátíthattam el. Köszönöm Ádám Veronika Professor Asszonynak és Tretter László Professor Úrnak, hogy az MTA-SE Orvosi Biokémia Intézetben lehetőséget biztosított számomra a munkám elvégzéséhez, ahol kutatásaimat a Nemzeti Agykutatási Program (KTIA\_13\_NAP-A-III/6 és 2017-1.2.1-NKP-2017-00002), az OTKA (NK 112230), és az MTA (MTA TKI 02001) pályázati programjai támogatták. Köszönöm Professor Úrnak az útmutatást, ösztönzését és türelmét, amellyel szemléletemet formálta és időt, fáradságot nem kímélve segítette publikációm és az értekezés létrejöttét.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Hermann Péter Professor Úrnak, aki mindvégig támogatott a kutatásaim és a közlemények megírása során és segítette a második publikációm létrejöttét. Köszönöm, hogy a Fogpótlástani Klinikán végzett klinikai munkám mellett biztosította számomra a PhD kutatómunkámhoz szükséges feltételeket, és hogy időt szentelhessek a SE Orvosi Biokémiai Intézetben a kutatásaim elvégzéséhez.

Köszönet a Fogorvostudományi Karnak, ami a 2016 évi Belső Kutatási Pályázata keretében támogatta a kutatásom (11620/FOFTO/2016).

Külön köszönet illeti Prof. Dr. Varga Gábort, az Orálbiológiai Tanszék igazgatóját, hogy lehetőséget és teret biztosított további szakmai fejlődésemhez.

Köszönöm közvetlen munkatársaimnak Dr. Komlódi Timeának, Dr. Horváth Gergőnek és Dr. Nagy Ádámnak, hogy kutatásaim során nagy segítségemre voltak. Kérdéseim mindig megválaszolásra találtak náluk és sokat segítettek a mérésekben és a kiértékelésben.

Szintén köszönettel tartozom az Orvosi Biokémia Intézet dolgozóinak; Takács Katalinnak és Várnagy Andreának a kitűnő labortechnikai munkáikért és hogy kutatásaim során a laborban mindig a segítségemre voltak.

Köszönet illeti a VOCO céget (Cuxhaven, Németország), aki a rendelkezésünkre bocsátotta vizsgálatainkhoz a TEGDMA rezin monomert.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni férjemnek, Dr. Maneschg Ottonak, kislányomnak, Viktóriának és Szüleimnek, hogy mindig támogattak, erőt adtak és tolerálták a Tőlük távol tartott időt, amit a kutatásaimmal és a közlemények megírásával töltöttem.



