

UNIVERZITET U BEOGRADU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Violeta S. Petrović

ISPITIVANJE BIOLOŠKIH I FIZIČKIH
SVOJSTAVA NANOSTRUKTURNIH
BIOMATERIJALA NA BAZI AKTIVNIH
KALCIJUMSILIKATNIH SISTEMA I
HIDROKSIAPATITA

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Violeta S. Petrović

EVALUATION OF BIOLOGICAL AND
PHYSICAL PROPERTIES OF
NANOSTRUCTURAL BIOMATERIALS
BASED ON ACTIVE CALCIUM
SILICATE SYSTEMS AND
HYDROXYAPATITE

doctoral dissertation

Belgrade, 2014

Mentor:

Prof. dr Slavoljub Živković,

redovni profesor, Klinika za bolesti zuba, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komentor:

Dr Vukoman Jokanović,

naučni savetnik, Institut nuklearnih nauka, Vinča

Članovi komisije:

Prof. dr Đurica Grga

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr sci Dragana Mitić-Ćulafić

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Jelena Sopta

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane

Želela bih da se zahvalim:

Svom mentoru Prof. dr Slavoljubu Živkoviću na usmeravanju, stručnim savetima, pomoći i podršci na mom dosadašnjem profesionalnom putu. Dugogodišnjom saradnjom izgradili smo odnos na koji sam ponosna, zasnovan na međusobnoj iskrenosti, razumevanju i poverenju. Zahvalna sam mu što veruje u mene i smatram ga svojim iskrenim prijateljem.

Komentoru dr Vukomanu Jokanoviću, inovatoru i entuzijasti, čijom sam ljubaznošću postala deo tima koji istražuje jednu od najaktuelnijih i najperspektivnijih oblasti u okviru dentalnih materijala.

Dvema divnim damama, Prof. dr Jeleni Sopti sa Medicinskog fakulteta i dr Dragani Mitić-Ćulafić sa Biološkog fakulteta u Beogradu. Njihova stručnost i posvećenost radu značajno su doprineli kvalitetu ove doktorske disertacije. Čast i zadovoljstvo mi je da sam ih upoznala i imala priliku sa njima da sarađujem.

Prof. dr Grga Đurici na ukazanom poverenju, stručnoj pomoći i prijateljskoj podršci.

Doc. dr Vesni Miletić na statističkoj obradi rezultata i stručnoj pomoći prilikom realizacije ispitivanja fizičkih svojstava materijala. Pored toga, želim da se zahvalim Vesni na pozitivnom odnosu koji je imala prema onome što radim i načinu na koji radim, njena podrška mi je mnogo značila.

Kolegama sa Biološkog fakulteta i Fakulteta veterinarske medicine koji su mi omogućili realizaciju ispitivanja bioloških svojstava materijala.

Dr Bojanu Dželetoviću na odvojenom vremenu i tehničkoj pomoći prilikom sečenja uzoraka, ali i na inspirativnim komentarima koji su obiman posao učinili zadovoljstvom.

Mojim dragim kolegama sa Klinike za bolesti zuba na prijateljskoj podršci.

Mojoj porodici, roditeljima i sestri na bezrezervnoj podršci, beskrajnoj pomoći i razumevanju, oduvek.

Nađi i Sari,

najboljim devojčicama na svetu!

ISPITIVANJE BIOLOŠKIH I FIZIČKIH SVOJSTAVA NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI AKTIVNIH KALCIJUMSILIKATNIH SISTEMA I HIDROKSIAPATITA

SAŽETAK

Tokom prethodne dve decenije, ostvaren je značajan napredak u oblasti endodontske terapije uvođenjem novih biomaterijala, superiornih osobina u odnosu na konvencionalne materijale. Biomaterijale, pored biokompatibilnosti odlikuje i bioaktivnost odnosno sposobnost indukcije ćelijske diferencijacije i proliferacije koja omogućava regeneraciju tkiva. Najznačajniji među novim materijalima su svakako kalcijum silikatni cementi sa izuzetnim biološkim i adekvatnim fizičkim svojstvima. Ipak, kliničku primenu ovih materijala otežava dugo vreme vezivanja i ispiranje sa mesta aplikacije. Kalcijum fosfatni cementi su takođe predmet brojnih istraživanja, ali se i pored biokompatibilnosti, usled loših mehaničkih svojstava, ne mogu samostalno koristiti u svojstvu endodontskih cemenata.

U cilju prevazilaženja negativnih svojstava kalcijum silikatnih i kalcijum fosfatnih cemenata, inovativnom tehnologijom sintetisana su dva nanostrukturalna biomaterijala na bazi kalcijum silikatnih sistema (CS) i mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS). Unapređenom tehnologijom dobijeni su materijali izražene aktivnosti čestica, sa značajno kraćim vremenom vezivanja u odnosu na komercijalno dostupne materijale sličnog hemijskog sastava. Osnovne formulacije materijala CS i HA-CS, su potom hemijski modifikovane, u cilju dobijanja kanalnih silera, fluidnije konzistencije i dužeg vremena vezivanja.

Cilj ovog istraživanja je bio da se ispituju fizička i biološka svojstva novosintetisanih nanostrukturalnih biomaterijala na bazi aktivnih kalcijumsilikatnih sistema (CS) i mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS).

Rastvorljivost i poroznost osnovnih formulacija eksperimentalnih materijala CS i HA-CS ispitivana je merenjem promena u masi uzoraka materijala nakon čuvanja

uzoraka tokom 28 dana u veštačkom tkivnom fluidu. Rastvorljivost i poroznost silera CS i HA-CS ispitivana je nakon čuvanja uzoraka silera 24h u veštačkom tkivnom fluidu. Kvalitet rubnog zaptivanja (marginalna mikropropustljivost) materijala CS i HA-CS ispitivan je testom pasivnog prodora boje, 6 meseci nakon aplikacije materijala u interradiksne furkacije ekstrahovanih zuba. Jačina veze materijala CS i HA-CS i silera CS i HA-CS sa dentinom kanala korena ispitivana je testom smicanja. Citotoksičnost materijala CS i HA-CS i silera CS i HA-CS ispitivana je u kulturi humanih fibroblasta MRC-5, primenom MTT testa. Testirana je citotoksičnost svežih rastvora materijala različitih koncentracija i izlužaka vezanih materijala u tri vremenska intervala (24h, 7 i 21 dan). Biokompatibilnost i bioinduktivnost materijala CS i HA-CS procenjena je u *in vivo* uslovima na animalnom modelu, histološkom analizom susednog tkiva nakon implantacije materijala u kanale korena zuba, posle eksperimentalnog perioda od 28 dana. Kao kontrolni materijali korišćeni su komercijalni kalcijum silikatni cement (MTA Angelus Londrina, Brazil) i konvencionalni siler na bazi kalcijum hidroksida (Acroseal, Septodont, France).

Najveća poroznost uočena je kod materijala HA-CS (25.87%). Poroznost materijala CS (9.96%) i MTA (8.86%) bila je slična i značajno manja u odnosu na HA-CS. Najveća rastvorljivost uočena je kod materijala HA-CS (0.24 mg/mm³), značajno veća u odnosu na materijale CS i MTA. U pogledu rastvorljivosti materijala CS (0.15 mg/mm³) i MTA (0.10 mg/mm³) nisu uočene značajne razlike. Poroznost eksperimentalnih silera CS (43.3%) i HA-CS (41.8%) bila je međusobno slična i značajno veća u odnosu na poroznost Acroseal-a (2.7%). Nije bilo značajnih razlika u pogledu rastvorljivosti silera CS (16.6 mg/mm³) i HA-CS (18.6 mg/mm³), ali su oba eksperimentalna silera bila značajno rastvorljivija u odnosu na Acroseal (0.5 mg/mm³). Najmanji prodor boje izmeren je kod materijala CS (0.44 mm), a slične vrednosti su dobijene i za MTA (0.54 mm). Prodor boje kod materijala HA-CS (2.00 mm) bio je značajno veći u odnosu na materijale CS i MTA. Jačina veze sa dentinom kanala korena materijala CS (3.83 MPa) i HA-CS (3.22 MPa) nije se značajno razlikovala u odnosu na MTA (5.23 MPa). Jačina veze sa dentinom kanala korena eksperimentalnih silera CS (2.64 MPa) i silera HA-CS (3.20 MPa) bila je komparabilna, ali značajno slabija u odnosu na vezu kontrolnog silera Acroseal (17.74 MPa). Rezultati testa citotoksičnosti ukazali su na zavisnost toksičnosti materijala CS i MTA od

koncentracije materijala u rastvoru. Nerazblaženi i razblaženi izlušci materijala CS i HA-CS pokazali su značajno manju toksičnost u odnosu na MTA u svim testiranim vremenskim intervalima. Posle 21-dnevnog izluživanja, izlušci materijala HA-CS bili su manje toksični od materijala CS. Razblaženi izlušci materijala CS i HA-CS bili su značajno manje toksični u odnosu na nerazblažene izluške materijala. Citotoksičnost silera CS i HA-CS bila je slična citotoksičnosti osnovnih formulacija materijala. U *in vivo* studiji, na animalnom modelu nije bilo značajnih razlika u pogledu inflamatornog odgovora između eksperimentalnih materijala CS i HA-CS, kao ni između eksperimentalnih materijala i MTA. U većini uzoraka inflamatorna reakcija je ocenjena kao blaga do umerena. Novoformirano kalcifikovano tkivo uočeno je u svim uzorcima svih testiranih materijala, ali je ono bilo deponovano u većoj količini kod materijala CS i HA-CS u odnosu na MTA. Najbolje organizovano kalcifikovano tkivo uočeno je kod materijala HA-CS.

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije može se zaključiti da je materijal CS po svojim fizičkim svojstvima komparabilan sa komercijalnim kalcijum silikatnim cementom MTA Angelus, dok je materijal HA-CS pokazao slabija fizička svojstva. Materijali CS i HA-CS su pokazali superiorna biološka svojstva u odnosu na MTA. Modifikacije u cilju dobijanja materijala sa osobinama kanalnih silera nisu imale negativnog uticaja na biološka svojstva, ali su rezultirale slabijim fizičkim svojstvima, u odnosu na svojstva osnovnih formulacija materijala CS i HA-CS.

KLJUČNE REČI: Nanomaterijali, kalcijum silikatni cementi, hidroksiapatit, biokeramički sileri, rastvorljivost, poroznost, mikropropustljivost, jačina veze, citotoksičnost, bioinduktivnost

NAUČNA OBLAST: Stomatologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Kliničke stomatološke nauke

UDK broj: 615.46:616.314(043.3)

EVALUATION OF BIOLOGICAL AND PHYSICAL PROPERTIES OF NANOSTRUCTURAL BIOMATERIALS BASED ON ACTIVE CALCIUM SILICATE SYSTEMS AND HYDROXYAPATITE

ABSTRACT

In the past two decades, significant improvement in endodontic therapy has been made by introducing new biomaterials. Beside biocompatibility, these materials are bioactive with the ability to induce cell proliferation and differentiation and tissue regeneration. The greatest attention has been given to calcium silicate cements, because of superior biological and good physical properties. Clinical use of these cements is restricted by long setting time and low wash-out resistance. Calcium phosphate cements have also been investigated, but although biocompatible, inferior mechanical properties limit their use as endodontic cements.

Recently, two new nanostructural biomaterials, based on calcium silicate systems (CS) and a mixture of hydroxyapatite and calcium silicate systems (HA-CS) have been synthesized. Innovative technology provided synthesis of cements with shorter setting time compared to commercial materials with similar chemical constitution. Also, cements CS and HA-CS have been chemically modified in an attempt to synthesize canal sealers with better fluidity and longer setting time.

The purpose of this study was to evaluate physical and biological properties of the new nanostructural biomaterials based on calcium silicate systems (CS) and a mixture of hydroxyapatite and calcium silicate systems (HA-CS).

Solubility and porosity of experimental materials CS and HA-CS were measured after 28 days of immersion in simulated tissue fluid. Solubility and porosity of experimental CS and HA-CS sealers were measured after 24 h of immersion in simulated tissue fluid. Marginal microleakage of materials CS and HA-CS was evaluated by the dye penetration method, six months after material application in furcal perforations of extracted teeth. Bond strength to dentin of materials CS and HA-CS and

sealers CS and HA-CS, was measured by the push-out test. Cytotoxicity of materials and sealers CS and HA-CS was tested using the MTT assay on human fibroblasts MRC-5. Cytotoxicity of different concentrations of fresh solutions of materials and sealers and eluates of set materials and sealers was tested after 24 h, 7 days and 21 day of elution. Biocompatibility and bioinductivity of materials CS and HA-CS was evaluated through histological analysis of surrounding tissue, after 28 day of implantation materials in root canals of experimental animals. Commercial calcium silicate cement (MTA Angelus, Londrina, Brazil) and conventional sealer based on calcium hydroxide (Acroseal, Septodont, France) were used as control materials.

Material HA-CS showed the highest porosity (25.87%). Porosity of material CS (9.96%) and MTA (8.86%) was similar and significantly smaller compared to HA-CS. Also, material HA-CS showed the highest solubility (0.24 mg/mm³), significantly higher compared to material CS and MTA. There was no difference in the solubility of material CS (0.15 mg/mm³) and MTA (0.10 mg/mm³). Porosity of experimental sealers CS (43.3%) and HA-CS (41.8%) was comparable but significantly higher compared to porosity of Acroseal (2.7%). The lowest dye penetration was measured for material CS (0.44 mm) and similar values were measured for MTA (0.54 mm). Materials HA-CS showed significantly higher values of dye penetration (2.00 mm). There was not significantly difference for bond strength to dentin between materials CS (3.83 MPa), HA-CS (3.22 MPa) and MTA (5.23 MPa). Sealers CS and HA-CS showed similar bond strength (2.64 MPa and 3.22 MPa, respectively), but this bond was significantly weaker compared to Acroseal (17.74 MPa). The results of the cytotoxicity of fresh solutions of materials showed dose dependent toxicity of CS and MTA. CS and HA-CS undiluted and diluted eluates showed greater cell viability than MTA at all test periods. In 21-day undiluted eluates, cell viability was greater after treatment with HA-CS compared to CS. Diluted eluates of CS and HA-CS resulted in significantly greater cell viability than undiluted eluates of the materials. In the animal model study, there was no significant difference between the tested materials in terms of intensity of the inflammatory response. In most samples, inflammatory reactions were scored as mild to moderate. Formation of calcified tissue was detected in all specimens for all tested materials. CS and HA-CS showed faster formation of calcified tissue compared to

MTA. Calcified tissue in HA-CS samples was better organized compared to CS and MTA.

Based on the results of this study, it can be concluded that in terms of physical properties, material CS is comparable with MTA. HA-CS showed inferior physical properties. Materials CS and HA-CS showed better biological properties than MTA. Chemical modifications of materials CS and HA-CS in an attempt to synthesize canal sealers had no adverse effect on biological, but had adverse effect on physical properties of materials.

KEY WORDS: Nanomaterials, calcium silicate cements, hydroxyapatite, bioceramic sealers, solubility, porosity, microleakage, bond strength, cytotoxicity, bioinductivity

SCIENTIFIC FIELD: Dentistry

SPECIFIC SCIENTIFIC FIELD: Clinical Dental Science

UDC number: 615.46:616.314(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Cementi na bazi kalcijum silikata	4
2.1.1. Hemijski sastav.....	4
2.1.2. Fizička svojstva.....	7
2.1.3. Biološka svojstva.....	20
2.2. Cementi na bazi kalcijum fosfata	36
2.2.1. Hemijski sastav.....	36
2.2.2. Fizička i biološka svojstva.....	36
2.2.3. Nove formulacije materijala na bazi kalcijum fosfata.....	38
2.3. Sileri na bazi kalcijum silikata i kalcijum fosfata	42
2.3.1. Hemijski sastav.....	42
2.3.2. Fizička svojstva.....	43
2.3.3. Biološka svojstva.....	45
2.4. Nanomaterijali u endodonciji	48
2.5. Eksperimentalni nanostrukturni biomaterijali na bazi aktivnih kalcijumsilikatnih sistema i hidroksiapatita	50
3. CILJ	53
4. MATERIJAL I METODE	54
4.1. Ispitivanje fizičkih svojstava nanostrukturnih biomaterijala na bazi kalcijumsilikatnih sistema i mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema	54
4.1.1. Ispitivanje rastvorljivosti i poroznosti.....	54
4.1.2. Ispitivanje marginalne mikropropustljivosti.....	58
4.1.3. Ispitivanje jačine veze materijala sa dentinom kanala korena.....	60
4.2. Ispitivanje bioloških svojstava nanostrukturnih biomaterijala na bazi kalcijumsilikatnih sistema i mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema	65
4.2.1. Ispitivanje citotoksičnosti materijala: <i>in vitro</i> studija.....	65
4.2.2. Ispitivanje biokompatibilnosti i bioinduktivnosti:.....	68
<i>in vivo</i> studija.....	68
5. REZULTATI	73
5.1. Rezultati ispitivanja fizičkih svojstava materijala	73

5.1.1.	Rezultati ispitivanja rastvorljivosti i poroznosti.....	73
5.1.2.	Rezultati ispitivanja marginalne mikropropustljivosti	78
5.1.3.	Rezultati ispitivanja jačine veze materijala sa dentinom kanala korena ..	83
5.2.	Rezultati ispitivanja bioloških svojstava materijala	89
5.2.1.	Rezultati ispitivanja citotoksičnosti	89
5.2.2.	Rezultati ispitivanja biokompatibilnosti i bioinduktivnosti: <i>in vivo</i> studija..	96
6.	DISKUSIJA	106
6.1.	Diskusija rezultata ispitivanja fizičkih svojstava materijala	106
6.1.1.	Diskusija rezultata ispitivanja rastvorljivosti i poroznosti	106
6.1.2.	Diskusija rezultata ispitivanja marginalne mikropropustljivosti	115
6.1.3.	Diskusija rezultata ispitivanja jačine veze materijala sa dentinom kanala korena.....	120
6.2.	Diskusija rezultata ispitivanja bioloških svojstava materijala	126
6.2.1.	Diskusija rezultata ispitivanja citotoksičnosti	126
6.2.2.	Diskusija rezultata ispitivanja biokompatibilnosti i bioinduktivnosti	131
7.	ZAKLJUČCI	137
8.	LITERATURA	139

1. UVOD

Osnovni zadatak endodontskih materijala je da obezbede hermetično zatvaranje kanalskog sistema korena zuba, odnosno patoloških komunikacija između kanalskog sistema i okolnog tkiva. Stoga su kvalitetno rubno zaptivanje, odnosno adekvatna marginalna adaptacija materijala među najznačajnijim faktorima za dugoročan uspeh endodontskog tretmana [186]. S obzirom na to da su endodontski materijali u neposrednom kontaktu sa dentinom i periodontalnim tkivom duži niz godina, neophodno je da su biokompatibilni, odnosno da ne izazivaju citotoksične, genotoksične, zapaljenske i alergijske efekte u tkivima domaćina [146]. Osim toga, treba da su nerastvorljivi u tkivnim tečnostima, dimenzionalno stabilni, rendgen kontrastni, da poseduju adekvatnu pritisnu čvrstoću, odgovarajuće radno vreme i vreme vezivanja kao i da su jednostavni za upotrebu [146]. Aktuelni konvencionalni materijali najčešće ne ispunjavaju sve navedene zahteve.

Tokom prethodne dve decenije razvoj novih tehnologija i tehnika omogućio je realizaciju kvalitetnijih endodontskih zahvata. Posebno značajan napredak ostvaren je u oblasti razvoja i primene novih biomaterijala sa superiornim osobinama u odnosu na konvencionalne materijale [120]. Biomaterijali su dizajnirani tako da nakon implantacije u ljudski organizam, zamene delove oštećenog živog sistema odnosno ispune odgovarajuću biološku funkciju [110].

Istovremeno, napredak u razumevanju biologije stem ćelija, omogućio je i uvođenje regenerativne terapije u endodonciju [101]. Tradicionalni pristup tretmanu endodontskih i periodontalnih oboljenja (konzervativan ili hiruški), najčešće rezultira ozdravljenjem tkiva njegovom reparacijom, odnosno tkivom koje po građi i funkciji ne odgovara u potpunosti oštećenom tkivu [14]. Regeneracija je proces ozdravljenja koji podrazumeva zamenu tkivnih komponenti na odgovarajućem mestu u odgovarajućoj količini i odgovarajućem međusobnom odnosu [14,155]. Istraživanja na polju regenerativne endodoncije su pokazala da su materijali koji se koriste u regenerativnim procedurama od ključnog značaja za indukciju stem ćelija pulpe i periodontalnog ligamenta, kao i da je interakcija materijala sa ćelijama zavisna od njihovog hemijskog sastava [87]. Stoga je danas najveća pažnja usmerena ka primeni biomaterijala koje pored biokompatibilnosti, odlikuje bioaktivnost i bioinduktivnost, odnosno čija aplikacija

rezultira indukcijom ćelijske diferencijacije i proliferacije sa posledičnom regeneracijom tkiva.

Pored bioloških, biomaterijali treba da poseduju i adekvatna fizička svojstva, slična tkivima koja treba da regenerišu, koja će im obezbediti stabilnost i dugotrajnost na mestu aplikacije [110]. Danas se u oblasti endodontske terapije najintezivnije istražuju dve vrste biomaterijala, materijali na bazi kalcijum silikata i materijali na bazi kalcijum fosfata.

Sredinom devedesetih godina, na tržištu se pojavio nov materijal na bazi kalcijum silikata pod nazivom Mineral trioksid agregat (MTA). Istraživanja su pokazala da se radi o materijalu izražene biokompatibilnosti i superiornog rubnog zaptivanja u odnosu na postojeće konvencionalne endodontske materijale [186]. Pored toga, MTA indukuje formiranje čvrstih zubnih tkiva i regeneraciju periodoncijuma, što je uz dobra fizičko-hemijska svojstva, antimikrobno delovanje i sposobnost vezivanja u vlažnoj sredini omogućilo primenu ovog materijala u brojnim kliničkim indikacijama.

Kliničku primenu MTA otežava znasta konzistencija zamešanog materijala, kratko radno vreme i dugo vreme vezivanja. Dugo vreme vezivanja koje je posledica hemijskog sastava i hidraulične prirode cementa, nosi rizik od ispiranja materijala sa mesta aplikacije i odlaže završetak endodontskog tretmana [141]. U pokušaju da se prevaziđu navedeni problemi, sintetisane su brojne nove formulacije materijala na bazi kalcijum silikata, nalik MTA-u, delimično izmenjenog hemijskog sastava [16, 77, 100, 121]. Međutim, istraživanja su pokazala da izmene u sastavu, mogu negativno uticati na biokompatibilnost [76] i fizička svojstva materijala [16]. Istraživanja čiji je cilj sinteza materijala sličnih fizičkih i bioloških svojstava, ali kraćeg vremena vezivanja još uvek su aktuelna [6, 65, 159]. Istovremeno se ispituju i mogućnosti primene kalcijum silikatnih cemenata u svojstvu silera za opturaciju kanala korena, sa akcentom na unapređenju fluidnosti, a bez narušavanja pozitivnih osobina materijala [17, 33, 82, 142, 161].

Hidroksiapatit je dobro poznata kalcijum fosfatna keramika koju odlikuje biokompatibilnost (odsustvo alergnog potencijala, netoksičnost), biaktivnost i biokonduktivnost [110]. Dobra biološka svojstva omogućila su njegovu široku primenu u reparaciji i rekonstrukciji mukoskeletnog i stomatognatnog sistema [152]. Međutim, porozna struktura hidroksiapatita rezultira neadekvatnim mehaničkim svojstvima i

ograničava njegovu primenu u svojstvu endodontskog cementa. Aktuelna istraživanja su fokusirana na ispitivanja novih formulacija materijala na bazi kalcijum fosfata sa unapređenim fizičkim svojstvima i na mogućnosti njihove primene u oblasti endodontske terapije [40, 42, 44, 89, 118, 135].

Ovo istraživanje je realizovano sa ciljem da se ispituju biološka i fizička svojstva dva novosintetisana biomaterijala na bazi kalcijumsilikatnih sistema i mešavine kalcijumsilikatnih sistema i hidroksiapatita. Materijali su sintetisani nanotehnologijom, odnosno inovativnom kombinacijom hidrotermalne sol-gel metode i metode samosagorevajućih talasa. Primenjenom tehnologijom dobijeni su nanostrukturni materijali koje odlikuje izražena aktivnost čestica i posledično brzo vezivanje [143]. Značajno kraće vreme vezivanja u odnosu na MTA i njemu slične materijale mogla bi biti prednost u uslovima njihove eventualne kliničke primene. Takođe, hemijska priroda materijala i način sinteze bi trebalo da obezbede zadovoljavajuće biološko ponašanje ovih materijala u živim tkivima.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. CEMENTI NA BAZI KALCIJUM SILIKATA

Cementi na bazi kalcijum silikata danas su jedno od najintezivnije istraživanih polja u oblasti biomaterijala. Najpoznatiji i najdetaljnije istraživan, komercijalni, kalcijum silikatni cement je Mineral trioksid agregat (engl. Mineral Trioxide Aggregate, MTA). Materijal je patentiran 1995 godine u Americi pod imenom ProRoot MTA (Denstply, Tulsa, USA), kao endodontski cement namenjen tretmanu jatrogenih perforacija i zatvaranju retrogradnih kaviteta u apeksnoj hirurgiji [181]. Detaljna istraživanja u prethodnih dvadeset godina su ukazala da se radi o biokompatibilnom [186] i bioaktivnom materijalu [165] koji indukuje formiranje čvrstih zubnih tkiva [12, 46] i regeneraciju periodoncijuma [155, 173]. Stoga su njegove indikacije danas proširene i na direktno prekrivanje pulpe [170], pulpotomiju [197] i terapiju zuba sa nezavršenim rastom korena [58].

2.1.1. Hemijski sastav

MTA se sastoji od 50-75% CaO i 15-25% SiO₂. Ove dve komponente zajedno čine 70-95% cementa [181]. Ostatak čine Bi₂O₃ i male količine Al₂O₃, MgO, Fe₂O₃ i dr. Mešanjem pomenutih oksida nastaju trikalcijum silikat, dikalcijum silikat, trikalcijum aluminat i tetrakalcijum aluminoforit. Prema patentu, MTA je derivat Portland cementa tipa 1 (Portland cement, PC), kalcijum silikatnog cementa koji se koristi u građevinskoj industriji. Prah originalnog MTA (ProRoot MTA; Denstply, Tulsa, USA) je zapravo mešavina 75% Portland cementa, 5% kalcijum sulfata (gips) i 20% bizmut oksida [25, 60].

Originalna siva formulacija MTA je 2002 godine delimično izmenjena, uklanjanjem aluminoforitne faze, čime je dobijen beli MTA, estetski prihvatljivija formulacija materijala. Za razliku od sivog MTA, koji se pretežno sastoji od trikalcijum silikata, dikalcijum silikata i bizmut oksida, beli MTA se pretežno sastoji od trikalcijum silikata i bizmut oksida [25].

Čestice sivog MTA su nepravilnog oblika i različite veličine, dok se beli MTA sastoji uglavnom od manjih čestica, takođe nepravilnog oblika. Veličina čestica MTA kreće se u rasponu od 1µm do 30µm, dok se veličina čestica bizmut oksida kreće u rasponu od 10-30µm [25].

Pored ProRoot MTA, danas su razvijeni brojni proizvodi sličnog hemijskog sastava koji su komercijalno dostupni pod različitim imenima. Svi ovi materijali se najčešće nazivaju njihovim generičkim imenom “kalcijum silikatni cementi” ili “hidraulični silikatni cementi.”

Hidratacija

Prah MTA se sastoji od finih hidrofilnih čestica koje se vezuju u prisustvu vlage. Hidratacijom čestica praha nastaje porozni kalcijum silikatni hidratni gel (C-S-H) i kalcijum hidroksid [27]. Hidratacija se odvija prema sledećim reakcijama:



Hidratacijom takođe nastaju monosulfat i etringit. Kalcijum silikatni hidrat je slabo kristalizovan i porozan, a opisuje se kao rigidni koloidni gel koji vremenom očvršćava. Kalcijum hidroksid je glavna solubilna frakcija cementa, zaslužna za visok pH materijala [68]. Neposredno po mešanju, pH vrednost materijala iznosi 10.2 da bi posle 3h dostigla vrednost od 12.5 [182].

Analizom hidratacije kalcijum silikatnog cemenata (PC-a), Camilleri 2007 god. zaključuje da se ovaj process odvija kroz 4 faze. U prvoj fazi (faza preindukcije) koja traje nekoliko minuta, nastupa hidroliza trikalcijum silikata, sa brzim rastvaranjem jona. Kao posledica, na površini čestica cementa se taloži kalcijum silikatni hidrat. U ovoj fazi dolazi do rastvaranja i trikalcijum aluminata koji reaguje sa kalcijumovim i sulfatnim jonima (iz gipsa) sa posledičnim stvaranjem etringita koji se takođe taloži na površini čestica. Zatim sledi druga faza (faza indukcije) koja traje par sati i u kojoj hidratacija napreduje veoma sporo. Silikatni hidrat oko neizreagovalih čestica cementa usporava njihovu dalju hidrataciju što rezultira periodom mirovanja od 1-2 h, u kojoj je cement relativno neaktivan i još uvek plastičan. Takođe, etringit istaložen preko trikalcijum

aluminata, redukuje njegovu reaktivnost. Formiranje kalcijum silikatnog hidratnog gela počinje posle 1h. Inicijalno vezivanje cementa započinje pucanjem kalcijum silikatnog hidrata oko neizreagovanih čestica sa nastavkom procesa hidratacije. U početku, čestice cementa su razdvojene, a glavni produkti hidratacije su kalcijum hidroksid i etringit. Daljom hidratacijom, produkti hidratacije, postepeno ispunjavaju prostore između čestica cementa. Rast kalcijum silikatnog hidrata ka unutrašnjosti cementa, očvršćava cement sa smanjivanjem njegove poroznosti. Treća faza (faza akceleracije) nastupa 3-12h posle mešanja kada se hidratacija ponovo ubrzava i stepen hidratacije trikalcijum silikata raste sa daljim formiranjem kalcijum silikatnog hidratnog gela. U ovoj fazi se u hidrataciju uključuje i dikalcijum silikatna faza. Taloženjem kalcijum hidroksida (portlandit), smanjuje se količina kalcijumovih jona. I na kraju, u četvrtoj fazi (faza postakceleracije), kako se smanjuje količina neizreagovanih čestica, hidratacija se usporava, a stepen hidratacije se kontroliše difuzijom. Kalcijum silikatni hidrat se dalje formira kontinuiranom hidratacijom trikalcijum i dikalcijum silikata. Kako su u ovoj fazi sulfatni joni potrošeni, etringit formiran u ranim fazama hidratacije se konvertuje u monosulfat [27].

Prema Camilleri-u, hidratacija MTA se u izvesnoj meri razlikuje od hidratacije PC-a. U hidratisanom MTA-u glavni produkti hidratacije takođe su kalcijum silikatni hidratni gel i kalcijum hidroksid sa minimalnom količinom etringita i monosulfata. U vezanom cementu detektovane su i brojne neizreagovane (nehidratizane) čestice. Međutim, kako prah MTA sadrži i bizmut oksid, on je detektovan i u hidratisanom MTA-u u vidu neizreagovanog punioca, ali i u sastavu kalcijum silikatnog hidrata. U odnosu na približno 20% bizmut oksida, koliko se nalazi u nevezanom materijalu, u vezanom cementu je detektovano samo 8.4%. Utvrđeno je da bizmut učestvuje u procesu hidratacije MTA, odnosno da ulazi u strukturu kalcijum silikatnog hidratnog gela, odakle se izlučuje zajedno sa kalcijum hidroksidom [27, 28].

Vreme vezivanja

Obzirom na hidrauličnu prirodu cementa, vlaga okolnog tkiva deluje kao aktivator hemijskih reakcija tokom vezivanja materijala. Zahvaljujući tome, kalcijum silikatni cementi se mogu primeniti u kliničkim situacijama gde kontaminacija krvlju i

tkivnim fluidima onemogućava korektnu upotrebu konvencionalnih materijala [73]. Međutim, upravo zbog hemijskog sastava i dugotrajne hidratacije, kalcijum silikatni cementi su sporo vezujući materijali za čije je inicijalno vezivanje potrebno više sati, a reakcija vezivanja se odvija i nedeljama posle mešanja cementa [141, 182]. Inicijalno vreme vezivanja MTA u proseku iznosi 165 ± 5 minuta [182].

Dugo vezivanje materijala nosi rizik od rastvaranja i ispiranja materijala sa mesta aplikacije. Osim toga, usled značaja vlage za hidrataciju i posledično očvršćavanje materijala, preporuka je da se nakon aplikacije, bar u periodu inicijalnog vezivanja, materijalu obezbedi eksterna vlaga koja će omogućiti adekvatnu hidrataciju [146]. Ovakav protokol neminovno odlaže završetak endodontskog tretmana što se, uz dugo vreme vezivanja, smatra glavnim nedostatkom kalcijum silikatnih cemenata. Pored toga, radno vreme MTA je kratko (oko 4 minuta), a zamešani materijal je zrnaste konzistencije (nalik vlažnom pesku), relativno težak za kliničku manipulaciju [141].

U cilju prevazilaženja navedenih problema, poslednjih godina sintetisane su brojne nove formulacije materijala na bazi kalcijum silikata, nalik MTA-u, delimično izmenjenog hemijskog sastava. U daljem tekstu, pregledom literature biće obuhvaćena fizička i biološka svojstva kako osnovne formulacije MTA, tako i novih komercijalnih, odnosno eksperimentalnih materijala nalik MTA-u, sintetisanih u kontrolisanim, laboratorijskim uslovima primenom različitih tehnologija.

2.1.2. Fizička svojstva

U okviru fizičkih svojstava materijala, analizirana je rastvorljivost, poroznost, pritisna čvrstoća i adhezivnost, odnosno jačina veze kalcijum silikatnih cemenata sa dentinom.

2.1.2.1. Rastvorljivost

Rastvorljivost materijala je u direktnoj vezi sa njegovom poroznošću i prema ISO standardu ne bi trebala da iznosi više od 3% mase materijala. Veća poroznost, odnosno rastvorljivost može rezultirati dezintegracijom materijala na mestu njegove aplikacije [51]. Za procenu rastvorljivosti i poroznosti kalcijum silikatnih cemenata najčešće se

koriste standardni testovi objedinjeni u ISO 6876. Ovim testovima, pomenuta svojstva materijala ispituju se merenjem promena mase materijala u vlažnoj sredini [65, 77, 80, 194]. Od nedavno, za procenu rastvorljivosti i poroznosti kalcijum silikata koristi se i mikrokompjuterska tomografija [35].

Hidraulična priroda kalcijum silikatnih cemenata određuje njihovo specifično ponašanje u vlažnoj sredini. Mešanjem kalcijum silikata sa vodom formira se cement specifične strukture izgrađene od mikropora, kapilarnih kanala i zarobljene vode. Jedan deo vode se troši u hemijskim reakcijama tokom procesa vezivanja, dok ostatak vode ostaje zarobljen u porama i kapilarima odakle može difundovati i ispariti tokom ali i posle završetka vezivanja cementa. Voda u očvrslom kalcijum silikatnom cementu se nalazi unutar njegove strukture, saturisana sa kalcijum hidroksidom. Kako je kalcijum hidroksid glavna solubilna frakcija vezanog cementa, voda zarobljena u cementu, oslobađa se sa kalcijum hidroksidom u okolinu. Nakon toga, pore i kapilari cementa apsorbuju svežu vodu, koja se rastvaranjem kalcijum hidroksida ponovo oslobađa. Na taj način voda konstantno difunduje u cement i van njega. Sa oslobađanjem vode, cement gubi na težini. Gubitak težine je privremen jer se pore i kapilari vrlo brzo ponovo ispune vodom i ova sveža voda uzima učešće u sporom hidratacionom procesu cementa, povećavajući njegovu masu. Ovaj osmotski efekat koji se ponavlja je svojstvo karakteristično za kalcijum silikatne cemente. Važno je naglasiti da poroznost i permeabilnost cementa nisu obavezno povezani. Dobro pripremljen cement može imati veliku zapreminu pora a malu permeabilnost [68].

Prema upustu proizvođača, za postizanje optimalnih svojstava MTA, preporučuje se mešanje praha sa vodom u odnosu 3:1. Fridland i Rosado (2003) su utvrdili da veća količina vode upotrebljene za pripremu MTA rezultira većom poroznošću i rastvorljivošću cementa [68]. Da je rastvorljivost MTA direktno zavisna od količine vode upotrebljene za mešanje cementa potvrdili su u nedavnoj studiji Cavenago i sar. (2014), koji su rastvorljivost MTA procenjivali mikrokompjuterskom tomografijom. I u ovom istraživanju je potvrđeno da veća količina vode prilikom pripreme materijala, rezultira većim gubitkom zapremine materijala. Rastvorljivost MTA sa najvećim sadržajem vode (2:1) je bila dva, odnosno tri puta veća u odnosu na druge dve testirane formulacije materijala (3:1,4:1) [35].

Sa kliničkog aspekta, najveći rizik od rastvaranja i posledičnog ispiranja MTA postoji u prvim satima nakon njegove aplikacije i u vezi je sa dugim vremenom vezivanja. Izmenama u sastavu materijala istraživači su pokušali da skrate vreme vezivanja i na taj način prevaziđu ovaj problem. Prilikom sinteze kalcijum silikatnog cementa pod imenom MTA Angelus (Londrina, Brazil), uklonjen je gips i prema specifikaciji vreme vezivanja je značajno kraće u odnosu na ProRoot MTA. Camilleri i sar. (2008) su ispitivali uticaj gipsa, kao i bizmut oksida na vreme vezivanja i poroznost kalcijum silikatnih cementa. Autori su testirali dva eksperimentalna materijala na bazi Portland cementa bez gipsa, prvi bez bizmut oksida (Proto A), i drugi sa bizmut oksidom (Proto B). Navedenim izmenama u sastavu materijala vreme vezivanja cementa je značajno redukovano sa inicijalnih 468 minuta (PC) na 8 minuta kod eksperimentalnog cementa bez gipsa i bez bizmut oksida (Proto A), odnosno 12 minuta kod eksperimentalnog cementa bez gipsa sa bizmut oksidom (Proto B), čime je potvrđeno da cementi bez gipsa odnosno bizmut oksida imaju značajno kraće vreme vezivanja. Izražena apsorpcija vode je uočena kod svih materijala s tim da je najveća apsorpcija zabeležena prvog dana merenja (PC>13%, ProtoA >12% i Proto B>18%), dok se tokom narednih 28 dana eksperimenta nije značajnije menjala. Najviše apsorbovane vode u materijalu kome je dodato rendgen kontrastno sredstvo, autore je navelo da zaključuje da dodavanje bizmut oksida povećava poroznost kalcijum silikatnih cementa i posledičnu apsorpciju vode [30].

U istraživanju Antonijević-a i sar. (2013) potvrđen je negativan uticaj bizmut oksida na poroznost kao i vreme vezivanja kalcijum silikatnog cementa (PC). Alternativna rendgen kontrastna sredstva (ZrO₂ i YbF₃), takođe su povećala poroznost cementa, ali nisu imala negativan uticaj na vreme vezivanja [4].

Nedavno je sintetisan MTA Plus (Prevest Denpro, Jammu City, India za Avalon Biomed Inc. Bradenton, FL, USA), nova komercijalna verzija MTA, kraćeg vremena vezivanja. Od drugih sličnih proizvoda MTA Plus se razlikuje pre svega manjom veličinom čestica. Polovina čestica u ovom materijalu ne prelazi 1µm. Pored toga materijal je dostupan sa dve vrste sredstava za mešanje, vodom i gelom. Gel (polimerna smola) ima ulogu sredstva koje treba da spreči ispiranje materijala sa mesta aplikacije. Formosa i sar. (2013) su posle čuvanja uzoraka materijala tokom 28 dana u veštačkom tkivnom fluidu, zaključili da razlika u apsorpciji tečnosti između dve formulacije MTA Plus-a (prah zamešan sa vodom, odnosno gelom) postoji samo prvog dana merenja, kada

je MTA Plus zamešan sa gelom pokazao manju apsorpciju tečnosti, što ukazuje na inicijalno manje poroznu strukturu ove formulacije cementa. Ipak, posle 28 dana nije bilo značajnih razlika po pitanju poroznosti i rastvorljivosti testiranih formulacija [65].

Gandolfi i sar. (2014) su poroznost i rastvorljivost MTA Plus-a poredili sa ProRoot MTA-om i Dycal-om (Dentsply Caulk, Milford, DE). Obe formulacije MTA Plus-a su pokazale veću poroznost i rastvorljivost od ProRoot MTA. Istovremeno, svi testirani kalcijum silikatni cementi bili su porozniji i rastvorljiviji od Dycal-a [80].

Formosa i sar. (2012) su za kvantitativnu procenu rastvorljivosti, odnosno ispiranja različitih komercijalnih kalcijum silikatnih cemenata materijala (PC, MTA Angelus, MTA Plus) adaptirali CRD-C 661-06 metod, koji se inače koristi za procenu ispiranja sveže zamešanog betona. Najveće ispiranje izmereno je kod MTA Angelus-a (5-10%), zatim PC-a (2-7%). Najbolji rezultati dobijeni su za MTA Plus u kombinaciji sa gelom (-0.9%) [66].

Činjenica da manja veličina čestica praha značajno unapređuje vezivanje cemenata [7], inicirala je sintezu kalcijum silikatnih cemenata sa nano veličinom čestica. Bioagregat (Bioaggregate, Innovative Bioceramics, Vancouver, BC, Canada) je prvi komercijalni nanostrukturni cement, dostupan na tržištu Severne Amerike. Saghiri i sar. (2014) su upoređivali rastvorljivost belog MTA, Bioagregata i nedavno sintetisanog, nano MTA, u zavisnosti od različitih uslova sredine (pH). Nano MTA se pokazao najotpornijim na kiselu sredinu. Istovremeno, kod svih testiranih cementa uočena je izraženija rastvorljivost u kiseljoj u odnosu na neutralnu i baznu sredinu [160].

Sa ciljem da se prevaziđe problem dugog vezivanja i time umanju rizik od rastvaranja i dezintegracije materijala neposredno nakon aplikacije, nedavno je sintetisan svetlosno polimerizujući kalcijum silikatni cement u obliku paste, namenjen direktnom i indirektnom prekrivanju pulpe (TheraCal, Bisco Inc, Schamburg, IL, USA). Glavni sastojci materijala su Portland cement i organske smole (BisGMA i PEGDMA). Gandolfi i sar. (2012) su ispitujući fizičko-hemijska svojstva novog materijala zaključili da je njegova rastvorljivost znatno manja u odnosu na beli ProRoot MTA i Dycal. Ispitujući poroznost cementa, našli su da je TheraCal absorbovao manje vode od ProRoot MTA ali više od Dycal-a. Iako kraće vreme vezivanja umanjuje rizik od rastvaranja i dezintegracije materijala olakšavajući njegovu kliničku primenu, ono može negativno uticati na stepen

hidratacije koja je važna za kompletno vezivanje i očvršćavanje cementa. Ipak, prema rezultatima ove studije i svetlosno polimerizujući kalcijum silikatni cement poseduje određenju sposobnost apsorpcije vode, koja je po mišljenju autora dovoljna za početak hidratacije čestica materijala [77].

U nedavnoj studiji De Souza i sar. (2013), kvantitativnom analizom na mikro CT-u, poroznost novog komercijalnog kalcijum silikatnog cementa pod nazivom Biodentin (Biodentine, Septodont, Saint-Maur-Fossés, France) je upoređivana sa ProRoot MTA-om. Biodentin je trikalcijum silikatni cement sa dodatkom kalcijum karbonata i cirkonijum oksida. Tečnu komponentu čine kalcijum hlorid (akcelerator vezivanja) i voda-redukujući agens, a prema specifikaciji, inicijalno vezivanje materijala iznosi 12 minuta. U ovom istraživanju nisu uočene statistički značajne razlike u pogledu poroznosti Biodentina (7.09%) i ProRoot MTA (6.65%) [51].

2.1.2.2. Pritisna čvrstoća

Hidraulične cemente kakvi su kalcijum silikati, odlikuje mreža mikropora u strukturi cementa koja je neophodna za adekvatnu hidrataciju i posledično očvršćavanje cementa [68]. Porozna struktura materijala, rezultira inicijalno malim vrednostima pritisne čvrstoće MTA (40 MPa), značajno nižim u odnosu na amalgam (312.5 MPa), SuperEBA (60 MPa) i IRM (52.2 MPa) cement. Međutim, u vlažnoj sredini, vrednosti pritisne čvrstoće MTA rastu i posle 21 dana dostižu vrednosti slične SuperEBA i IRM cementima. Porast vrednosti pritisne čvrstoće u vlažnoj sredini se povezuje sa sporijom hidratacijom dikalcijum silikata u odnosu na trikalcijum silikat, zbog čega se maksimalne vrednosti pritisne čvrstoće dostižu tek nekoliko nedelja po mešanju cementa [182].

Prema pisanju Coomaraswamy i sar. (2007) bizmut oksid, rendgen kontrast koji se najčešće nalazi u komercijalnim preparatima MTA, ima štetan uticaj na njegova fizička svojstva, naročito pritisnu čvrstoću. U studiji ovih autora je uočeno da porast koncentracije bizmut oksida u Portland cementu od 0% do 40% rezultira smanjivanjem pritisne čvrstoće cementa sa 82.1 MPa na 28.7 MPa. Po mišljenju ovih autora, dodavanje bizmut oksida rezultira poroznijim cementom sa više neizreagovale vode unutar vezanog cementa što negativno utiče na njegovu čvrstoću [43]. Negativan uticaj bizmut oksida na

pritisnu čvrstoću kalcijum silikatnih cemenata potvrđen je i u istraživanju Camilleri-a (2008) [30].

U nedavnoj studiji Grazziotin-Soares-a i sar. (2014), ispitivan je uticaj bizmut oksida na fizička svojstva belog MTA Angelus-a. Upoređujući materijal sa nekomercijalnom formulacijom istog materijala bez bizmut oksida, utvrdili su da ovaj rendgen kontrast, iako produžava vreme vezivanja i umanjuje mikrotvrdoću, nema negativnog uticaja na pritisnu čvrstoću cementa [84].

Dodatkom kalcijum hlorida, u svojstvu akceleratora vezivanja i metil celuloze, kao sredstva protiv ispiranja cementa, Ber i sar. (2007) su značajno skratili vreme vezivanja PC-a, ali su primetili da pomenute izmene imaju negativne efekte na mehanička svojstva, odnosno pritisnu čvrstoću PC-a [16].

S obzirom na to da je trikalcijum aluminatna faza (Ca_3AlO_2) najreaktivniji deo kalcijum silikatnih cemenata, a da izvorno čini manji deo materijala, dodavanje veće količine trikalcijum aluminata (do 10%), može redukovati vreme vezivanja i istovremeno povećati pritisnu čvrstoću kalcijum silikatnog cementa bez štetnog uticaja na njegovu biokompatibilnost [127].

Pored hemijskog sastava materijala i uslovi sredine (pH) u kojima se cement aplikuje mogu uticati na njegova fizička svojstva. Kayahan i sar. (2009) su ustanovili da izlaganje kiseloj sredini umanjuje pritisnu čvrstoću MTA. Zbog toga su sugerisali da se definitivna restauracija kompozitnim ispunom preko postavljenog MTA, odloži bar 96 h, da bi se omogućilo adekvatno očvršćavanje cementa [114].

Prema pisanju Nekofar i sar. (2007), preveliki pritisak prilikom kondezacije, takođe može negativno uticati na pritisnu čvrstoću MTA. Naime, preveliki pritisak rezultira manje poroznim cementom, što može onemogućiti adekvatnu hidrataciju i posledično rezultirati cementom manje pritisne čvrstoće [139].

2.1.2.3. Marginalna adaptacija / kvalitet rubnog zaptivanja

Kvalitetno rubno zaptivanje odnosno adekvatna marginalna adaptacija materijala treba da onemogući protok tkivnih fluida i posledično bakterijsko mikrocurenje, zbog čega se smatra značajnim faktorom za dugoročan uspeh endodontskog tretmana [186].

Prva testiranja marginalne mikropropustljivosti sivog MTA, testom prodora boje, su ukazala na superiorno zaptivanje MTA u odnosu na amalgam, Super EBA i IRM cement [186].

Peters i Peters (2002) su u svom istraživanju takođe poredili ProRoot MTA i Super EBA cement, ali su kvalitet marginalne adaptacije analizirali SEM-om. Istraživanje je realizovano na ekstrahovanim zubima nakon što su materijali aplikovani u formi apeksnog čepa, a zubi potom okluzalno opterećivani u kompjuterski kontrolisanom stimulatoru, brojem ciklusa ekvivalentnom petogodišnjoj funkciji zuba. Rezultati su ukazali na izrazitu stabilnost oba materijala, obzirom da je kontinuitet marginalne adaptacije očuvan u više od 98% uzoraka isunjenih MTA-om i u više od 93% uzoraka ispunjenih Super EBA cementom. Istovremeno, posle testa opterećenja, autori su primetili porast broja nedovoljno ispunjenih uzoraka MTA-om, što je ukazalo na gubitak dela materijala tokom eksperimenta, ali bez značajnijeg uticaja na marginalnu adaptaciju [149].

Nakon pojave belog ProRoot MTA, Ferris i Baumgartner (2004) su na ekstrahovanim, humanim zubima, poredili njegovu zaptivajuću sposobnost sa sivim ProRoot MTA-om. Metodom bakterijskog curenja, nakon aplikacije materijala u eksperimentalno preparisanim interradiksnim perforacijama, zaptivanje je praćeno tokom 60 dana. Nije bilo razlike u kvalitetu rubnog zaptivanja testiranih formulacija ProRoot MTA, a curenje bakterija je detektovano u malom broju uzoraka kod oba materijala (2/18 uzoraka sivog MTA i 3/18 uzoraka belog MTA), zbog čega su zaključili da obe formulacije odlikuje dobro rubno zaptivanje [64].

Utvrđeno je da sivi MTA ostvaruje kvalitetno rubno zaptivanje i u kavitetima koji su kontaminirani krvlju, kao i da pod takvim okolnostima demonstrira superiornije zaptivanje u odnosu na amalgam, SuperEBA cement i IRM cement [186].

Montellano i sar. (2006) su procenjivali kvalitet zaptivanja belog ProRoot MTA, u kanalima korena kontaminiranim krvlju, slanim rastvorom odnosno pljuvačkom. Nakon aplikacije materijala u formi apikalnog čepa na ekstrahovanim, humanim zubima,

zaptivanje je ispitivano metodom prodora bakterija tokom 30 dana. Dobijeni rezultati su ukazali da kontaminacija kaviteta krvlju ne umanjuje zaptivajuće sposobnosti materijala. Nakon kontaminacije krvlju kao i slanim rastvorom, zaptivanje je bilo slično zaptivanju nekontaminiranih uzoraka (4/15, 6/15, 6/15). U većini uzoraka u kojima je detektovan, prodor bakterija je zabeležen prvog dana nakon aplikacije materijala. Suprotno tome, kontaminacija uzoraka pljuvačkom je rezultirala značajno većim prodorom bakterija (11/15), takođe najvećim delom prvog dana eksperimenta. Autori su prepostavili da su veću propustljivosti MTA u ovoj grupi uzrokovali glikoproteini pljuvačke koji su, s obzirom na svoju veličinu, mogli stvoriti prostore između dentina i MTA u kojima su bakterije mogle preživeti i odakle su kasnije mogle penetrirati kroz ceo sistem kanala korena [137].

De Deus i sar. (2006) su marginalnu propustljivost ProRoot MTA poredili sa Portland cementom i utvrdili da između testiranih materijala nema razlike u pogledu zaptivajućih sposobnosti. Međutim, u ovoj studiji je posle 50 dana evaluacije, prodor bakterija detektovan u više od 50% uzoraka oba materijala [48].

U istraživanju De Deus-a i sar. (2007), kvalitet zaptivanja kalcijum silikatnih cemenata (Portland cement i MTA Angelus) je upoređivan sa novim komercijalnim materijalom na bazi MTA pod nazivom MTA Bio (Angelus, Londrina, Brazil). MTA Bio je laboratorijski sintetisana formulacija, sa ciljem da se dobije materijal bez arsena i olova koji se inače nalaze u krečnjaku koji se koristi za proizvodnju Portland cementa. U ovom istraživanju curenje bakterija je detektovano kod svih uzoraka testiranih materijala i pri tome je bilo veoma varijabilno unutar svakog testiranog materijala [49].

Tobón-Arroyave i sar. (2007) su analizirali mikropropustljivost odnosno kvalitet marginalne adaptacije MTA i cemenata na bazi ZOE (IRM i Super EBA), nakon vezivanja materijala od samo 30 minuta. Pod ovakvim eksperimentalnim uslovima nijedan ispitivani materijal nije u potpunosti onemogućio mikrocurenje, ali su oba cementa na bazi ZOE bila bolja od MTA. Kod MTA mikropropustljivost je detektovana u 100% uzoraka, sa apsorpcijom boje čitavom debljinom materijala. Dobijene rezultate autori su pripisali hidrofilnosti i specifičnoj mikrostrukturi MTA [180].

U studiji na velikom broju ekstrahovanih, humanih zuba, Tsatsas i sar. (2005) su zaptivajuću sposobnost MTA poredili sa materijalima koji se uobičajeno koriste za

zatvaranje furkacionih korenskih perforacija. Nakon kompletno odrađenog endodontskog tretmana i opturacije kanala korena gutaperkom i silerom, za zatvaranje perforacija su korišćeni amalgam, SuperEBA cement, Vitremer, Cavit, AH 26 i MTA. U ovoj studiji je takođe ispitivan značaj barijere od kolagenog matriksa ili trikalcijum fosfata u prevenciji ekstruzije materijala u periradikalarno tkivo. IRM cement i Vitremer su postavljeni preko kolagenog matriksa (Hermacol), dok je AH 26 postavljen preko matriksa od trikalcijum fosfata (BioBase a-pore). Posle 8 meseci, zaptivajuće sposobnosti materijala su procenjene testom prodora boje. Prodor boje je detektovan u svim uzorcima, ali je bio različit kod različitih materijala. Najbolji rezultati su dobijeni u MTA grupi i u grupi Vitremer-a u kombinaciji sa kolagenim matriksom. Najveće mikrocurenje je uočeno u grupi zuba zatvorenih sa AH 26 preko matriksa od trikalcijum fosfata, koji je bio skoro u potpunosti rastvoren. Najizraženija ekstruzija materijala preko rubova kaviteta je uočena kod amalgama [190].

Značaj matriksa u prevenciji ekstruzije materijala u periradikalarno tkivo i njegov uticaj na zaptivanje kalcijum silikatnih materijala su ispitivali Hashem i sar. (2008). Ovi autori su u studiji na ekstrahovanim, humanim molarima poredili kvalitet zaptivanja posle aplikacije sivog ProRoot MTA, sivog MTA Angelus-a i IRM koji su aplikovani u interradiksne furkacije sa ili bez prethodno postavljenog kolagenog matriksa. Kvalitet zaptivanja je praćen metodom prodora boje, a rezultati su očitavani spektrofotometrijski, nakon ekstrakcije boje. Najveći prodor boje je uočen kod IRM cementa. Upoređujući kalcijum silikatne cemente, autori su zaključili da barijera od kolagenog matriksa nije neophodna prilikom upotrebe sivog ProRoot MTA ali da je potrebna pre aplikacije sivog MTA Angelus-a. Dobijene rezultate su objasnili razlikama u hemijskom sastavu materijala i različitom vremenu vezivanja. Za razliku od ProRoot MTA, MTA Angelus ne sadži gips zbog čega mu je vreme vezivanja kraće, što je po ovim autorima moglo sprečiti adekvatnu hidrataciju materijala i njegovu adaptaciju za zidove kaviteta [92].

Parirokh i sar. (2009) su utvrdili da na zaptivajuće sposobnosti MTA značajno utiču i uslovi sredine u koju se materijal aplikuje. Nakon postavke MTA u formi apikalnog čepa na ekstrahovanim humanim zubima, polovina uzoraka je ostavljena u slani rastvor, a druga polovina u fosfatni rastvor, tokom 30 dana. Nakon toga, propustljivost materijala je ispitivana metodom prodora bakterija koji je evaluiran

dnevno, tokom 3 meseca. Uzorci potopljeni u fosfatni rastvor su demonstrirali značajno bolje zaptivanje u odnosu na uzorke potopljene u slani rastvor [145].

Yildirim i sar. (2008) su ispitivali uticaj razmaznog sloja na zaptivajuće sposobnosti MTA. Nakon aplikacije materijala u funkciji apeksnog čepa, zaptivanje je analizirano posle 2, 30 i 180 dana, metodom filtracije fluida. Mikropropustljivost materijala je detektovana u svim vremenskim intervalima, s tim da nakon 2 dana od aplikacije nije bilo razlika u propustljivosti materijala u zavisnosti od prisustva/odsustva razmaznog sloja. Međutim, posle 30 i 180 dana, značajno manje curenje je uočeno kod uzoraka u kojima razmazni sloj nije uklonjen. Dobijene rezultate povezali su sa određenom vlažnošću razmaznog sloja koja je, obzirom na hidrofилnu prirodu materijala, mogla imati pozitivne efekte na adaptaciju materijala za zidove kanala korena [200].

U literaturi se kao jedan od mogućih razloga dobrog rubnog zaptivanja kalcijum silikatnih cemenata navodi i blaga ekspanzija materijala tokom vezivanja u vlažnoj sredini [94, 176]. Mehanizam vezivanja kalcijum silikatnih cemenata se stoga razlikuje od vezivanja većine dentalnih materijala koji tom prilikom podležu kontrakciji.

Storm i sar. (2008) su upoređivali ekspanziju belog i sivog MTA u funkciji vremena, nakon čuvanja materijala u vodi odnosno veštačkom tkivnom fluidu. Utvrdili su da se najizraženija ekspanzija događa u prvih 5 sati od mešanja cementa, kao i da siva formulacija materijala ekspandira značajno više u odnosu na beli MTA ali i PC [176]. Nedavno, Hawley i sar. (2010) su potvrdili nalaze prethodnih autora. Različita ekspanzija belog i sivog MTA, prema mišljenju pomenutih autora, može rezultirati različitom mikropropustljivošću dve formulacije MTA, a što može biti posledica različitog hemijskog sastava materijala [94].

2.1.2.4. Jačina veze sa dentinom

Kvalitetna veza materijala sa zubnim tkivima se smatra jednim od najznačajnijih faktora u dugoročnom uspehu endodontskog tretmana. Adekvatna veza sa zubnim strukturama treba da onemogući mikrocurenje iz apikalnog ili koronarnog pravca i spreči dislokaciju materijala sa mesta aplikacije tokom okluzije ili tokom kondezacije restaurativnog materijala [86].

Veza MTA sa dentinom kanala korena je slabija u odnosu na Amalgam, kompommer (Dyrect AP) i IRM cement (86). Jačina veze MTA sa dentinom raste nakon izlaganja materijala tkivnim tečnostima ali je i pod tim uslovima slabija u odnosu na smolom modifikovani GJC (Vitrebond) i dentin adheziv (Clearfil SE Bond) [104].

Prema podacima iz literature, na jačinu veze kalcijum silikatnih cemenata sa dentinom utiču pre svega uslovi sredine pod kojima se materijal aplikuje. Gancedo-Caravia i Garcia-Barbero (2006) su testom smicanja, ispitivali jačinu veze MTA sa dentinom u funkciji vremena (1, 3, 7, 21 i 28 dana), posle vezivanja materijala u vlažnoj, odnosno suvoj sredini. Na bazi dobijenih rezultata su zaključili da uslovi čuvanja značajno utiču na jačinu veze MTA sa dentinom. Vrednosti dobijene nakon vezivanja uzoraka u suvoj sredini bile su znatno niže, zbog čega su autori sugerisali da je za adekvatnu vezu neophodno obezbediti vlažnu sredinu tokom vezivanja materijala. Uočili su da je u suvoj sredini jačina veze materijala sa dentinom rasla od prvog do 3 dana vezivanja, ali se daljim vezivanjem uzoraka nije menjala. U vlažnoj sredini jačina veze rasla je kako od prvog do trećeg dana, tako i od trećeg do 21 dana vezivanja materijala [71].

U određenim kliničkim indikacijama, kalcijum silikatni cementi se postavljaju u sredinu sa niskim vrednostima pH usled inflamacije tkiva ili prisustva različitih bakterijskih produkata. Stoga su Hashem i Amin (2012) ispitivali uticaj pH sredine na jačinu veze kalcijum silikatnih cemenata sa dentinom (MTA Angelus i Bioagregat). Nakon aplikacije materijala u perforacije u furkaciji višekorenih ekstahovanih humanih zuba, klinički uslovi, koji odgovaraju inflamatornim reakcijama u tkivu, su simulirani čuvanjem uzoraka materijala u sirćetnoj kiselini (pH 5.4). Jačina veze merena je posle 4 odnosno 34 dana i upoređivana sa vrednostima dobijenim nakon čuvanja uzoraka u fosfatanom rastvoru. U grupi uzoraka sa Bioagregatom nije bilo značajnijih promena u jačini veze nakon izlaganja kiseloj sredini. Međutim kako su izmerene vrednosti jačine veze bile veće u MTA grupi u oba ispitivana vremenska intervala, nezavisno od uslova u kojima su se materijali vezivali, zaključeno je da MTA poseduje bolja adhezivna svojstva od Bioagregata [93].

Kalcijum silikatni cementi se, u skladu sa indikacijama, postavljaju pre završenog konvencionalnog endodontskog tretmana, tako da i uticaj kanalnih iriganasa na osobine ovih materijala može biti značajan, naročito ako se koriste pre njihovog definitivnog

vezivanja. Hong i sar. (2010) su jačinu veze ProRoot MTA i ProRoot MTA sa dodatkom 10% CaCl_2 (u svojstvu akceleratora vezivanja) sa dentinom procenjivali testom smicanja, nakon izlaganja materijala 3,5% Natrijum hipohloritu (NaOCl) i 2% Hlorheksidinu (CHX). Uzorci materijala su posle nepotpunog vezivanja (10 minuta), potopljeni u iriganse tokom 30 minuta, nakon čega su isprani i ostavljeni da se vežu još 48h. Uzorci potopljeni u NaOCl su demonstrirali jaču vezu sa dentinom, u odnosu na uzorke potopljene u CHX . Takođe, uzorci potopljeni u NaOCl su ostvarili jaču vezu sa dentinom u odnosu na kontrolne uzorke koji nisu tretirani irigansima, što je naročito bilo izraženo u grupi MTA sa CaCl_2 . Dobijeni rezultati ukazali su da vrsta korišćenog irigansa značajno utiče na jačinu veze, odnosno da alkalna sredina pozitivno utiče na vezu MTA sa dentinom [97].

Uticao irigana na jačinu veze kalcijum silikatnih cemenata sa dentinom kanala korena u metodološki sličnoj studiji, ispitivali su nedavno i Guneser i sar. (2013). Komercijalne kalcijum silikatne cemente (MTA i Biodentin) su poredili sa Amalgamom, IRM-om, Dyract AP (kompomer) i IRM-om. Posle inicijalnog vezivanja materijala (10 minuta), poprečne sekcije korenova su potopljene u 3% NaOCl , 2% CHX , odnosno fiziološki rastvor tokom 30 minuta. Posle 48h vezivanja, testom smicanja, u Biodentin grupi nije uočena zavisnost otpornosti na smicanje od vrste korišćenog irigansa (7 MPa), što je bio slučaj i kod konvencionalnih materijala za zatvaranje korenskih perforacija. Suprotno tome, u MTA grupi uočene su različite vrednosti jačine veze posle potapanja u različite iriganse. Najveće vrednosti su izmerene posle potapanja u fiziološki rastvor a najmanje nakon izlaganja CHX -u. Generalno, najslabija veza sa dentinom uočena je kod MTA. Biodentin je bio sličan IRM-u, dok je najbolje rezultate pokazao Dyract AP. Osim po jačini veze sa dentinom, MTA i Biodentin su se razlikovali i po tipu nastale frakture u uzorcima. U MTA grupi je dominirao adhezivni tip, dok je u Biodentin grupi dominirao kohezivni tip frakture, što su autori su objasnili različitom veličinom čestica testiranih materijala [86].

Obzirom na to da konvencionalni endodontski tretman podrazumeva uklanjanje razmaznog sloja pre definitivne opturacije kanala korena, El-Ma'aita i sar. (2013) su ispitivali uticaj razmaznog sloja na jačinu veze kalcijum silikatnih materijala sa dentinom kanala korena. U studiji realizovanoj na ekstrahovanim humanim zubima, polovina korenova je ispirana na standardan način, NaOCl -om tokom instrumentacije, a zatim

17% EDTA-om tokom 1 minuta na kraju preparacije. U drugoj polovini uzoraka EDTA nije korišćen. Za punjenje kanala korena su korišćeni ProRoot MTA, Biodentin i Harvard MTA. Harvard MTA (Harvard Dental International GmbH, Hoppengarten, Germany) je kapsulirani, kalcijum silikatni cement čije radno vreme iznosi 2 minuta a vreme vezivanja 40 minuta. U kontrolnoj grupi uzoraka kanali su opturirani gutaperkom i AH Plus silerom. Za razliku od kontrolne grupe gde uklanjanje razmaznog sloja nije imalo uticaja na jačinu veze silera sa dentinom, kod svih testiranih kalcijum silikatnih cemenata jačina veze je značajno redukovana posle uklanjanja razmaznog sloja. Na bazi rezultata autori su zaključili da uklanjanje razmaznog sloja rezultira lošijom adaptacijom materijala i posledično slabijom vezom sa dentinom. U ovom istraživanju svi uzorci sa AH Plus silerom i većina uzoraka sa kalcijum silikatnim cemenatima je demonstrirala adhezivnu frakturu [57].

Iacono i sar. (2010) su ispitivali uticaj plastifikatora filosilikata (montmorilonit) na jačinu veze Portland cementa sa dentinom. Filosilikati se dodaju kalcijum silikatnim cementima u cilju poboljšanja dimenzionalne stabilnosti i lakšeg rukovanja materijalima. Jačinu veze Portland cementa sa dodatkom plastifikatora u različitim koncentracijama (1, 2 i 5%) upoređivali su sa ProRoot MTA-om, smolom modifikovanim glas jonomer cementom (Vitrebond) i adhezivom (Clearfil SE Bond). Jačina veze je ispitivana posle imerzije materijala u vodu, odnosno u fosfatni rastvor tokom 30 dana. Zaključili su da tkivni fluidi značajno poboljšavaju mehanička svojstva MTA, ali da negativno utiču na mehanička svojstva PC-a. Uslovi sredine (voda / fosfatni rastvor) nisu imali uticaja na jačinu veze GJC i adheziva sa dentinom, a dobije vrednosti bile su značajno veće u odnosu na MTA i PC bez obzira na uslove čuvanja uzoraka [104].

Atabek i sar. (2012) su ispitivali jačinu veze MTA sa različitim adhezivnim sistemima, kao i uticaj vremena vezivanja MTA (24h, 48h, 72h i 96h) na ostvarenu vezu. Najjača veza izmerena je između MTA i samonagrizajućeg adhezivnog sistema. Duže vezivanje MTA rezultiralo je jačom vezom sa svim testiranim adhezivnim sistemima, zbog čega su autori sugerisali da se definitivna restauracija preko kalcijum silikatnih cemenata realizuje tek nakon što oni dostignu optimalna fizička svojstva, najranije 96h posle mešanja, odnosno aplikacije [9].

Formosa i sar. (2013) su ispitivali jačinu veze različitih formulacija MTA Plus-a sa dentinom kanala korena. Sekcije korenova debljine 3 mm, napunjene MTA Plus-om

zamešanim sa vodom, gelom i sa hemijski (Superbond C&B) odnosno svetlosno polimerizujućim smolama (Heliobond) su potopljene u veštački tkivni fluid, Henkov rastvor (engl. Hank's Balanced Salt Solution, HBSS) i inkubirane na 37°C. Posle 28 dana, najveće vrednosti su izmerene kod MTA zamešanog sa svetlosno polimerizujućom smolom (11.0 MPa). Ostale testirane formulacije MTA pokazale su otpornost na smicanje komparabilnu sa kontrolnim MTA-om zamešanim sa vodom (4.3 MPa). U grupi uzoraka MTA zamešanog sa hemijski polimerizujućom smolom dominirala je adhezivna fraktura na spoju materijala i dentina. Kod ostalih testiranih formulacija, u najvećem broju slučajeva su zabeležene mešovite i kohezivne frakture na spoju materijala i dentina, odnosno unutar samog materijala [67].

Shahi i sar. (2012) su utvrdili da način mešanja materijala nema uticaja na jačinu veze belog MTA Angelus-a sa dentinom kanala korena. Zamešan na tri različita načina, konvencionalno, ultrazvukom i u amalgamatoru, materijal je imao sličnu jačinu veze sa dentinom [168].

2.1.3. Biološka svojstva

Biološka svojstva kalcijum silikatnih cemenata ispitivana su analizom biokompatibilnosti (testovima citotoksičnosti, genotoksičnosti, subkutanom i intaosealnom implantacijom), testovima primene (engl. usage test), kao i ispitivanjem bioaktivnosti i bioinduktivnosti materijala.

2.1.3.1. Citotoksičnost

Obzirom na to da se kalcijum silikatni cementi prema indikacijama postavljaju u neposredan kontakt sa periodontalnim tkivom, njihova biokompatibilnost je bila predmet brojnih istraživanja. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti materijala predstavlja prvi korak u oceni njegove biokompatibilnosti i definiše se kao uticaj materijala na preživljavanje ćelija u kulturi [151]. Citotoksičnost kalcijum silikatnih cemenata je ispitivana testovima propustljivosti u kojima se prati integritet ćelijske membrane [183], morfološkim analizama u kojima se prate promene u ćelijskom citoskeletonu odnosno na površini ćelija [81, 148,] i funkcionalnim testovima u kojima se procenjuju anaboličke aktivnosti ćelija

[47, 50, 112, 134]. Dosadašnja ispitivanja su realizovana na permanentnim [40, 134, 162, 183] ili primarnim ćelijskim linijama [166], nakon direktnog kontakta ćelija sa materijalima [53, 76] ili indirektnog kontakta sa njihovim izlučcima [81, 99, 174].

Prvo ispitivanje citotoksičnosti MTA (ProRoot MTA) realizovali su Torabinejad i sar. (1995) kada su njegovu toksičnost poredili sa konvencionalnim materijalima za zatvaranje vrha korena zuba nakon apeksne hirurgije. Citotoksičnost sveže zamešanog i vezanog (24h) MTA je testirana na fibroblastima miša L-929, primenom dva testa citotoksičnosti. Agar Overlay metod je ukazao da je MTA toksičniji od amalgama, ali manje toksičan od IRM i Super EBA cementa. Merenjem oslobođenog radioaktivnog hroma dobijeni su nešto drugačiji rezultati, MTA je bio manje toksičan od amalgama, dok su oba materijala bila značajno manje toksična od Super EBA i IRM cementa. U ovom istraživanju nije uočena razlika u toksičnosti između svežeg i vezanog MTA, zbog čega su autori pretpostavili da materijal može sadržati toksične supstance, i da se one mogu izlučiti, kako iz svežeg, tako i iz vezanog materijala [183].

Keiser i sar. (2000) su toksičnost MTA poredili sa Super EBA cementom i amalgamom, MTT testom, na humanim fibroblastima periodontalnog ligamenta. U ovoj studiji, MTA je bio manje toksičan od amalgama i Super EBA cementa i u sveže zamešanom i u vezanom (24h) stanju [115].

Rezultati prethodnih studija odnose se na toksičnost sive formulacije MTA, obzirom da je beli MTA na tržištu od 2002 godine. Toksičnost sivog i belog MTA (ProRoot MTA, Dentsply, Tulsa, USA) upoređivana je u studiji Pérez i sar. (2003), na primarnim osteoblastima kalvarije miša i MG-63 ćelijama osteosarkoma. SEM analiza morfologije i adhezije ćelija za ispitivane materijale je ukazala na izvesne razlike u toksičnosti testiranih formulacija. Za razliku od sivog ProRoot MTA za koga su dobro adherirale obe vrste ćelija, primarni osteoblasti nisu preživeli na površini belog MTA. Dobijene rezultate autori su pripisali različitoj hrapavosti površine materijala, odnosno razlikama u njihovom hemijskom sastavu [148].

S obzirom na to da je MTA derivat Portland cementa (PC), Saidon i sar. (2003) su poredili ova dva materijala i zaključili da nema razlike u njihovoj toksičnosti, ali su primetili da je duže vezivanje (14 dana) rezultiralo manjom toksičnošću oba materijala [162]. O manjoj toksičnosti kalcijum silikatnih cemenata posle dužeg vezivanja, kasnije

su pisali i drugi autori, smatrajući da duže vezivanje rezultira slabijim izluživanjem jona iz materijala [128, 166].

De Deus i sar. (2005) su poredili citotoksičnost dve komercijalne vrste MTA, ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa, OK) i MTA Angelus (Londrina, Brazil) sa Portland cementom. Hemijski sastav ovih materijala je vrlo sličan, s tim što MTA Angelus ne sadrži gips. Citotoksičnost izlužaka materijala je ispitivana na humanim endotelijalnim ćelijama ECV 304, MTT testom. Nisu uočene razlike u pogledu toksičnosti testiranih komercijalnih preparata MTA, kao ni između komercijalnih preparata i Portland cementa. Prema pisanju autora, 24-časovni izlušci svih materijala bili su značajno toksičniji u odnosu na kontrolnu grupu. Nakon dužeg izluživanja materijala (72h) nisu uočeni toksični efekti već je zapažena proliferacija ćelija, pa su autori zaključili da testirani materijali pokazuju samo inicijalnu toksičnost, koju su pripisali visokim pH vrednostima ispitivanih materijala [47].

Suprotno rezultatima prethodne studije, Karimjee i sar. (2006), su nakon ispitivanja toksičnosti MTA, MTT i LDH testom, na ćelijama periodontalnog ligamenta, pisali o porastu toksičnosti posle dužeg izluživanja materijala [112]. O porastu toksičnosti MTA u funkciji vremena izluživanja, takođe su pisali su i Koulaouzidou i sar. (2008). Ovi autori su poredili toksičnost ProRoot MTA i MTA Angelus-a sa cementom na bazi ZOE (Super EBA) i smolom modifikovanim glas jonomer cementom (Vitrebond, 3M ESPE, USA). Toksičnost materijala su testirali XTT testom, posle direktnog kontakta materijala sa MRC-5 fibroblastima pluća i ćelijama pulpe pacova. Uočena je izražena redukcija preživljavanja ćelija posle dužeg (72h) kontakta ćelija sa materijalima. Ni u ovom istraživanju nisu uočene razlike u toksičnosti različitih komercijalnih preparata MTA (ProRoot MTA i MTA Angelus), pri čemu su oba kalcijum silikatna cementa bila manje toksična od Super EBA cementa i Vitrebond-a [123].

Modareszadeh i sar. (2011) su toksičnost izlužaka ProRoot MTA pratili tokom 21 dana, proveravajući efekte različitih koncentracija izlužaka, na L-929 fibroblastima. Pored inicijalne toksičnosti (24h) nerazblaženih (100%) i razblaženih (50%) izlužaka, uočena je i prolongirana toksičnost ProRoot MTA. Naime izražena redukcija ćelija uočena je i posle izlaganja nerazblaženim 14-dnevnim izlušcima MTA. Suprotno tome, izlaganje 21-dnevnim izlušcima materijala nije rezultiralo redukcijom već naprotiv,

proliferacijom ćelija u kulturi, zbog čega su autori pretpostavili da je toksičan efekat MTA vremenski ograničen [134].

Pored visokog pH [47], toksičnost MTA se najčešće pripisuje bizmut oksidu, koji čini 20% praha komercijalnih preparata [25]. Gomes Cornélio i sar. (2011) su toksičnost originalnog Portland cementa (PC) bez rendgen kontrasta i modifikovanog sa 20% različitih rendgen kontrasta (bizmut oksid, cirkonijum oksid i kalcijum tungstat), testirali na fibroblastima periodontalnog ligamenta i osteoblastima ROS 17/2.8. Na osnovu rezultata MTT testa i morfološke analize ćelija na svetlosnom mikroskopu, zaključili su da čist PC ne deluje toksično čak ni u visokoj koncentraciji materijala (100 mg/ml). Dodavanje rendgen kontrastnih sredstava, imalo je za posledicu redukciju preživljavanja ćelija u meri zavisnoj od koncentracije cementa. Tako je u koncentracijama od ≥ 100 mg/ml, PC ispoljio toksičnost u kombinaciji sa svim testiranim rendgen kontrastima. U nižim koncentracijama (≤ 10 mg/ml), PC nije redukovao preživljavanje ćelija u kulturi, bez obzira na vrstu rendgen kontrastnog sredstva [81].

Obzirom na dugo vreme vezivanja i teškoće u manipulaciji sa kalcijum silikatnim materijalima, pokušano je da se dodavanjem različitih aditiva odnosno akceleratora vezivanja, pomenuti problem prevaziđe. Tako su Ding i sar. (2008) dodavanjem Na_2HPO_4 prahu MTA, skratili vreme vezivanja materijala na 38 minuta. Toksičnost ove formulacije materijala su proveravali posle direktnog kontakta sa L929 ćelijama, tokom 1 i 7 dana. MTT test je pokazao da nema razlike u preživljavanju ćelija između modifikovane i originalne formulacije MTA. Preživljavanje ćelija iznosilo je više od 90% u odnosu na kontrolu u oba ispitivana termina, a SEM analiza je ukazala na dobro prijanjanje ćelija uz oba tipa materijala [53]. Takođe, prema podacima iz literature, dodavanje 5% CaCl_2 , tečnog K-Y i 2% lidokaina nema negativne efekte na biokompatibilnost svežeg i vezanog, belog i sivog MTA. Suprotno tome, dodavanje 3% NaOCl gela, rezultira porastom toksičnosti obe formulacije sveže zamešanog MTA [108].

Gandolfi i sar. (2011) su u cilju prevazilaženja problema dugog vezivanja MTA, sintetisali smolom modifikovani, svetlosnopolimerizujući, MTA (Lc MTA). Za dobijanje Lc MTA, prah kalcijum silikatnog cementa su mešali sa tečnošću koju su činili HEMA, TEGMA, kamforhinon i dimetilaminobenzoat (EDMAB). Citotoksičnost Lc MTA su poredili sa belim ProRoot MTA i smolom modifikovanim glas jonomer cementom (Vitrebond) i to posle indirektnog (testiranjem 1-dnevnih i 3-dnevnih izlužaka

materijala) i direktnog kontakta ćelija sa materijalima (1, 3 i 7 dana) primenom Alamar blu i NR testa. Posle kraćeg izluživanja (24h), Lc-MTA i ProRoot MTA su pokazali sličnu toksičnost, dok je Vitrebond bio toksičniji. Dužim izluživanjem, toksičnost Lc MTA je rasla i bila je slična Vitrebondu, i značajno veća u odnosu na ProRoot MTA. Slično tome, posle kraćeg direktnog kontakta sa ćelijama, toksičnost Lc MTA i ProRoot MTA je bila slična, ali je posle kontakta sa ćelijama tokom 7 dana, Lc MTA bio toksičniji od ProRoot MTA [76].

2.1.3.2. Bioaktivnost

U zavisnosti od tkivnog odgovora koji izazivaju, materijali se mogu klasifikovati kao hemijski inertni, bioresorptivni i bioaktivni [26]. Bioaktivnost podrazumeva sposobnost materijala da izazove pozitivni, biološki odgovor na mestu kontakta sa tkivom, sa formiranjem veze između tkiva i materijala, hemijskom reakcijom materijala sa tkivnim fluidima [74].

Dobro je poznato da u kontaktu sa tkivnim fluidima, kalcijum silikatni cementi talože hidroksiapatit na svojoj površini [165, 73, 145, 36, 74]. O stvaranju belog precipitata na površini MTA, posle njegovog potapanja u veštački tkivni fluid, prvi su pisali Sarkar i sar. (2005). XRD analizom su utvrdili da se radi o kristalima hidroksiapatita, na osnovu čega su zaključili da MTA nije inertan već bioaktivan materijal. Ovi autori su sugerisali da su dobra svojstva MTA, pre svega dobro rubno zaptivanje, biokompatibilnost i bioinduktivnost, upravo posledica stvaranja hidroksiapatita na površini materijala [165].

Ispitujući brzinu stvaranja hidroksiapatita na površini MTA, Gandolfi i sar. (2010) su uočili da se potapanjem MTA u fosfatni rastvor morfologija i hemijski sastav materijala rapidno modifikuju. Budući da su kristale apatita na površini MTA uočili već posle 5 sati, zaključili su da se radi o materijalu izražene bioaktivnosti. Takođe su primetili da starenjem materijala sloj apatita na njegovoj površini postaje deblji i homogeniji [74].

Kao što je ranije napomenuto, hidratacijom kalcijum silikatnih materijala, nastaje kalcijum silikatni hidratni gel (CSH) i kalcijum hidroksid [27], glavna solubilna frakcija cementa koja sa rastvara na Ca^{2+} i OH^- jone [68]. Prema Sarkaru i sar. (2005), reakcija

oslobođenog kalcijuma sa fosfatima iz tkivnih fluida predstavlja fizičko-hemijsku osnovu bioaktivnosti kalcijum silikatnih materijala [165]. Kasnije je utvrđeno da formiranje apatitnog sloja na površini materijala nije posledica samo oslobađanja kalcijuma, već i formiranja Si-OH grupa na površini cementa koje se ponašaju kao centri nukleacije i precipitacije apatita. Shodno tome, za brzu precipitaciju apatita odgovorno je sinergističko delovanje kalcijum silikatnog hidratnog gela kao nukleatora apatita i kalcijuma iz rastvorenog kalcijum hidroksida kao akceleratora precipitacije. Dodatno, hidrofilni substrat, usled prisustva OH- grupa na površini cementa, olakšava vezu sa apatitnim slojem [73]. Formiranje apatita na površini kalcijum silikata zapravo prolazi kroz nekoliko faza. Na površini materijala se najpre formira amorfni kalcijum fosfat, koji se zatim transformiše u apatit, koji kasnije sazreva u karbonatni apatit tipa B, koji predstavlja biološku fazu hidroksiapatita kosti, cementa i dentina.

Han i Okiji (2011) u studiji na ekstrahovanim zubima, su uočili da osim što se talože na površini kalcijum silikatnih materijala, mineralni kristali prodiru i u dentinske kanaliće [90]. Ovi prstoliki mineralni produžeci doprinose adhezivnosti materijala i omogućavaju jonsku razmenu između materijala i zubnog tkiva. Upijanje Ca i Si od strane dentina može rezultirati hemijskom i strukturalnom modifikacijom dentina sa posledično većom jačinom i otpornošću na kiseline [91].

Atmeh i sar. (2012) su analizirajući međuspoj dentina i kalcijum silikatnog cementa (Biodentin) SEM-om i micro-Raman spektroskopijom, takođe uočili formiranje prstolikih struktura duž međuspoja, i ovu zonu nazvali “mineralna infiltraciona zona”. Mišljenja su da kaustični efekat alkalnih produkata hidratacije cementa degradira kolagenu komponentu dentina, sa posledično poroznijom strukturom koja olakšava propuštanje veće količine jona, a što vodi većoj mineralizaciji ovog regiona [10].

2.1.3.3. Bioinduktivnost

Po svojoj biokompatibilnosti, bioaktivnosti i zaptivajućim svojstvima kalcijum silikatni cementi su superiorni u odnosu na većinu do danas poznatih, endodontskih materijala. Činjenica da poseduju snažan induktivni potencijal za regeneraciju oštećenih tkiva doprinela je da se ovi cementi danas smatraju materijalima izbora za brojne kliničke indikacije.

Direktno prekrivanje pulpe

Direktno prekrivanje pulpe (DPP) podrazumeva tretman zubne pulpe (ekspozirane traumom ili akcidentalnim otvaranjem prilikom uklanjanja karijesa dentina), sa ciljem očuvanja vitaliteta zuba. Tretman bazira na zatvaranju rane boaktivnim materijalom koji pospešuje ozdravljenje pulpe sa formiranjem reparatornog dentina (tzv. dentinskog mosta) na mestu povrede [189].

Ozdravljenje pulpe podrazumeva migraciju stem/progenitor ćelija pulpe do mesta povrede i njihovu proliferaciju i diferencijaciju u ćelije nalik odontoblastima. Ove ćelije sekretuju matriks tercijskog dentina, sa posledičnim formiranjem reparatornog dentinskog mosta [189]. Reparatorna dentinogeneza zapravo počinje formiranjem fibrodentinskog matriksa koji je atubularne i/ili iregularne građe sa prisutnim kuboidalnim ćelijama. Kasnije, ćelije nalik odontoblastima sekretuju tubularni matriks nalik dentinu [141]. Tokom formiranja reparatornog dentina, ove ćelije mogu ostati zarobljene u njemu, pa tada reparatorni dentin ima strukturu osteodentina (nalik kosti). Reparatorni dentin regularne, tubularne građe i bez inkulzije ćelija se opisuje kao pravi dentin [103].

Uspeh DPP zavisi od veličine i etiologije povrede (traumatska, mehanička, karijesna), prisustva/odsustva bakterijske infekcije, odnosno materijala koji se koriste za prekrivanje pulpe i koronarnu restauraciju [141]. Materijali koji se koriste za DPP treba da su biokompatibilni, da obezbeđuju dobro rubno zaptivanje i da imaju sposobnost indukcije reparatorne dentinogeneze.

DPP se tradicionalno izvodi preparatima na bazi kalcijum hidroksida. Aplikacija kalcijum hidroksida na ekspoziranu pulpu, inicijalno dovodi do površne nekroze i inflamacije tkiva, usled visokog pH materijala. Inflamacija se povlači već tokom prve nedelje, a kalcijum hidroksid (kao i oštećenje tkiva) stimuliše migraciju prekursornih ćelija i njihovu diferencijaciju u sekretorne ćelije nalik odontoblastima. Depozicija fibrodentinskog matriksa se uočava posle 1-2 nedelje, dok se posle 4 nedelje uočava tkivo nalik dentinu, tubularne strukture sa originalnim izgledom pulpo-dentinske granice [164].

Iako se kalcijum hidroksid za DPP zuba koristi dugi niz godina, istraživanja su ukazala na određene nedostatke ovog materijala. Dentinski most indukovani aplikacijom

kalcijum hidroksida je uglavnom porozne strukture sa tunelskim defektima, što uz manjak adhezivnosti i rastvaranje materijala tokom vremena nosi rizik od mikrocurenja i posledične bakterijske kontaminacije zubne pulpe [15, 164].

Kalcijum silikatni cementi imaju nekoliko prednosti u odnosu na kalcijum hidroksid. Pre svega dobro rubno zaptivanje, niži stepen rastvorljivosti i veću strukturalnu stabilnost materijala [141], zbog čega se odnedavno ispituju mogućnosti njihove primene kao sredstva za DPP.

Obzirom na to da je reparatorna dentinogeneza serija procesa koja započinje indukcijom stem ćelija pulpe na diferencijaciju u ćelije nalik odontoblastima, induktivna sposobnost materijala se može pratiti ekspresijom određenih proteina (biohemijskih markera mineralizacije), karakterističnih za fenotipove određenih ćelija. Prema pisanju Min i sar. (2007), Portland cement indukuje ekspresiju osteonektina (nekolageni protein kosti i dentina) i dentin sijaloproteina (regulator mineralizacije reparatornog dentina i specifični marker odontoblastnog fenotipa) u humanim ćelijama pulpe, odnosno poseduje sposobnost indukcije mineralizacije, zbog čega se može koristiti za DPP [132].

Hwang i sar. (2008) su ispitivali strukturu reparatornog dentina posle prekrivanja zubnih pulpi pacova ProRoot MTA-om. Praćenjem ekspresije koštanog sijaloproteina (glavna komponenta ekscelularnog matriksa kosti koga proizvode osteoblasti) i dentin sijaloproteina (koga proizvode odontoblasti), autori su zaključili da je reparatorni dentin imao i dentogene i osteogene karakteristike. U ovom istraživanju je takođe potvrđeno da TGF- β 1 faktori rasta (engl. Transforming Growth Factor- β 1) stimulišu ekspresiju koštanog sijaloproteina u humanim ćelijama pulpe [103].

U sličnoj studiji na pacovima, Tran i sar. (2012) su ispitivali ekspresiju dentin sijaloproteina (DSPP) i osteopontina. Analizom ekspresije pomenutih proteina i histološkom analizom tkiva, poredili su dentinogene efekte dva kalcijum silikatna cementa (ProRoot MTA i Biodentin) sa kalcijum hidroksidom. U uzorcima sa kalcijum silikatnim cementima, posle 7 dana su uočili proliferaciju ćelija i formiranje mineralizovanih fokusa, a posle 14, odnosno 30 dana formiranje homogenog dentinskog mosta. S obzirom na ekspresiju dentin sijaloproteina i polarizovani oblik ćelija, autori su sugerisali da su dentinski most sekretovale ćelije odontoblastnog fenotipa. Posle

aplikacije kalcijum hidroksida, reparativno tkivo je bilo porozne strukture sa mnogobrojnim ćelijskim inkluzijama [189].

Ko i sar. (2010) su ispitivali uticaj koštanog morfogenetskog proteina-2 (BMP-2) na dentinogeni potencijal ProRoot MTA. BMP-2 je član TGF- β porodice, faktor rasta koji indukuje osteogenu diferencijaciju mezenhimalnih ćelija. Posle DPP pulpi pacova, uočena je regresija inflamacije u funkciji vremena, ali bez značajnijih razlika između čistog MTA i MTA u kombinaciji sa BMP-2. Posle 7 nedelja, uočeno je stvaranje skoro kompletnog dentinskog mosta u većini uzoraka, a novostvoreno tkivo je okarakterisano kao osteodentin [119].

U studiji na zubima pasa, Parirokh i sar. (2005), su poredili efikasnost belog i sivog MTA. Stvaranje kalcifikovanog tkiva je u pojedinim uzorcima, primećeno već posle 7 dana, dok je posle dve nedelje kalcifikovano tkivo uočeno u svim uzorcima u grupi belog MTA i u većini uzoraka u grupi sivog MTA. Blaga inflamacija tkiva uz materijal nestala je posle dve nedelje, bez značajnih razlika između belog i sivog materijala [144]. Dentinogeni efekat MTA, na zubima pasa, potvrđen je kasnije i u istraživanjima drugih autora [61, 192].

Indukcija dentinogeneze nakon aplikacije kalcijum silikatnih cemenata potvrđena je i u kliničkim studijama. Min i sar. (2008) su u studiji na trećim molarima, poredili stanje pulpnog tkiva nakon DPP sa ProRoot MTA-om i kalcijum hidroksidom (Dycal; Dentsply-Clauk, Milford, DE). Nakon dva meseca, zubi su ekstrahovani, a histološkom analizom praćeni su intezitet inflamacije i prisustvo dentinskog mosta. Po pitanju inflamacije nije bilo razlike između ispitivanih materijala i u većini uzoraka, prisutna inflamatorna reakcija je okarakterisana kao blaga. Dentinski most je uočen u svim zubima prekrivenim MTA i u 60% zuba prekrivenih kalcijum hidroksidom. Ekspresija dentin sijaloproteina takođe je bila izraženija u MTA grupi, zbog čega su autori zaključili da je MTA efikasniji u indukciji dentinogenih procesa od kalcijum hidroksida [133].

U studiji Accorinte i sar. (2008), realizovanoj na humanim premolarima, nisu uočene značajnije razlike u induktivnom potencijalu MTA i praha kalcijum hidroksida. Zubi su ekstrahovani i histološki analizirani posle 30 odnosno 60 dana, a dobijeni rezultati su ukazali na dobar odgovor pulpe sa formiranjem dentinskog mosta i minimalnim inflamatornim infiltratom kod oba ispitivana materijala. Posle 30 dana debljina mosta je

bila veća u MTA grupi, ukazujući na brže formiranje dentinskog mosta. Međutim, posle 60 dana nije bilo razlike u pogledu debljine mosta između MTA i praha kalcijum hidroksida [1].

Zarrabi i sar. (2010) su ispitivali odgovor pulpe humanih zuba, nakon DPP sa MTA-om i novim endodontskim kalcijum silikatnim cementom (NEC), posle 2, odnosno 8 nedelja od DPP-a. Novi cement se, osim po bržem vezivanju, razlikuje od MTA i po svom hemijskom sastavu. U sastavu ovog materijala nalazi se više kalcijumovih jedinjenja; kalcijum oksid, kalcijum fosfat, kalcijum karbonat, kalcijum silikat, kalcijum sulfat i kalcijum hlorid. NEC je pokazao manju inflamaciju i deblji dentinski most u poređenju sa MTA-om u oba vremenska intervala. Po mišljenju autora, više kalcijumovih i fosfatnih jona u NEC-u koji učestvuju u stvaranju hidroksiapatita, prirodnog produkta ćelija pulpe, su mogli biti razlog njegove izraženije biokompatibilnosti [202].

Shahravan i sar. (2011) su ispitivali da li izmene u odnosu vode i praha prilikom mešanja materijala (0.28, 0.33, 0.40) imaju uticaja na dentogene efekte materijala. Procedura DPP je sprovedena na humanim trećim molarima, koji su posle 30 dana ekstrahovani, nakon čega su preparati tkiva histološki analizirani u pogledu inteziteta i tipa inflamacije, prisustva nekroze, odnosno kontinuiteta, morfologije i debljine kalcifikovanog mosta. Nisu uočene značajne razlike u testiranim formulacijama MTA ni po jednom praćenom parametru. Blaga inflamacija je uočena kod ukupno 6 uzoraka, dok je nekroza viđena u samo jednom uzorku. Od 27 uzoraka u kojima je uočeno formiranje mosta, kompletan most je bio formiran kod 11 uzoraka [170].

Benoist i sar. (2012) su u kliničkoj studiji, ProRoot MTA koristili za indirektno prekrivanje pulpe (IPP) i dobijene rezultate poredili sa kalcijum hidroksidom (Dycal). Efikasnost materijala je evaluirana merenjem debljine dentina na digitalnim radiografijama, posle 3 i 6 meseci. Posle tri meseca, terapija je ocenjena kao uspešna (očuvan vitalitet zuba) u 93.1 % zuba u MTA grupi, i 73.3% zuba u kalcijum hidroksid grupi. Posle 6 meseci, procenat uspeha u MTA grupi je iznosio 89.6%, dok je kod kalcijum hidroksida ostao nepromenjen. Na bazi rezultata autori su zaključili da su prva tri meseca od IPP najkritičnija za uspeh tretmana. U njihovom istraživanju, most se inicijalno sporije formirao kod MTA, ali posle 6 meseci nije bilo značajne razlike u debljini mosta između ispitivanih materijala. Takođe su primetili da je debljina mosta kod oba materijala posle 6 meseci bila dva puta veća nego posle 3 meseca [15].

Zatvaranje vrha korena nakon apeksne hirurgije

Ozdravljenje tkiva posle apeksne hirurgije podrazumeva regeneraciju apikalnog pripojnog aparata (dentoalveolarno ozdravljenje) i reparaciju kosti (alveolarno ozdravljenje). Osnovni korak u dentoalveolarnom ozdravljenju je depozicija cementa preko resećiranog kraja korena zuba. Mehanizam dentoalveolarnog ozdravljenja nije potpuno jasan ali se pretpostavlja da nediferencirane mezenhimalne ćelije, fibroblasti i ćelije nalik fibroblastima poreklom iz periodontalnog ligamenta i kosti, okružuju vrh korena [12]. Ove ćelije se transformišu u zrele fibroblaste, cementoblaste i osteoblaste i počinju sa obnavljanjem apikalnog dentoalveolarnog aparata. Pod alveolarnim ozdravljenjem se podrazumeva regeneracija koštanog tkiva oko vrha korena. Pretpostavlja se da regeneracija počinje zamenom krvnog ugruška granulacionim tkivom poreklom od endostealnog tkiva. Alveolarno ozdravljenje progredira ka spoljašnjoj površini koštane rane, sa formiranjem potke kosti posle 14 dana, a zatim i funkcionalnog periosta posle 28 dana od intervencije [5].

U tom smislu, regeneracija tkiva posle periradikularne hirurgije, podrazumeva reformiranje kosti na mestu hirurške intervencije, uz potpuno rekonstituisan periodontalni ligament (ćelije i vlakna), koji je pripojen za novoformirani cement preko resećiranog kraja korena i materijala za zatvaranje vrha korena [155].

Materijal koji se koristi za zatvaranje vrha korena treba da je biokompatibilan, rendgen kontrastan, da poseduje dobra zaptivajuća i antimikroba svojstva, da je jednostavan za rukovanje i da ima adekvatno radno vreme [179]. Do sada su za zatvaranje vrha korena nakon apikalne hirurgije korišćeni amalgam, glas jonomer cementi, cementi na bazi ZOE (IRM i EBA) i gutaperka. Amalgam se svakako najduže primenjuje sa relativno visokim kliničkim uspehom. Pod kliničkim uspehom se podrazumeva odsustvo simptoma i razumno radiografsko ozdravljenje, koje se može postići i u prisustvu inflamacije, koja je česta nakon aplikacije amalgama. Potpuna regeneracija periradikularnog tkiva nije viđena ni sa jednim od pomenutih materijala.

Kalcijum silikatni cementi su predloženi za zatvaranje vrha korena nakon apikalne hirurgije zbog biokompatibilnosti, dobrog rubnog zaptivanja i hidrofилности [186]. Kako vlaga okolnog tkiva deluje kao aktivator hemijskih reakcija tokom vezivanja kalcijum

silikatnih cemenata, oni se mogu primeniti i u ovim kliničkim situacijama gde kontaminacija krvlju i tkivnim fluidima onemogućava korektnu upotrebu konvencionalnih materijala / cemenata [73].

Torabinejad i sar. su prvi uočili da aplikacija MTA kao apeksnog čepa nakon apikalne hirurgije podstiče regeneraciju tkiva [186]. Naime, autori su u studijama na zubima pasa i majmuna uočili jedinstveno zarastanje uz MTA koje se manifestovalo regeneracijom periapikalnog tkiva, uključujući apikalnu cementogenezu. Istraživanja koja su usledila potvrdila su ove nalaze. Baek i sar. (2005) su u petomesečnoj studiji na zubima pasa posle aplikacije Amalgama, Super EBA cementa i MTA, najbolji tkivni odgovor uočili nakon aplikacije MTA. Osim minimalne inflamacije u tkivu neposredno uz materijal, i ovi autori su uočili depoziciju cementa preko MTA. Suprotno tome, u uzorcima sa amalgamom i Super EBA cementom nije zapažena depozicija cementnog tkiva, već samo prisustvo fibrozne kapsule oko inflamatornog infiltrata uz materijal [12]. Regan i sar. (2002) su takođe u studiji na zubima pasa upoređivali regeneraciju periradikularnog tkiva nakon resekcije i zatvaranja vrha korena MTA-om odnosno kanalnim silerom na bazi polivinil smole (Diaket, ESPE, Seefeld, Germany). Nakon eksperimentalnog perioda od 60 dana, histološkom analizom su zaključili da nema značajne razlike između testiranih materijala u pogledu inflamacije, količine novoformirane kosti i debljine periodontalnog ligamenta uz materijale. Ipak, uz MTA je uočena veća količina novostvorene kosti, dok je prisustvo cementa bilo različito i nepredvidivo kod oba materijala [155].

Tawil i sar. (2009) su pratili ozdravljenje tkiva nakon periradikularne hirurgije eksperimentalno inficiranih zuba pasa sa periapikalnim lezijama. Šest meseci posle zatvaranja kraja korena zuba sa IRM cementom, MTA-om i hibridnim jonomerom (Geristore), radiografska procena je ukazala na slične rezultate kod svih testiranih materijala. Međutim, histološka procena je ukazala na efikasnije ozdravljenje periapikalnog tkiva u uzorcima sa MTA-om i IRM-om u odnosu na Geristore grupu [179].

Apaydin i sar. (2003) su u nastojanju da olakšaju hirušku intervenciju, ispitivali mogućnost ortogradne primene MTA. U studiji na zubima pasa, polovina kanala korena je napunjena ortogradno MTA-om a zatim resecirana posle dve nedelje. U drugoj polovini, kanali korena su napunjeni konvencionalno, vertikalnom kompakcijom gutaperke, a zatim resecirani i retrogradno punjeni MTA-om. Na ovaj način autori su

pratili efekte svežeg odnosno vezanog MTA. Histomorfometrijskom analizom, nakon 4 meseca, utvrđeno je prisustvo cementa u svim uzorcima sa svežim (retrogradno aplikovanim) MTA (12/12). U grupi sa vezanim materijalom (ortogradno aplikovan MTA), depozicija cementa je viđena u nešto manjem broju uzoraka (8/12), dok je preostalim uzorcima ove grupe uočeno prisustvo fibrozne kapsule. Na bazi rezultata autori su zaključili da način aplikacije cementa ima ulogu u ozdravljenju tkiva, što su pripisali različitoj gustini materijala posle njegove ortogradne odnosno retrogradne aplikacije. Ipak, kako se i ortogradnom primenom MTA mogu dobiti zadovoljavajući rezultati, autori su mišljenja da se, kada je to neophodno, MTA može aplikovati iz ortogradnog pravca. Ovakvim načinom aplikacije materijala olakšava se hirurška intervencija, smanjuje potreba za vazokonstriktorima i izbegava preparacija kraja korena i moguće komplikacije [5].

U prospektivnoj kliničkoj studiji na ljudima, na velikom broju zuba sa periapikalnim lezijama, von Arx i sar. (2010) su pratili ozdravljenje tkiva, posle dva različita načina preparacije kraja korena, koji su zatvoreni sa dva različita materijala. Polovina korenova je preparisana zvučnom tehnikom i zatvorena MTA dok je druga polovina preparisana dijamantskim borerom i zatvorena Retroplastom (tečni kompozitni materijal). Ozdravljenje tkiva praćeno je godinu dana posle apikalne hirurgije, a podrazumevalo je odsustvo kliničkih simptoma i kompletno ili delimično ozdravljenje prethodno viđenog rasvetljenja. Bolje rezultate dobili su nakon aplikacije MTA u odnosu na Retroplast grupu (91.3% : 79.5%). Ipak, rezultati ove studije se ne mogu pripisati samo efektu materijala, obzirom da su za preparaciju kraja korena korišćene dve različite tehnike koje su takođe mogle imati uticaja na ozdravljenje tkiva [8].

Tretman korenskih perforacija

Perforacija podrazumeva mehaničku ili patološku komunikaciju između sistema kanala korena i spoljašne površine zuba uzrokovanu karijesom, resorpcijom ili jatrogenim faktorima [173, 191]. Prognoza zuba zavisi od lokalizacije i veličine perforacije, vremena proteklog od nastanka do tretmana perforacije, bakterijske kontaminacije i stanja pulpe i periodoncijuma [129]. Prema lokalizaciji, perforacije korena mogu biti interradske, lateralne i apikalne. Generalno, prognoza je bolja ako je vreme od nastanka do tretmana

perforacije kraće i ukoliko je perforacija manja i apikalnije postavljena [191]. Nelečene perforacije uzrokuju inflamaciju, resorpciju kosti, dentina i cementa i prorastanje sulkusnog epitela. Ovo je naročito izraženo kod perforacija u furkaciji višekorenih zuba i kod perforacija u blizini gingivalnog sulkusa svih zuba [175]. Glavni cilj u tretmanu perforacija je sprečavanje zapaljenskog procesa i posledičnog gubitka tkivnog pripoja na mestu perforacije, odnosno uspostavljanje novog tkivnog pripoja, ukoliko lezija već postoji [129].

Materijal izbora za reparaciju perforacija pored biokompatibilnosti treba da ostvaruje dobro rubno zaptivanje, da je nerastvorljiv u tkivnim tečnostima i da poseduje adekvatna mehanička svojstva kako se ne bi dislocirao prilikom kondezacije restaurativnog materijala ili pod dejstvom okluzalnih sila [129]. U tretmanu perforacija do sada su korišćeni amalgam, SuperEBA cement, Kavit, glas jonomer cementi i kompoziti [105]. Nakon primene ovih materija nije uočena regeneracija tkiva (već formiranje fibrozne kapsule u najboljem slučaju), a u najvećem broju slučajeva u blizini materijala je uočeno formiranje periodontalnog defekta [129]. Stoga je prilikom reparacije korenskih perforacija neophodno koristiti materijal koji će pomoći restauraciju originalne strukture oštećenog tkiva, odnosno materijal koji će stimulisati cementogenezu, koja se smatra uslovom za regeneraciju funkcionalnog periodontalnog ligamenta [113].

Za reparaciju korenskih perforacija, MTA je preporučen 1995 godine, na bazi rezultata studije u kojoj je demonstrirao dobro rubno zaptivanje [186]. Da se MTA može koristiti kao materijal za reparaciju korenskih perforacija kasnije je potvrđeno i u *in vivo* studijama. Holland i sar. (2001) su na zubima pasa, ispitivali histološku reakciju tkiva nakon primene MTA u reparaciji lateralnih korenskih perforacija. Nakon eksperimentalnog perioda od 30 i 180 dana, tkivo ispod MTA bilo je bez znakova inflamacije, a depozicija cementa je uočena preko većine uzoraka. U grupi sa kontrolnim materijalom (Sealapex) posle 180 dana, evidentirana je hronična inflamacija tkiva [96].

Da Silva i sar. (2011) su u studiji na pacovima, procenjivali biološki odgovor periodoncijuma nakon što su perforacije u furkaciji korenova zatvarali sa dve vrste kalcijum silikatnih materijala (MTA Angelus, Endo-CPM-siler) i ZOE. Histološkom i histomorfometrijskom evaluacijom su praćeni broj inflamatornih ćelija, širina periodontalnog prostora i broj TRAP-pozitivnih osteoklasta. Kalcijum silikatni materijali

su pokazali bolja biološka svojstva u poređenju sa ZOE. Generalno, posle 7 dana od postavljanja materijala uočeno je prisustvo velikog broja inflamatornih ćelija naročito u ZOE grupi. Broj ćelija se vremenom smanjivao, ali je u svim eksperimentalnim periodima (14, 30 i 60 dana) broj inflamatornih ćelija bio veći u ZOE grupi nego kod kalcijum silikatnih materijala. Loši rezultati u ZOE grupi su povezani sa eugenolom koji uzrokuje denaturaciju proteina i strukturalne i funkcionalne promene u ćelijama sa posledičnom odumiranjem. Veći broj osteoklasta uočen u ZOE grupi, mogao je biti razlog povećanja periodontalnog prostora. Kod kalcijum silikatnih cemenata izraženija inflamacija je viđena kod MTA, što su autori pripisali viskom pH ovog materijala. CPM siler pored CaCl_2 koji ima ulogu akceleratora vezivanja, sadrži i kalcijum karbonat koji redukuje pH i time ograničava površnu nekrozu. Značajna redukcija širine periodontalnog prostora uočena je posle 60 dana kod oba kalcijum silikatna materijala [173].

Main i sar. (2004) su objavili rezultate kliničke studije u kojoj je praćen uticaj MTA na reparaciju 16 slučajeva korenskih perforacija, različite lokalizacije. Radiografije zuba su napravljene pre tretmana, odmah nakon tretmana perforacija i najmanje godinu kasnije, sa ciljem da se odredi prisustvo/odsustvo patoloških promena u blizini mesta perforacije. Takođe, kliničkom procenom je utvrđivano prisustvo/odsustvo periodontalnog defekta. Svih 16 slučajeva je nakon kontrolnih pregleda pokazalo normalnu građu tkiva u blizini perforacije. Preoperativne lezije, inicijalno dijagnostikovane kod 7 zuba u vreme tretmana, izlečene su u periodu od 12 - 45 meseci [129].

U literaturi su dostupni i pojedinačni klinički prikazi slučajeva korenskih perforacija uspešno saniranih primenom MTA [105, 200].

Apeksifikacija

Apeksifikacija je terapijska metoda kojom se indukuje stvaranje kalcifikovane barijere kod zuba sa nekrotičnom pulpom i nezavršenim rastom korena. Za indukciju apeksifikacije tradicionalno se koristi kalcijum hidroksid [70] sa relativno visokim procentom kliničkog uspeha. Ipak, upotreba kalcijum hidroksida ima nekoliko nedostataka, pre svega veliki broj poseta i radiografija pacijenata, dugo trajanje tretmana, te posledično veći rizik od reinfekcije kanala i frakture korena [58, 63].

Racionalizacija apeksifikacije se odvija u pravcu sprovođenja jednoseansne terapije, koja podrazumeva da se u istoj poseti, nakon postavljanja arteficialnog apikalnog čepa, ortogradnom aplikacijom biokompatibilnog materijala, sprovede i definitivna obturacija kanala korena. Kalcijum silikatni materijali su predloženi za formiranje apikalnog čepa u zuba sa nezavršenim rastom korena zbog njihove biokompatibilnosti i dobrog rubnog zaptivanja.

Felippe i sar. (2006) su ispitivali efekte MTA na apeksifikaciju i periapikalno ozdravljenje na zubima pasa, sa nekompletno formiranim korenovima i eksperimentalno inficiranim kanalima. Autori su takođe ispitivali uticaj medikacije kanala kalcijum hidroksidom (CH) na apeksifikaciju indukovanu MTA-om. Histološkom analizom tkiva, posle 5 meseci, nisu uočene razlike u pogledu inflamatornih reakcija, resorpcije kosti i resorpcije korena nakon aplikacije MTA, nezavisno od medikacije. Kalcifikovana barijera viđena je kod svih uzoraka, ali se razlikovala po debljini i obliku. Kompletno formirana barijera uočena je u MTA grupi u značajno većem broju uzoraka nego u grupi uzoraka sa prethodnom medikacijom kalcijum hidroksidom (7/13, 2/12). Apeksifikacija je evidentirana i u uzorcima gde je bila prisutna inflamacija. Interesantno je da su uzorci MTA sa prethodnom medikacijom kalcijum hidroksidom, pokazali izraženiju ekstruziju MTA. Autori su ovakav nalaz pripisali sinergističkom kaustičnom dejstvu irigansa (NaOCl) i medikamenta (CH) koji su mogli uzrokovati nekrozu oko vrha korena zuba i posledično prebacivanje MTA. Na bazi dobijenih rezultata autori su zaključili da apikalni čep od MTA odmah nakon preparacije kanala korena favorizuje stvaranje normalnog periodontalnog ligamenta i formiranje nove kosti i cementa. Po njihovom mišljenju, prethodna medikacija kalcijum hidroksidom nije neophodna [63].

Erdem i Sepet (2008) su prikazali 5 slučajeva apeksifikacije humanih, maksilarnih sekutića sa nezavršenim rastom korena, nekrotičnom pulpom i periapikalnim lezijama, posle primene MTA kao apeksnog čepa. Radigrafsko praćenje tokom dve godine, je ukazalo na postepenu redukciju periapikalnih lezija i depoziciju čvrstog tkiva kod 4 od 5 tretiranih zuba [58].

2.2. CEMENTI NA BAZI KALCIJUM FOSFATA

2.2.1. Hemijski sastav

Kalcijum fosfatni biokeramički materijali koji se koriste u medicini su zapravo kalcijum fosfatne soli u obliku ortofosfata, metafosfata, pirofosfata, trifosfata i tetrafosfata. Kao biokeramike najčešće se koriste soli ortofosfata zbog čega se ovaj pojam poistovećuje sa pojmom kalcijum fosfata (130). Kalcijum ortofosfati su hemijska jedinjenja koja se sastoje od tri osnovna hemijska elementa: kalcijuma (Ca^{2+}), fosfora (P^{5+}) i kiseonika (O^{2-}). Porodici kalcijum ortofosfata pripadaju dikalcijumfosfat dihidrat (DCPD, brušit), α trikalcijum fosfat (α TCP), kalcijum deficijentni hidroksiapatit (CDHA), hidroksiapatit (HA), fluoroapatit (FA) i dr. Odnos Ca/P određuje baznost i rastvorljivost ortofosfata, pri čemu veći Ca/P molarni odnos rezultira baznim karakterom i manjom rastvorljivošću kalcijum ortofosfata [110].

Hidroksiapatit $[(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)]$ je biokompatibilna, bioaktivna keramika sa osteokonduktivnim potencijalom. Dobra biološka svojstva sintetskog hidroksiapatita su posledica njegovog sastava i strukture koji su vrlo slični sastavu i strukturi koštanog i zubnog tkiva [120]. Zahvaljujući tome, u medicini i stomatologiji se koristi za reparaciju i rekonstrukciju obolelih i oštećenih delova mukoskeletnog i stomatognatnog sistema gde porozna struktura materijala omogućava prorastanje koštanog tkiva unutar pora hidroksiapatita [152].

2.2.2. Fizička i biološka svojstva

Glavni problem koji ograničava širu aplikaciju kalcijum fosfatnih cemenata u endodontskoj terapiji su njihova neadekvatna mehanička svojstva, pre svega krtost, male vrednosti pritiskne čvrstoće, poroznost i posledična rastvorljivost [110]. Poznato je takođe da kalcijum fosfatni cementi ne poseduju adekvatna zaptivajuća svojstva [190].

U studiji Sanghavi i sar. (2013) zaptivajuće sposobnosti kalcijum fosfatnog cementa (CPC), koji se uobičajeno koristi za rekonstrukciju tkiva u ortopedskoj hirurgiji, upoređivane su sa kalcijum silikatnim cementima (ProRoot MTA i Biodentin). Kvalitet rubnog zaptivanja je ispitivan metodom ekstrakcije boje nakon postavke materijala u

eksperimentalno napravljenim perforacijama na ekstrahovanim humanim zubima. Na osnovu dobijenih rezultata, autori su zaključili da je rubno zaptivanje kalcijum fosfatnog cementa značajno lošije u odnosu na rubno zaptivanje kalcijum silikatnih cemenata [163].

Dosadašnja istraživanja moguće primene kalcijum fosfatnih cemenata, bavila su se uglavnom ispitivanjem njihove efikasnosti u direktnom prekrivanju pulpe. Tako su Jean i sar. (1988) ispitivali indukciju formiranja dentinskog mosta nakon aplikacije različitih formulacija trikalcijum fosfata (TCP). U studiji na zubima svinja, za DPP su koristili TCP+Mg, TCP+HAP i oktokalcijum fosfat (OCP) i dobijene efekte poredili sa kalcijum hidroksidom. Uočili su da postoje razlike u induktivnom kapacitetu testiranih formulacija trikalcijum fosfata. Posle 10 nedelja, mikroradiografije isečaka tkiva su pokazale da je TCP u kombinaciji sa HAP-om imao najbolje dentinogene efekte među testiranim formulacijama, sa debljim dentinskim mostom i bržim formiranjem normalnog tubularnog dentina u poređenju sa kalcijum hidroksidom [109].

Hayashi i sar. (1999) su na zubima pacova, ispitivali mogućnost primene čistog hidroksiapatita u svojstvu materijala za DPP. Inicijalnu reakciju tkiva odlikovala je slaba inflamatorna reakcija, uz prisustvo makrofaga i površne nekroze, a već petog dana od tretmana, ispod materijala je uočen tanak sloj predentina [95].

U studiji Shayegan i sar. (2009) induktivni potencijal kalcijum fosfatnih cemenata izjednačen je sa kalcijum silikatnim cementima. Efikasnost beta trikalcijum fosfata (β -TCP) u DPP mlečnih zuba svinja je upoređivana sa belim ProRoot MTA-om, belim PC-om i kalcijum hidroksidom (Dycal). Tri nedelje posle prekrivanja, histološka analiza je ukazala da nema značajnih razlika u odgovoru pulpe i formiranju čvrstog tkiva između testiranih materijala. Debeo sloj čvrstog tkiva ispod mesta eksponirane pulpe uočen je kod svih materijala, sa izuzetkom dva uzorka u grupi sa kalcijum hidroksidom. Inkluzije ćelija u reparatnom tkivu su bile česte i registrovane su kod svih materijala [171].

Danesh i sar. (2012) su poređenjem induktivnog kapaciteta karbonatnog apatita i MTA u studiji na zubima pasa došli do nešto drugačijih rezultata. Biomimetički karbonatni apatit (BCAp) sintetisali su interakcijom belog MTA sa fosfatnim puferom tokom 40 dana na 37 C°. Posle 70 dana, inflamacija je, iako inicijalno manja kod MTA, bila slična kod oba materijala. U pogledu dentinskog mosta, značajno bolje rezultate dobili su nakon primene MTA. U grupi sa BCap nije uočeno stvaranje kompletnog

dentinskog mosta, već je uočena samo lateralna depozicija čvrstog tkiva. Dobijene rezultate autori su pripisali neadekvatnim fizičkim svojstvima BCAP-a ali i izostanku nekroze u BCAP grupi koja distrofičnom kalcifikacijom doprinosi koronarnom aspektu dentinskog mosta [46].

Balla i sar. (1991) su ispitivali mogućnosti primene kalcijum fosfata u tretmanu korenskih perforacija. Tkivni odgovor analiziran je nakon aplikacije trikalcijum fosfata, hidroksiapatita, amalgama i Life-a u furkacione perforacije zuba rezus majmuna. Nakon eksperimentalnog perioda od 2, 4 i 6 meseci, nije uočeno formiranje čvrstog tkiva odnosno ponovno uspostavljanje normalnog pripojnog aparata ni kod jednog materijala. Međutim, uočeno je smanjivanje inteziteta inflamacije u funkciji vremena nakon aplikacije svih testiranih materijala. Najizraženija inflamacija posle 6 meseci, uočena je u grupi sa trikalcijum fosfatom, što su autori pripisali lošim zaptivajućim svojstvima materijala [13].

Noetzel i saradnici (2006) su efikasnost eksperimentalnog TCP u tretmanu perforacija poredili sa sivim MTA-om. U studiji na zubima pasa, stanje kosti uz perforacije su procenjivali radiografski, dok je intezitet inflamatorne reakcije, depozicija vezivnog tkiva i reorganizacija kosti praćena histološkom analizom. Posle 12 nedelja, inflamatorne ćelije su detektovane u svim furkacijama, ali ih je bilo nešto manje nakon aplikacije MTA. Po pitanju reorganizacije kosti i depozicije vezivnog tkiva nije bilo razlike između ispitivanih materijala [140].

2.2.3. Nove formulacije materijala na bazi kalcijum fosfata

Bez obzira na biokompatibilnost, usled loših mehaničkih svojstava, primena kalcijum fosfatnih cemenata u terapiji očuvanja vitaliteta pulpe, nije zaživela u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Međutim, struktura kalcijum fosfatne keramike je pogodna za supstituciju, te zamena jona kalcijuma, fosfora i kiseonika drugim jonima, rezultira izmenama u rešetki, morfologiji i posledičnim svojstvima cemenata [152]. Tako su poslednjih godina u cilju poboljšanja mehaničkih svojstava, sintetisane nove formulacije materijala na bazi kalcijumfosfata u kombinaciji sa kalcijum silikatima, smolama, organskim kiselinama i dr. [40, 42, 99, 195].

Najveći interes u ovoj oblasti privukla je kombinacija kalcijum fosfata sa kalcijum silikatima. Wang i sar. (2007) su uočili da dodavanje dikalcijum silikata (C2S) amorfnom kalcijum fosfatnom cementu, povećava njegovu mehaničku snagu, na bazi čega zaključili da kalcijum silikatna hidratna faza ima ulogu punioca u kalcijum fosfatnom cementu [195].

Na bazi rezultata prethodnog istraživanja, Huan i sar. (2009) su kalcijum oksid (CaO) u DCPD/CaO zamenili trikalcijum silikatom (C3S) i tako dobili kompozitni cement (DCPD/C3S) značajno većih vrednosti pritiska čvrstoće u odnosu na izvornu formulaciju cementa, sa porastom pritiska čvrstoće cementa u funkciji vremena, u meri zavisnoj od količine dodatog kalcijum silikata. Dobijene rezultate su pripisali filernom efektu kalcijum silikatne hidratne faze ali i tome da se C3S može ponašati kao indirektna reaktivna komponenta unutar cementa. Indirektna reakcija između DCPD i C3S, zajedno sa kalcijum silikatnom hidratnom fazom kao puniocem, može rezultirati kompaktnijom i homogenijom mikrostrukturom hidratisanog DCPD/C3S cementa sa posledično superiornijim mehaničkim osobinama u poređenju sa DCPD/CaO cementom. Citotoksičnost izlučaka (24h) novosintetisanog kompozitnog cementa je zatim ispitivana na ćelijama koštane srži miša. Uočeno je da za razliku od DCPD/CaO koji je bio toksičan u koncentracijama >100 mg/ml, kod DCPD/C3S nije bilo razlike u toksičnosti viših i nižih koncentracija materijala. Dobijene rezultate autori su objasnili činjenicom da kod DCPD/C3S nije bilo značajnijih promena u vrednostima pH, što su pripisali potrošnji kalcijum hidroksida kroz formiranje CDHA tokom hidratacije cementa. Takođe su pokazali da je kompozitni cement bioaktivniji u odnosu na DCPD/CaO, ali da je za formiranje apatitnog sloja na površini kompozitnog materijala potrebno više od 30% C3S, potvrđujući značaj silikata u bioaktivnosti materijala [99].

Prema pisanju Pietak-a i sar. (2007) uvođenje Si u kristalnu strukturu kalcijum fosfatne keramike unapređuje biološku aktivnost izmenama površine materijala i formiranjem finije mikrostrukture rezultirajući izraženijom precipitacijom biološkog hidroksiapatita na površini materijala [153].

Zhao i sar. (2010) su poredili odgovor mišijih preosteoblasta MC3T3 na kalcijum fosfatni cement (CPC) i mešavinu kalcijum fosfata sa kalcijum silikatom (CPC/CS). Merenjem aktivnosti alkalne fosfataze su zapazili izraženiju diferencijaciju ćelija posle kontakta sa CPC/CS mešavinom u odnosu na čist CPC. Dobijene rezultate autori su

pripisali oslobađanju Si jona iz CPC/CS, pa su zaključili da dodavanje kalcijum silikata doprinosi osteogenezi [207].

Na tržištu Severne Amerike od nedavno su i dva komercijalni preparata na bazi kalcijum silikata sa dodatkom kalcijum fosfata. ERRM Putty i ERRM Paste (Endosequence Root Repair Material Putty, Endosequence Root Repair Material Paste; Brasseler USA, Savannah, GA). Ovi novi biokeramički materijali pored kalcijum silikata i kalcijum fosfata, sadrže još cirkonijum oksid i tantalum oksid. Poput MTA, namenjeni su za tretman perforacija, zatvaranje vrha korena posle apeksne hirurgije odnosno za direktno prekrivanje pulpe. Procenjujući citotoksičnost ovih materijala MTT testom na humanim fibroblastima gingive, Ma i sar. (2011) su takođe ispitivali i uticaj koncentracije i vremena izluživanja na njihovu toksičnost. Oba materijala su u *in vitro* uslovima pokazala biokompatibilnost sličnu sivom MTA-u. Duže vezivanje uzoraka je rezultiralo manjom toksičnošću što su autori objasnili manjim curenjem toksičnih komponenti iz vezanih (7 dana) u odnosu na nevezane uzorke (2 dana). Nakon kraćeg izluživanja (1 i 3 dana), koncentracija nije imala uticaja na toksičnost materijala. Posle dužeg izluživanja materijala (7 dana) kod obe vrste uzoraka je, sa opadanjem koncentracije materijala uočeno veće preživljavanje ćelija u kulturi [128]. Potvrđeno je i da nema razlike u toksičnosti između ERRM Putty i ERRM Paste i dve komercijalne formulacije belog MTA (MTA Angelus i ProRoot MTA) [44].

Modareszadeh i sar. (2012) su testirajući citotoksičnost 100% i 50% izlužaka prethodno pomenutih materijala i MTA na SaOS-2 ćelijama, MTT testom, dobili nešto drugačije rezultate. Za razliku od MTA gde koncentracija izlužaka nije imala uticaja na toksičnost materijala, nerazblaženi izlušci ESRRM su bili značajno toksičniji od razblaženih. Takođe su uočili da je ESRRM redukovao aktivnost alkalne fosfataze u odnosu na MTA i to naročito u nerazblaženim izlušcima [135].

U cilju povećanja fleksularne snage i jačine, Lee i sar. (2010) su kalcijum fosfatnom cement dodali Chitosan, a biokompatibilnost i bioinduktivnost ove formulacija poredili sa MTA-om i PC-om na ćelijama pulpe. Diferencijaciju ćelija su procenjivali nivoom ALP i ekspersijom 7 različitih markera ćelijske diferencijacije (osteonektin, osteopontin, koštani sijaloprotein, dentin matriks protein 1, fosfoglikoprotein ekstracelularnog matriksa i dentin sijalofosfoprotein). Nije bilo razlike u pogledu

indukcije proliferacije i diferencijacije ćelija pulpe između testiranih materijala, pri čemu Chitosan nije imao negativnog uticaja na dentinogeni potencijal CPC-a [124].

Dickens i sar. (2010) su ispitivali mogućnosti DPP sa novim kalcijum fofatnim cementom u smoli. Efikasnost materijala je upoređivana sa svetlosno polimerizujućim kalcijum hidroksidom na neinflamiranoj pulpi pasa i na neinflamiranoj i inflamiranoj pulpi lasica. Kod pasa, formiranje reparatnog dentina je uočeno u većini uzoraka posle 28 dana, odnosno kod svih uzoraka posle 90 dana. U grupi sa kalcijum hidroksidom reparatni dentin nije viđen ni u jednom uzorku. Kod lasica, sve neinflamirane pulpe prekrivene sa oba testirana materijala su demonstrirale formiranje reparatnog dentina. U grupi sa eksperimentalno inflamiranim pulpama, reparatni dentin je viđen u 75% uzoraka prekrivenih CPC-om i 50% uzoraka prekrivenih kalcijum hidroksidom. Kao i na zubima pasa i kod lasica je reparatni dentin bio sličan predentinu. Ova studija je pokazala da ispitivani materijali mogu indukovati stvaranje reparatnog dentina i u inflamiranoj pulpi, s tim da je reparatni dentin uočen u većem broju uzoraka i u većoj količini nakon aplikacije CPC-a [52].

Peters i sar. (2010) su utvrdili da CPC u smoli ima sposobnost remineralizacije karijesnog dentina. Posle eksperimentalnog perioda od 3 meseca, remineralizacija je kvantifikovana primenom EPMA (engl. electron probe micro-analysis) [150].

Chen i sar. (2013) su u cilju poboljšanja mehaničkih svojstava, eksperimentalnom cementu na bazi hidroksiapatita (43%) i tetrakalcijum fosfata (43%) dodali poliakrilnu kiselinu (9%). Citotoksičnost materijala su poredili sa glas jonomer cementom i sivim PC-om, na L-929 fibroblastima, MTT i CV testom. Rezultati su ukazali na slično ponašanje materijala, sa rastom vijabilnosti ćelija u funkciji vremena izluživanja svih testiranih materijala, čime su pokazali da poliakrilna kiselina ne narušava biokompatibilnost kalcijum fosfata [40].

Gandolfi i sar. (2012) su sintetisali dva eksperimentalna bioaktivna materijala za tretman dentinske preosetljivosti. Kalcijum silikatnom materijalu su dodali kalcijum fosfat odnosno kalijum oksalat, a zatim ispitivali sposobnost materijala da okludiraju dentinske kanaliće, redukuju permeabilnost i remineralizuju površinu dentina. Eksperimentalne materijale su poredili sa komercijalnim preparatom za redukciju dentinske permeabilnosti (D-Sense Crystal) i dentin adhezivom (Clear S3 Bond).

Neposredno nakon potapanja u veštačku pljuvačku rezultati su bili slični za sve ispitivane materijale. Međutim, posle 7 dana, eksperimentalni materijali su dali bolje rezultate, što je pripisano stvaranju etringita i kalcita na površini dentina i unutar dentinskih tubula [78].

2.3. SILERI NA BAZI KALCIJUM SILIKATA I KALCIJUM FOSFATA

2.3.1. Hemijski sastav

Obzirom na dobra biološka svojstva kalcijum silikatnih i kalcijum fosfatnih cemenata, poslednjih godina intenzivno se ispituju mogućnosti njihove primene u svojstvu endodontskih silera. Kako konzistencija kalcijum silikatnih i kalcijum fosfatnih cemenata nije prikladna za opturaciju kanala korena, osnovne formulacije materijala se ne mogu koristiti u te svrhe. Stoga se modifikacije odnose na delimične izmene u hemijskom sastavu materijala, pre svega u cilju unapređenja njihove fluidnosti ili unapređenja načina dostave materijala.

Danas je na tržištu dostupna nekolicina komercijalnih biokeramičkih silera različitih proizvođača. Jedan od prvih komercijalnih silera na bazi kalcijum silikata je MTA Fillapex (Angelus, Londrina, Brazil). Ovaj siler na bazi Portland cementa, sadrži još bizmut oksid i salicilatne smole. BC siler (Brasseler, Savannah, GA, USA) i iROOT SP siler (Innovative bioceramix, Vancouver, Canada) su biokeramički, hidrofilni sileri, različitih proizvođača ali gotovo identičnog sastava. Sastoje se od kalcijum silikata i kalcijum fosfata, sa dodatkom cirkonijum oksida kao rendgen sredstva, i ne sadrže aluminijum. Radi se o unapred pripremljenim silerima, pakovanim u špricu koji za vezivanje koriste vlagu iz dentinskih tubula. Prethodnih godina, ovi i slični komercijalni sileri kao i nove eksperimentalne formulacije testirane su u pogledu fizičkih i bioloških svojstava.

2.3.2. Fizička svojstva

2.3.2.1. Rastvorljivost

Borges i sar. (2012) su poredili rastvorljivost novih kalcijum silikatnih silera (MTA Fillapex, iROOT SP) sa konvencionalnim silerima (AH Plus, Sealapex), a kao kontrolni materijal su koristili MTA Angelus. Nakon testa rastvorljivosti, površine materijala su analizirane na SEM/EDX. AH Plus i MTA Angelus su demonstrirali najmanju rastvorljivost. Kalcijum silikatni sileri kao i Sealapex su pokazali izraženu rastvorljivost, veću od propisanog zahteva ISO standarda (MTA Fillapex >14%, iROOT SP >20% i Sealapex >5%). SEM/EDX analiza je ukazala na morfološke promene u izgledu površine svih ispitivanih materijala nakon testa rastvorljivosti koja se manifestovala gubitkom matriksa sa uočljivijim česticama silera. Različitu rastvorljivost iROOT SP i MTA Fillapex-a, autori su pripisali razlici u veličini polimernog lanca nakon vezivanja kao i velikoj poroznosti površine iROOT SP-a koja je potvrđena i na SEM/EDX-u. Izraženu poroznost iROOT SP-a autori su pripisali prisustvu kalcijum fosfata u sastavu silera [22].

U istraživanju de Souza i sar. (2013), kvalitativnom analizom na mikro CT-u, je uočeno da je poroznost iROOT SP silera nešto veća u odnosu na kalcijum silikatne cemente (Biodentin, ProRoot MTA), s tim da uočene razlike nisu bile statistički značajne [51].

Vitti i sar. (2013) su poredili rastvorljivost i apsorpciju vode MTA Fillapex-a sa eksperimentalnim cementom na bazi MTA i smole (butiletilenglikol salicilat, MTAE), uz dodatak 20% hidroksiapatita (MTAE-HA) ili 20% DCPD (MTAE-DCPD). Veća rastvorljivost je uočena kod eksperimentalnih materijala sa dodatkom HA i DCPD u odnosu na čist MTAE. Svi eksperimentalni cementi testirani u ovom istraživanju su pokazali veću rastvorljivost i apsorpciju vode u odnosu na MTA Fillapex [194].

2.3.2.2. Marginalna adaptacija

Oliveira i sar. (2011) su poredili kvalitet zaptivanja dva nova silera (Endo CPM Sealer, Argentina i MTA Sealer, Brazil) sa 6 konvencionalnih silera (AH Plus, Sealer 26, Epiphany, Sealapex, Activ GP i Endofil). Endo CMP siler pored MTA još sadrži kalcijum

karbonat, kalcijum hlorid i rendgen kontrasna sredstva. MTA siler se sastoji od belog PC i bizmut oksida. Nakon opturacije kanala korena i 7-dnevnog vezivanja silera, kvalitet zaptivanja je praćen metodom prodora bakterija tokom 120 dana. Iako je curenje bakterija detektovano kod svih silera, kalcijum silikatni sileri su bili lošiji od konvencionalnih. Najbolji rezultati su dobijeni kod AH Plus silera i Sealapex-a [142].

Camilleri i sar. (2011) su takođe pisali o većoj marginalnoj mikropropustljivosti kalcijum silikatnih silera u odnosu na konvencionalne silere. Ovi autori su novi kalcijum silikatni siler (MTA siler, Brazil) poredili sa silerom na bazi ZnO u smoli (Pulp Canal Sealer, Kerr-Hawe S.A., Bioggio, Switzerland). Nakon opturacije kanala korena metodom vertikalne kompakcije gutaperke, zuba su potopljeni u veštački tkivni fluid, a zaptivanje je procenjivano metodom filtracije fluida posle 24h i 28 dana. Inicijalno, zaptivajuće sposobnosti testiranih silera su bile slične, ali su u funkciji vremena bile bolje kod silera na bazi ZOE u smoli [33].

U istraživanju Gomes-Filho i sar. (2011), upoređivano je zaptivanje dva komercijalna silera na bazi MTA (MTA Fillapex i Endo CMP Sealer) sa konvencionalnim silerom na bazi kalcijum hidroksida (Sealapex), testom prodora boje. Najmanji prodor boje je izmeren kod MTA Fillapex-a, a najveći kod Endo CMP silera [83].

Gandolfi i sar. su (2013) su mikrokompjuterskom tomografijom procenjivali kvalitet rubnog zaptivanja posle opturacije ekstrahovanih humanih zuba primenom Thermafill-a u kombinaciji sa AH Plus odnosno MTA silerom (MTA Flow, sadrži hidrofilni organski polimer na bazi etra). Procenat praznina i pukotina je meren posle imerzije u fosfati rastvor tokom 7 dana i 6 meseci. Nezavisno od ovog ispitivanja, površna morfologija silera je posmatrana na ESEM/EDX posle 24h, 7 i 28 dana čuvanja uzoraka u fosfatnom rastvoru. U apeksnoj trećini, MTA siler je demonstrirao manje praznina, dok su u srednjoj i koronarnoj trećini testirani sileri bili slični. Uočen je trend smanjivanja praznina od koronarnog ka apikalnom pravcu kod oba silera, što su autori objasnili većim pritiskom tokom punjenja i posledično boljom adaptacijom silera. Takođe su primetili smanjivanje poroznosti nakon dužeg čuvanja uzoraka u fosfatnom rastvoru što je moglo biti posledica ekspanzije silera. Osim toga, ESEM/EDX analiza uzoraka posle 28 dana, je ukazala na formiranje apatita na površini materijala čak i kod AH Plus silera, zbog čega su autori pretpostavili da je formirani apatit, tokom vremena, ispunio porozitete unutar silera [79].

2.3.2.3. Jačina veze sa dentinom

Ersahan i sar. (2010) su jačinu veze novog biokeramičkog kanalnog silera iROOT SP sa dentinom kanala korena, poredili sa komercijalnim kanalnim silerima (Sealapex, AH Plus i EndoRez). Najveća otpornost na smicanje je uočena u grupama AH Plus (1.99 MPa) i iROOT SP (1.32) silera. Adhezivnost AH Plus se generalno pripisuje njegovoj sposobnosti da reaguje sa amino grupama kolagena sa stvaranjem kolagenih veza. S obzirom na to da iROOT SP za vezivanje koristi vlagu iz kanala korena, autori su pretpostavili da se time može izbeći skupljanje materijala prilikom vezivanja, što može biti razlog njegove dobre veze da dentinom [59].

Dobra veza iROOT SP-a sa dentinom kanala korena, komparabilna sa AH Plus, potvrđena je i u istraživanju Sagsen-a i sar. (2012). U ovom istraživanju, jačina veze je testirana nakon konvencionalne opturacije kanala korena (gutapeka i siler). Istovremeno, iROOT SP je demonstrirao superiorniju vezu u srednjim i apikalnim trećinama korenova u odnosu na MTA Fillapex [161].

Shokouhinejad i sar. (2011) takođe nakon konvencionalne metode opturacije, nalaze da je veza biokeramičkih silera iROOT SP sa dentinom kanala korena komparabilna sa vezom AH Plus silera. U ovom istraživanju nije uočen značaj prisustva/odsustva razmaznog sloja na kvalitet veze testiranih silera sa dentinom kanala korena [172].

2.3.3. Biološka svojstva

Gomes-Filho i sar. (2009) su ispitivali citotoksičnost komercijalnog silera na bazi kalcijum silikata (Endo-CPM-Sealer, EGEO SRL, Buenos Aires, Argentina). Ovaj siler po svom sastavu odgovara sastavu MTA uz dodatak kalcijum karbonata koji redukuje pH vrednosti materijala nakon vezivanja sa 12.5 na 10.0. U kulturi fibroblasta, Endo CPM siler je pokazao biokompatibilnost sličnu konvencionalnom sileru na bazi kalcijum hidroksida (Sealapex) i MTA Angelus-u [82].

Bin i sar. (2012) su na fibroblastima kineskog hrčka (V79), poredili citotoksičnost MTA Fillapex-a sa belim MTA Angelus-om i AH Plus silerom. U visokim koncentracijama, MTA Fillapex je ispoljio izraženu toksičnost, sličnu AH Plus sileru,

dok su oba silera bila značajno toksičnija od MTA Angelus-a. Toksičnost MTA Fillapex-a je potvrđena i u istraživanju Silva i sar. (2013). Prema ovom istraživanju, MTA Fillapex je značajno toksičniji od AH Plus, a redukcija preživljavanja ćelija u kulturi ćelija evidentirana je tokom 5 nedelja testiranja. Toksičnost MTA Fillapex-a je povezana sa toksičnim komponentama u sastavu materijala, pre svega sa smolama. Iako je AH Plus siler takođe na bazi smole, njegova toksičnost je evidentirana tokom prve dve nedelje nakon mešanja materijala, a posle toga je bio sličan kontroli. Ovakve rezultate autori su pripisali manjem curenju toksičnih supstanci iz AH Plus silera u odnosu na MTA Fillapex [18].

Hakki i sar. (2013) su ispitivali citotoksičnost Tech Biosealer Endo silera (TBE, Isasan, Rovello Porro, Italy), čiji se prah sastoji od belog PC-a sa dodatkom bizmut oksida dok je tečna komponenta 4% rastvor artikaina. Toksičnost novog silera su upoređivali sa drugim komercijalno dostupnim silerima (AH Plus, Real Seal, Simpli Seal, Hybrid Root Seal) na cementoblastima miša OCCM-30. Real-time analiza je ukazala na značajnu redukciju preživljavanja ćelija posle izlaganja novom kalcijum silikatnom sileru. Posle izlaganja manje koncentrovanim izlušcima materijala uočena je i manja toksičnost testiranog silera [89].

Sa ciljem da sintetišu biokeramički materijal konzistencije silera, Khashaba i sar. (2009) su cement na bazi monokalcijum fosfata, kalcijum oksida i hidroksiapatita mešali sa tri različita polimera: poliakrilnom, polialkenoičnom, i maleičnom kiselinom. Citotoksičnost materijala su ispitivali MTT testom, tokom 5 nedelja. Posle direktnog kontakta materijala sa humanim gingivalnim fibroblastima i L-929 fibroblastima, dobijene rezultate su poredili sa komercijalnim silerom na bazi kalcijum hidroksida (Acroseal, Septodont, France). Uočili su da svi testirani materijali deluju toksično na obe vrste ćelija, ali i da toksičnost zavisi od vrste polimera. Najbolje rezultate su dobili kod kalcijum fosfatnog cementa zamešanog sa poliakrilnom kiselinom. Toksičnost Acroseal-a, je perzistirala tokom 5 nedelja i pripisana je prisustvu amina u epoksi komponenti materijala [117].

Zhang i sar. (2010) su ispitivali citotoksičnost iROOT SP silera na L 929 fibroblastima miša. Milipore metodom je utvrđeno da je iROOT SP netoksičan u vezanom i slabo toksičan u nevezanom stanju, kao i da je toksičniji od MTA i manje toksičan od AH Plus silera. Testiranjem citotoksičnosti izlužaka vezanih materijala MTT testom,

iROOT SP i ProRoot MTA su bili slični kontroli dok je AH Plus bio toksičniji. Inicijalnu toksičnost svežeg iROOT SP silera, autori su objasnili visokim vrednostima pH površine materijala, odnosno izluživanjem kalcijum hidroksida i minimalnih količina smole iz materijala [204].

U studiji Han i Okiji (2013), potvrđena su bioaktivna svojstva biokeramičkih silera, ali je uočena različita kinetika oslobađanja jona kalcijuma iz materijala na bazi kalcijum silikata i kalcijum fosfata (BC sealer) u odnosu na čiste kalcijum silikatne materijale (Biodentin, Pro Root MTA). Naime, uočeno je slabije oslobađanje jona kalcijuma iz BC silera u odnosu na Biodentin i MTA. Dobijeni rezultati su povezani sa manjim sadržajem kalcijum silikata u BC sileru, odnosno slabijem stvaranju kalcijum hidroksida. Pored toga, reakcija vezivanja BC silera uključuje reakcije kalcijum fosfata sa kalcijum hidroksidom radi stvaranja vode i hidroksiapatita. Potrošnja kalcijuma za stvaranje hidroksiapatita unutar materijala može biti još jedan razlog manjeg oslobađanju Ca^{2+} . U ovom istraživanju je SEM analizom uočeno i formiranje prstolikih mineralnih struktura unutar dentina kod svih testiranih materijala, ali je najmanja dubina prodora minerala uočena kod BC silera što je takođe pripisano slabijem otpuštanju jona [91].

U novijoj literaturi dostupni su podaci i o bioinduktivnom potencijalu novih biokeramičkih silera. Guven i sar. (2013) su poredili efekte iROOT SP-a i ProRoot MTA na diferencijaciju stem ćelija humanih zuba (hTGSCs) i depoziciju čvrstog tkiva. Analizirana je eksperesija DSPP, kolagena tipa 1A, aktivnost alkalne fosfataze i količina istaloženog kalcijuma i njegovih soli. Zaključili su da oba materijala indukuju diferencijaciju stem ćelija u ćelije nalik odontoblastima. Nešto veći induktivni potencijal MTA u ovom istrživanju povezan je sa trajanjem eksperimenta (14 dana) uz pretpostavku autora da bi duže kultivisanje ćelija moglo dati drugačije rezultate [87].

U studiji Zhang i sar. (2013), takođe je potvrđeno da iROOT SP indukuje osteoblastnu diferencijaciju humanih ćelija pulpe, ali je na osnovu aktivnosti alkalne fosfataze kao i ekspresije različitih markera ćelijske diferencijacije (DSP, OC) suprotno rezultatima prethodne studije, zaključeno da je mineralizaciona sposobnost iROOT SP-a izraženija u odnosu na MTA [205].

2.4. NANOMATERIJALI U ENDODONCIJI

Nanotehnologija je polje primenjene nauke koja se bavi dizajnom, sintezom i primenom uređaja i materijala nano veličine. Veličina čestica nanomaterijala kreće se u rasponu od 1-100 nm. Obzirom da su osnovne funkcionalne strukture ćelija i tkiva, definisane na nanometarskom nivou, nanotehnologijom je moguće sintetisati materijale slične biomolekularnim strukturama.

Nanočestice se ponašaju prema zakonima kvantne fizike i imaju jedinstvene fizičke, hemijske i biološke osobine [110]. Usled toga čestice nanostrukturnih materijala pokazuju drugačija svojstva od čestica istog materijala većih dimenzija.

Generalno, nanotehnologijom se poboljšavaju osobine materijala, smanjuje se njihova masa, povećava stabilnost i unapređuje njihova funkcionalnost. Osnovna prednost nanomaterijala u odnosu na konvencionalne materijale se ogleda u izraženoj aktivnosti čestica koja je posledica velike aktivne površine u odnosu na ukupnu masu i zapreminu čestica. Velika reaktivna površina i mala veličina obezbeđuju izraženiju aktivnost čestica u *in vivo* uslovima [110]. Tako je razvojem nanostrukturnog srebra njegovo antimikrobno delovanje, koje je poznato dugi niz godina, povećano za više od 99%, što je inteziviralo njegovu primenu u medicini [169]. Sintezom kalcijum fosfatnih materijala sa nano veličinom čestica moguće je značajno unaprediti njihova inače neadekvatna mehanička svojstva, pre svega čvrstoću, modul elastičnosti i mikrotvrdoću [39]. Poznato da čestice manje veličine pospešuju hidrataciju materijala te posledično povoljno utiču na njegovo očvršćavanje i vreme vezivanja [7], pa tako nanostruktura materijala rezultira bržim vezivanjem materijala.

U oblastima biomedicine i farmacije, nanomaterijali se od nedavno koriste za dostavu i aplikaciju lekova i u tkivnom inženjeringu. Najčešće korišćene, u ove svrhe su nanočestice različitih polimera (PEI, PLGA, Chitosan), metala (zlato) i keramike (silika, hidroksiapatit) [38]. U oblasti stomatologije, nanostrukturni hidroksiapatit je do sada korišćen u tretmanu koštanih defekata, fraktura, perforacija zuba, cista i lezija oko implanata [169].

Jedno od glavnih pitanja koje se postavlja u vezi sa nanomaterijalima je bezbednost njihove primene. Obzirom da se radi o novoj tehnologiji, uticaj nanočestica i

njihovih degradacionih produkata na zdravlje čoveka tek treba da se ispituju. Dosadašnja istraživanja nanostrukturnog hidroksiapatita su ukazala na biokompatibilno ponašanje ovih čestica. Zhao i sar. (2007) su ispitujući citotoksičnost nanostrukturnog hidroksiapatita različitog oblika čestica (sferični i štapićasti) MTT testom, ustanovili visoku metaboličku aktivnost osteoblasta pacova posle kontakta sa obe vrste nanohidroksiapatita. Osim toga, analizom na SEM-u su uočili izraženiju proliferaciju ćelija na površini hidroksiapatita sa sferičnim česticama, što su objasnili manjim promerom ovih čestica, odnosno većom površnom zonom koja je mogla rezultirati većom adhezijom ćelija [206].

Chen i sar. (2011) su ispitivali uticaj površinskog naelektrisanja čestica nanohidroksiapatita na vijabilnost i proliferaciju osteoblasta MC3T3-E1. Testirani nanostrukturni hidroksiapatit je bez obzira na koncentraciju i naelektrisanje čestica doveo do proliferacije osteoblasta, što je potvrđeno MTT i LDH testom. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) je pokazala da su i pozitivno i negativno naelektisane čestice nanohidroksiapatita penetrirale u ćelije, ali je veće upijanje viđeno sa pozitivno naelektisanim česticama. Dobijene rezultate su objasnili privlačenjem pozitivno naelektrisanih čestica od strane negativno naelektrisanih ćelijskih membrana [38].

U nedavnoj studiji Shagoon i sar. (2013), citotoksičnost nanostrukturnog hidroksiapatita (nHA) je upoređivana sa nanostrukturnim srebrom. Toksičnost materijala u koncentracijama od 5, 10, 20, 30, 40 i 50 ppm, je ispitivana MTT testom na L929 fibroblastima, tokom 24h, 48h i 72h. Sa porastom koncentracije i vremena izlaganja, uočen je samo blag porast toksičnosti nHA koji nije bio statistički značajan. Suprotno tome, nanostrukturno srebro je ispoljilo značajnu toksičnost u koncentraciji ≥ 20 ppm već posle 48h. Razlike u rezultatima autori su objasnili različitim fizičko-hemijskim i strukturalnim karakteristikama materijala odnosno različitom geometrijom i hemijom površine materijala, koje određuju njegovu biokompatibilnost [169].

Od pre par godina, na tržištu Severne Amerike, dostupan je prvi komercijalni nanostrukturni endodontski cement na bazi kalcijum silikata i kalcijum fosfata pod imenom Bioagregat (Bioagregate, Innovative BioCeramix Inc, Vancouver, BC, Canada), sa sličnim indikacijama kao i MTA. Pored kalcijum silikata (dikalcijum i trikalcijum silikat) i hidroksiapatita (monobazni kalcijum fosfat), sadrži još i kalcijum hidroksid i amorfni SiO₂. Materijal ne sadrži aluminijum, a kao rendgen kontrastno

sredstvo je dodat tantalum oksid. De Deus i sar. (2009) su citotoksičnost (izlužaka) ovog materijala ispitivali multiparametrijski (XTT, NR, CV), na ćelijama humane koštane srži. Na bazi dobijenih rezultata su zaključili da Bioagregat, u *in vitro* uslovima, ispoljava biokompatibilnost sličnu belom MTA Angelus-u, ali su takođe uočili da duže izluživanje oba ispitivana materijala (72h/24h) rezultira izraženijom redukcijom vijabilnost ćelija [50].

Khalil i sar. (2013) su poredili sistemske toksične efekte Bioagregata i ProRoot MTA na jetri i bubrezima pacova nakon subkutane implantacije materijala. Zaključili su da oba materijala ispoljavaju toksične efekte na udaljenim organima, ali da je toksičnost MTA izraženija. Izraženije sistemske toksične efekte MTA su pripisali većem sadržaju arsena nego što je dozvoljeno ISO standardom. Po mišljenju ovih autora do ovakvih rezultata mogla je dovesti i produkcija inflamatornih IL-1 i IL-6 citokina u subkutanom tkivu, koji su mogli preći u cirkulaciju i izazvati inflamatorne reakcije u udaljenim organima [116].

Nedavno je patentiran i nano MTA, koji je po svom sastavu sličan belom MTA-u, ali sa značajno manjim česticama. U odnosu na konvencionalni beli MTA, nano MTA se vezuje deset puta brže i pokazuje veću otpornost na kiselu sredinu, veću mikrotvrdoću i duplo manju poroznost [158]. Saghiri i sar. (2013) su u svom istraživanju upoređivali jačinu veze nano MTA, Bioagregata i MTA Angelus-a sa dentinom kanala korena. Poprečne sekcije korenova debljine 2 mm su napunjene test materijalima, a zatim inkubirane u simuliranom tkivnom fluidu tokom 72h. Rezultati push-out testa su ukazali na značajno veće vrednosti za nano MTA u odnosu na ostale test materijale. Bioagregat je, iako po svojoj strukturi takođe nano cement, pokazao manju otpornost na smicanje u odnosu na nano MTA i MTA Angelus [159].

2.5. EKSPERIMENTALNI NANOSTRUKTURNI BIOMATERIJALI NA BAZI AKTIVNIH KALCIJUMSILIKATNIH SISTEMA I HIDROKSIAPATITA

Predmet ovog istraživanja su dva nova, eksperimentalna, nanostrukturna biomaterijala sintetisana u Institutu nuklearnih nauka u Vinči, prema recepturi V. Jokanovića i saradnika. Prvi materijal je na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS), odnosno

na bazi trikalcijum i dikalcijum silikata [Ca_3SiO_5 (C_3S) i $2\beta\text{-CaSiO}_4$ ($\beta\text{-C}_2\text{S}$)]. Drugi materijal je mešavina hidroksiapatita sa kalcijumsilikatnim sistemom (HA-CS). Oba materijala sadrže još brzovezujući dihidrat gipsa ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) i barijum sulfat (BaSO_4) [143].

Materijali su sintetisani nanotehnologijom, odnosno inovativnom kombinacijom hidrotermalne sol-gel metode i metode samosagorevjućih talasa (kombinacija sol-gel i visokotemperaturne sinteze). Za sintezu kalcijumsilikatnog sistema (CS) je upotrebljeno 35.59 g $\text{CaCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Hohenbrunn, Germany) i 15g, 30% silika sol rastvora. Za dobijanje aktivne silikatne faze, trikalcijum silikat (C_3S) i dikalcijum silikat (C_2S) su korišćeni u odnosu 2:1. Ovoj mešavini je dodato 4.55g $\text{Al}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)$ radi dobijanja male količine aktivne C_3A faze (~3%), a zatim i 71.3g NH_4NO_3 (Fluka, Seelze, Germany) u svojstvu oksidacionog sredstva, 53.51 g limunske kiseline ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Alfa Aesar) u svojstvu goriva tokom reakcije sagorevanja i 0.255g pseudo-boemita. Mešavina je sušena na 80°C radi dobijanja gela, a zatim na 150°C radi uklanjanja vode. Porast temperature na 180°C je rezultirao paljenjem gela sa snažnom samosagorevajućom reakcijom uz oslobađanje velike količine gasa. Zatim su, brzim sušenjem na bakarnim pločama, dobijene nisko kristalizovane, visoko reaktivne $\beta\text{-C}_2\text{S}$ i C_3S faze. Dobijeni prah je dalje spaljivan na 650°C tokom 4h, a zatim su mlevenjem u trajanju od nekoliko minuta dobijene čestice male veličine.

Za pripremu finalne mešavine materijala CS pored kalcijumsilikatnog sistema, C_3S i $\beta\text{-C}_2\text{S}$ (60% ukupne količine), korišćeno je još 20% brzovezujućeg gipsa i 20% barijum sulfata [111].

Unapređenom tehnologijom dobijen je kalcijum silikatni materijal u čijoj se strukturi razlikuju tri hijerarhijska nivoa: aglomerati veličine nekoliko mikrometara, koji su izgrađeni od čestica elipsoidnog oblika, veličine 117- 477 nm, koje se sastoje od još manjih elemenata-kristalita, veličine 20 nm [143].

Drugi materijal (HA-CS) je mešavina hidroksiapatita, dobijenog hidrotermalnom metodom i kalcijusilikatnih sistema dobijenim na prethodno opisan način. Finalna mešavina materijala HA-CS se sastoji od 40% hidroksiapatita, 20% CS sistema, 20% brzovezujućeg gipsa i 20% BaSO_4 . Čestice hidrotermalnog hidroksiapatita su nepravilnog, uglavnom kružnog oblika, promera 60 - 470 nm.

U oba materijala dodato je 0.65% PBTCA (2-phosphonobutane-1,2,4-tricarboxylic acid, Syntechem, Changzhou, Jiangsu, China), u svojstvu plastifikatora [111].

Hidratacijom materijala CS i HA-CS nastaju kalcijum silikatni hidratni gel (tobermorit), kristalni kalcijum hidroksid (portlandit) i amorfni Ca(OH)_2 , etringit, amorfna faza nalik etringitu, gips, hidroksiapatit i barit. U hidratisanom CS cementu većina čestica ne prelazi 75 nm, dok u hidratisanom HA-CS cementu prosečna veličina čestica iznosi 170-260 nm [111].

Nanostruktura novosintetisanih materijala obezbeđuje izraženu aktivnost čestica koja rezultira brzim vezivanjem cemenata. Vezivanje materijala CS počinje posle 3 ± 0.1 min, a vezivanje materijala HA-CS posle 5 ± 0.1 min, od početka mešanja materijala sa vodom, a kompletno se završava posle 10 ± 0.15 min (CS) odnosno 15 ± 0.15 min (HA-CS). Kompresivna snaga materijala CS iznosi 29.5 ± 0.5 MPa posle 24h odnosno 35.7 ± 0.5 MPa posle 28 dana. Kompresivna snaga materijala HA-CS iznosi 32.6 ± 0.5 MPa posle 24h odnosno 37.4 ± 0.5 posle 28 dana [143].

Za potrebe ispitivanja mogućnosti primene novosintetisanih nanostrukturnih biomaterijala u svojstvu endodontskih silera, osnovne formulacije materijala CS i HA-CS su modifikovane dodatkom modifikovanih etara skroba, hidroksimetil celuloze i modifikovanih montimorilonita čime su dobijeni CS siler i HA-CS siler. Izmenama u sastavu unapređena je plastičnost i fluidnost materijala i korigovano radno vreme i vreme vezivanja. Vezivanje CS silera počinje nakon 8 minuta, HA-CS silera posle 15 minuta, a završava se nakon 35 minuta (CS siler), odnosno 45 minuta (HA-CS siler), od početka mešanja sa destilovanom vodom. Svi dodaci kojima su modifikovane reološke osobine materijala i vreme vezivanja dodati su u ukupnom iznosu do 3% ukupne mase materijala.

3. CILJ

Osnovni cilj istraživanja je bio da se ispituju fizička i biološka svojstva eksperimentalnih nanostrukturnih biomaterijala na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS), mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS) i silera na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS siler) i mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS siler).

U skladu sa osnovnim ciljem definisani su sledeći zadaci:

1. Ispitati rastvorljivost i poroznost materijala CS i HA-CS i silera CS i HA-CS
2. Ispitati marginalnu mikropropustljivost materijala CS i HA-CS nakon aplikacije u interradiksne perforacije ekstrahovanih zuba
3. Ispitati jačinu veze materijala CS i HA-CS i silera CS i HA-CS sa dentinom kanala korena
4. Ispitati citotoksičnost materijala CS i HA-CS i silera CS i HA-CS u *in vitro* uslovima u kulturi ćelija
5. Ispitati biokompatibilnost i bioinduktivnost materijala CS i HA-CS u *in vivo* uslovima na animalnom modelu

U okviru analize naučne problematike postavljene su sledeće hipoteze:

- Fizička svojstva eksperimentalnih nanostrukturnih biomaterijala na bazi kalcijum silikatnih sistema i mešavine hidroksiapatita i kalcijum silikatnih sistema su komparabilna sa svojstvima komercijalnih materijala sličnog hemijskog sastava
- Eksperimentalni nanostrukturni sileri na bazi kalcijum silikatnih sistema i mešavine hidroksiapatita i kalcijum silikatnih sistema su po svojim fizičkim svojstvima komparabilni sa konvencionalnim kanalnim silerima
- Eksperimentalni nanostrukturni biomaterijali na bazi kalcijum silikatnih sistema i mešavine hidroksiapatita i kalcijum silikatnih sistema poseduju biokompatibilna svojstva i favorizuju reparatorne procese tkiva.

4. MATERIJAL I METODE

Prema postavljenim ciljevima istraživanje je realizovano u dva pravca i to ispitivanjem fizičkih, odnosno ispitivanjem bioloških svojstava eksperimentalnih nanostrukturnih biomaterijala. Istraživanja su odobrena od strane Etičkog odbora Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (Protokol br. 36/21, 20/06/2013).

4.1. ISPITIVANJE FIZIČKIH SVOJSTAVA NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI KALCIJUMSILIKATNIH SISTEMA I MEŠAVINE HIDROKSIAPATITA I KALCIJUMSILIKATNIH SISTEMA

Ispitivanje fizičkih svojstava materijala je realizovano u Laboratoriji za istraživanja dentalnih materijala na Klinici za bolesti zuba i endodonciju, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

4.1.1. ISPITIVANJE RASTVORLJIVOSTI I POROZNOSTI

4.1.1.1. Testirani materijali

Testirani su materijal na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS) i materijal na bazi mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS). Kao kontrolni materijal korišćen je beli Mineral Trioksid Agregat, MTA (White MTA, Angelus® Soluções odontológicas Londrina, Brazil). Takođe su testirani sileri na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS siler) i mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS siler). Kao kontrolni siler korišćen je Acroseal (Septodont, France).

4.1.1.2. Priprema uzoraka

Eksperimentalni materijali (zamešani sa destilovanom vodom u odnosu 3:1) i kontrolni materijali (zamešani prema upustu proizvođača) su postavljeni u plastične kalupe prečnika $5 \pm 0,1$ mm i dubine $2 \pm 0,1$ mm. Za svaki materijal napravljeno je po 5 uzoraka. Nakon vezivanja materijala u inkubatoru na 37°C tokom 24 h, uzorci materijala su izvađeni iz kalupa i izmereni na vagici (Acculab, Sartorius group, Getingen, Germany) sa preciznošću od 0,0001 g. Dobijene vrednosti označene su kao inicijalna suva masa materijala (m_1). Posle izračunavanja zapremine (V) uzoraka vezanih materijala, uzorci su (svaki posebno) postavljeni u plastične kontejnere sa 5 mL veštačkog tkivnog fluida (engl. Hank's balanced salt solution, HBSS). Uzorci materijala, u zatvorenim plastičnim kontejnerima, su potom inkubirani na 37°C , tokom 28 dana.



Slika 1. Kalup za pripremu uzoraka materijala

4.1.1.3. Merenje upijanja tečnosti (bubrenja materijala) tokom 28 dana u veštačkom tkivnom fluidu

Merenje količine upijene tečnosti (bubrenje uzoraka materijala) realizovano je u 5 vremenskih intervala, posle 1, 7, 14, 21 i 28 dana od potapanja uzoraka u veštački tkivni fluid. U navedenim vremenskim intervalima, uzorci materijala su izvađeni iz tečnosti, blago posušeni filter papirom i izmereni, a zatim vraćeni u veštački tkivni fluid. Izmerene vrednosti mase uzoraka označene su kao masa (m) uzoraka u ispitivanim vremenskim intervalima. Količina upijene tečnosti (bubrenje uzoraka) u svakom ispitivanom vremenskom intervalu izračunata je prema formuli:

$$\text{Upijena tečnost (bubrenje uzoraka)} = (m - m_1) / V$$

4.1.1.4. Merenje sorpcije tečnosti, rastvorljivosti i poroznosti materijala posle 28 dana u veštačkom tkivnom fluidu

Posle 28 dana, uzorci su izvađeni iz veštačkog tkivnog fluida, i izmerena masa uzoraka materijala označena je kao m_2 . Zatim su uzorci isušeni silica gelom do uspostavljanja konstantne mase (24 h), koja je označena kao finalna suva masa materijala, m_3 . Za svaki uzorak testiranih materijala potom su izračunate vrednosti sorpcije tečnosti, rastvorljivosti i poroznosti materijala prema sledećim formulama [65]:

$$\text{Sorpcija tečnosti } (\mu\text{g}/\text{mm}^3) = (m_2 - m_3) / V$$

$$\text{Rastvorljivost } (\mu\text{g}/\text{mm}^3) = (m_1 - m_3) / V$$

$$\text{Poroznost } (\%) = [(m_2 - m_1) / m_1] \times 100$$



Slika 2. Vagica za merenje mase uzoraka materijala

Vrednosti apsorpcije tečnosti i rastvorljivosti materijala, posle 28 dana u veštačkom tkivnom fluidu, izražene su takođe i u procentima (%) prema formulama [77]:

$$\text{Apsorpcija tečnosti } (\%) = [(m_2 - m_3) / m_3] \times 100$$

$$\text{Rastvorljivost } (\%) = [(m_3 - m_1) / m_1] \times 100$$

4.1.1.5. Ispitivanje rastvorljivosti i poroznosti silera

Na osnovu pilot studije, u kojoj je uočeno da eksperimentalni sileri na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS siler) i mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS siler) pokazuju znake dezintegracije posle 7 dana u veštačkom tkivnom fluidu, njihova rastvorljivost i poroznost testirana je posle eksperimentalnog perioda od 24h. Priprema uzoraka silera realizovana je po istom protokolu kao i za osnovne formulacije materijala, CS i HA-CS. Kao kontrolni siler korišćen je Acroseal (Septodont, France). Posle 24h u veštačkom tkivnom fluidu apsorpcija tečnosti i rastvorljivost testiranih silera izračunate su prema sledećim formulama [77]:

$$\text{Apsorpcija tečnosti (\%)} = [(m_2 - m_3) / m_3] \times 100$$

$$\text{Rastvorljivost (\%)} = [(m_3 - m_1) / m_1] \times 100$$

4.1.1.6. Statistička analiza

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni primenom jednofaktorskog ANOVA testa sa Tukey post-hoc testom. Nivo značajnosti utvrđen je na $\alpha = 0.05$.

4.1.2. ISPITIVANJE MARGINALNE MIKROPROPUSTLJIVOSTI

4.1.2.1. Testirani materijali

Testirani su materijal na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS) i materijal na bazi mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS). Kao kontrolni materijal je korišćen beli MTA (MTA Angelus®).

4.1.2.2. Priprema uzoraka

Istraživanje je realizovano na 34 humana, ekstrahovana, maksilarna i mandibularna molara sa potpuno razvijenim i nefuzionisanim korenovima. Pristupni kaviteti su preparisani visokoturažnom bušilicom, nakon čega je ručnim K turpijama (K-files, VDW GmbH, Germany) utvrđena radna dužina kanala korena, na 1mm kraće od anatomskog foramena. Kanali korena su preparisani Crown-Down tehnikom, serijom mašinskih endodontskih instrumenta Bio Race (FKG Dentaire, Swiss Dental Products, Switzerland) do # 30 na radnoj dužini. Tokom instrumentacije, kanali su ispirani 0.5% NaOCl-om. Za finalno ispiranje je korišćeno 5 ml 10% limunske kiseline (tokom 1 minuta) i 5 ml 0.5% NaOCl-a. Kanali su posušeni papirnim poenima i opturisani monokonom tehnikom uz siler Acroseal (Septodont, France), a zatim inkubirani 7 dana, u suvoj sredini na 37°C.

Po vezivanju silera, u centru poda pulpne komore, kolenjakom i okruglim borerom veličine #4, preparisane su interradiksne perforacije. Širina perforacija je odgovarala promeru borera, dok je dubina zavisila od debljine poda pulpne komore. Posle ispiranja preparisanih kaviteta destilovanom vodom i sušenja, zubi su nasumično podeljeni u tri eksperimentalne grupe sa po 10 zuba:

Grupa 1: za zatvaranje perforacija je korišćen materijal CS

Grupa 2: za zatvaranje perforacija je korišćen materijal HA-CS

Grupa 3: za zatvaranje perforacija je korišćen MTA

Pozitivnu kontrolnu grupu su činila dva zuba kod kojih perforacije nisu zatvorene materijalima. Negativnu kontrolnu grupu činila su dva intaktna zuba bez perforacija.

Pre aplikacije testiranih materijala, zubi su do nivoa gleđno-cementne granice postavljeni u sunder natopljen veštakim tkivnim fluidom (engl. Hank's balanced salt solution, HBSS). Materijali su zamešani metalnim špatulama na sterilnim staklenim pločicama i u kavitete kondezovani amalgamskim nabijačima. CS i HA-CS su zamešani sa destilovanom vodom u odnosu 3:1. MTA je zamešan prema upustu proizvođača. Preko materijala je postavljena vlažna vatica, a zatim su zubi inkubirani na 37°C tokom 24 h. Po vezivanju materijala pristupni kaviteti su definitivno zatvoreni kompozitom i zubi su, u sunderu natopljenim veštačkim tkivnim fluidom, inkubirani na 37°C, narednih 6 meseci.

4.1.2.3. Merenje marginalne mikropropustljivosti testom prodora boje

Posle 6 meseci, marginalna mikropropustljivost je ispitivana metodom pasivnog prodora boje. Zubi su premazani sa dva sloja laka, osim u predelu materijala u furkaciji (1mm oko materijala). Zatim su potopljani u 50% rastvor srebrnog nitrata (AgNO_3) tokom 2 h, a potom isprani u fotografskom razvijaju tokom narednih 6 h. Zubi su longitudinalno sečeni u predelu perforacija, dijamantskim diskom debljine 0.7 mm, linearnom preciznom testerom sa vodenim hlađenjem (Isomet testera 4000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA).



Slika 3. Longitudinalni presek zuba u predelu interradiksne furkacije

Prodor boje između materijala i zidova kaviteta je analiziran svetlosnim mikroskopom i fotografisan na uveličanju x30. Merenje dubine prodora boje je realizovano metodom kvantifikovanja vizuelnih informacija kompjuterskim programom za obradu slike (Adobe Photoshop CS5 Extended, verzija 12.0 x 32). Dobile vrednosti su izražene u milimetrima.

4.1.2.4. Statistička analiza

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni primenom jednofaktorskog ANOVA testa sa Tukey post-hoc testom. Nivo značajnosti utvrđen je na $\alpha = 0.05$

4.1.3. ISPITIVANJE JAČINE VEZE MATERIJALA SA DENTINOM KANALA KORENA

4.1.3.1. Testirani materijali

Testirani su materijal na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS), materijal na bazi mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS), i sileri na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS siler) i mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS siler). Kao kontrolni materijali su korišćeni beli MTA (MTA Angelus®) i konvencionalni siler na bazi kalcijum hidroksida, Acroseal (Septodont, France).

4.1.3.2. Priprema uzoraka materijala i silera - dentinski diskovi

Istraživanje je realizovano na jednokorenim, ekstrahovanim humanim zuba približne dužine korenova. Zubi su ukalupljeni u gips, a zatim su korenovi sečeni perpendikularno u odnosu na uzdužnu osovinu zuba, dijamantskom testerom promera 0,7 mm sa vodenim hlađenjem (Isomet testera; Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Na svakom zubu, isečene su tri poprečne sekcije, debljine $2 \pm 0,1$ mm. Prostori kanala korena svakog uzorka (poprečne sekcije korena) prošireni su dijamantskim borerom dijametra 1.3 mm u specijalno konstruisanoj stonoj bušilici u cilju dobijanja standardizovanih kaviteta prečnika (1.3 mm).



Slika 4. Stona bušilica za preparaciju kaviteta na dentinskim diskovima

Dentinski diskovi potom su potopljeni u 17% rastvor EDTA tokom 60 s, isprani destilovanom vodom i posušeni, a zatim nasumično podeljeni u 6 grupa (n=8):

Grupa 1: Kaviteti ispunjeni materijalom CS

Grupa 2: Kaviteti ispunjeni materijalom HA-CS

Grupa 3: Kaviteti ispunjeni materijalom MTA

Grupa 4: Kaviteti ispunjeni silerom CS

Grupa 5: Kaviteti ispunjeni silerom HA-CS

Grupa 6: Kaviteti ispunjeni silerom Acroseal

Materijali CS i HA-CS, kao i sileri CS i HA-CS su zamešani sa destilovanom vodom u odnosu 3:1. Kontrolni materijali su zamešani prema upustu proizvođača. Nakon mešanja, materijali su postavljani u preparisane kavitete, a višak materijala je uklonjen plastičnim instrumentom. Svi uzorci su potom uvijeni u gazu natopljenu PBS-om, i u zatvorenim plastičnim kontejnerima inkubirani na 37°C tokom 7 dana.

Merenje jačine veze testom smicanja- “push-out”

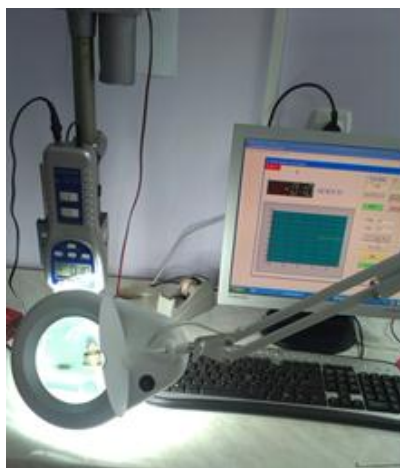
Posle 7 dana, merenje jačine veze materijala sa dentinom je realizovano testom smicanja, na univerzalnom meraču sile (PCE-FM 200, PCE group, Germany). Uzorci su fiksirani na metalne nosače sa centralnom šupljinom većom od najvećeg dijametra kanala kako bi se omogućila nesmetana dislokacija kanalnog punjenja (materijala). Uzorci su izloženi sili pri konstantnoj brzini utiskivača od 1mm/min, do momenta dislociranja (frakture) materijala. Sila je aplikovana putem metalnog utiskivača promera 1 mm, koji je prilikom utiskivanja bio u kontaktu samo sa kanalnim punjenjem (materijalom). Vrednosti sile u momentu frakture materijala su snimane u programu Lutron (specifično dizajniranom za pomenuti merač sile) i izražene u Njutnima. Jačina veze materijala sa dentinom korena je izražena u MPa i izračunata je prema formuli (86):

$$\text{Jačina veze (MPa)} = F / \pi \times d \times h$$

F - maksimalna vrednost sile u Njutnima (N)

d - dijametar kaviteta (1.3mm)

h - debljina sekcije korena (2 mm)



Slika 5. Univerzalni merač sile

4.1.3.3. Priprema uzoraka silera - konvencionalni metod

Istraživanje je obavljeno na 30 maksilarnih, centralnih sekutića, približne dužine korenova. Nakon preparacije pristupnih kaviteta i trepanacije krova pulpne komore, radna dužina kanala je utvrđena ručnim K turpijama (K-files, VDW GmbH, Germany) na 1 mm kraće od anatomskog foramena. Kanali korena su preparisani Crown - Down tehnikom, serijom mašinskih endodontskih instrumenata Bio RaCe (FKG Dentaire, Swiss Dental Products, Switzerland) do veličine #35 na radnoj dužini. Između instrumenata, kanali su ispirani sa 2 mL, 0.5% NaOCl-a. Za finalno ispiranje je korišćeno 5 mL 10% limunske kiseline (tokom 1 minuta) i 5 mL 0.5% NaOCl-a. Nakon toga, kanali su posušeni papirnim poenima i zubi nasumično podeljeni u tri grupe od po 10 uzoraka:

Grupa 1: Za opturaciju kanala korena je korišćen CS siler

Grupa 2: Za opturaciju kanala korena je korišćen HA-CS siler

Grupa 3: Za opturaciju kanala korena je korišćen Acroseal

Sileri CS i HA-CS su zamešani sa destilovanom vodom u odnosu 3:1. U kanale korena su aplikovani lentulo spiralom a zatim kompaktovani ručnim kompakterima. Acroseal je zamešan prema uputstvu proizvođača i u kanale korena aplikovan lentulo spiralom. Za opturaciju su korišćeni samo navedeni sileri bez gutaperka poena.

Pristupni kaviteti potom su privremeno zatvoreni, a zubi postavljeni u sunder natopljen veštačkim tkivnim fluidom, do nivoa cemento-gleđne granice i inkubirani na 37°C, tokom 7 dana do potpunog vezivanja silera. Zatim su ukalupljeni u gips i isečeni perpendikularno u odnosu na uzdužnu osovinu dijamantskom testerom promera 0.7 mm (Isomet). Kod svakog zuba isečene su 3 poprečne sekcije, debljine 1 ± 0.1 mm, u srednjoj trećini korena. Adhezivna površina svakog uzorka je izračunata prema formuli (57):

$$\text{Adhezivna površina uzorka silera (mm}^2\text{)} = [(D1+D2) / 2] \times \pi \times h$$

D1 - najveći dijametar uzorka

D2 - najmanji dijametar uzorka

π – 3.14

h – debljina uzorka

Merenje jačine veze testom smicanja – “ push-out”

Merenje jačine veze testom smicanja realizovano je prema protokolu opisanom za testiranje dentinskih diskova. Jačina veze materijala sa dentinom kanala korena izražena je u MPa i izračunata prema formuli (57):

$$\text{Jačina veze (MPa)} = F_{\text{max}} / \text{adhezivna površina uzorka}$$

4.1.3.4. Analiza fraktura materijala

Poprečne sekcije korenova analizirane su na svetlosnom mikroskopu na uveličanju x 30, da bi se utvrdio tip nastale frakture, koje su klasifikovane kao: adhezivne (na spoju materijala i dentina), kohezivne (unutar materijala ili dentina) i mešovite.

4.1.3.5. Statistička analiza

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni primenom jednofaktorskog ANOVA testa sa Tukey post-hoc testom. Nivo značajnosti utvrđen je na $\alpha = 0.05$.

4.2. ISPITIVANJE BIOLOŠKIH SVOJSTAVA NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI KALCIJUMSILIKATNIH SISTEMA I MEŠAVINE HIDROKSIAPATITA I KALCIJUMSILIKATNIH SISTEMA

4.2.1. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI MATERIJALA: *IN VITRO* STUDIJA

Ispitivanje citotoksičnosti materijala je realizovano na Biološkom fakultetu, Univeziteta u Beogradu. Ispitivanje je sprovedeno u skladu sa preporukama međunarodnog ISO standarda (ISO 10993-5:2009, Part 5: Test for cytotoxicity: *in vitro* method).

4.2.1.1. Testirani materijali

Ispitivana je citotoksičnost materijala na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS), mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS) i citotoksičnost silera na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS siler) i silera na bazi mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS siler). Kao kontrolni materijali korišćeni su beli MTA (MTA Angelus®). Testirana je citotoksičnost svežih rastvora materijala i silera, odnosno citotoksičnost izlužaka vezanih materijala i silera.

Priprema svežih rastvora materijala

Stok svežih rastvora materijala i silera (4 ml) je pripremljen rastvaranjem praha testiranih materijala u hranljivom medijumu (Dulbecco Modified Eagle Medium, DMEM; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), u odnosu 100 mg/1 mL. Citotoksičnost svežih rastvora materijala i silera je testirana u četiri opadajuće koncentracije: 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL i 12.5 mg/mL (1:1, 1:2, 1:4, 1:8).

Priprema izlužaka vezanih materijala

Eksperimentalni materijali su zamešani sa destilovanom vodom u odnosu 3:1. MTA je zamešan sa destilovanom vodom u odnosu 3:1, prema uputstvu proizvođača. Pripremljeni materijali su postavljeni u plastične kalupe prečnika 5 mm i dubine 2 mm.

Za svaki materijal je napravljeno po 12 uzoraka, nakon čega su uzorci inkubirani 24h, na 37°C do potpunog vezivanja materijala. Uzorci materijala su potom sterilisani UV svetlošću tokom 30 minuta, a zatim postavljeni u 12-bunarske ploče za kultivisanje, po dva uzorka svakog materijala u 2 mL hranljivog medijuma (DMEM) po bunaru. Odnos površine uzorka i zapremine medijuma iznosio je približno 71 mm²/mL. U cilju izluživanja materijala uzorci su u zatvorenim pločama za kultivisanje inkubirani u atmosferi sa 5% CO₂ na 37°C tokom 21 dana. Testirana je citotoksičnost nerazblaženih, 100% i razblaženih, 50% (nerazblaženi izlušci:medijum, 1:1) izlužaka materijala i silera posle 24h, 7 dana i 21 dan izluživanja.

Pre ispitivanja citotoksičnosti, sveži rastvori materijala i izlušci vezanih materijala su sterilisani filtriranjem kroz 0.45 µm filtere (SMI-Labhut Ltd, Gloucester, GL28EY, UK).

4.2.1.2. Ćelijska kultura

Citotoksičnost materijala je ispitivana na humanim fibroblastima pluća MRC-5 (ECACC N°84101801). Ćelije su gajene na standardan način, u flaskovima površine 75cm² (Sarstedt Inc, Newton, NC, USA), u hranljivom medijumu (DMEM) uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma, 2 mL L-glutamina i 100 IU/ml pencilin/streptomicina. Ćelijske kulture su inkubirane na 37°C, u atmosferi vazduha sa 5% CO₂ (MRC Scientific instruments, Holon, Israel) do formiranja monoslojne kulture, što je potvrđeno svetlosnim mikroskopom (Boeko, Germany). Ćelije su potom isprane fiziološkim rastvorom, odvojene 0.25% tripsinom, centrifugirane i resuspendovane u hranljivom medijumu. Vijabilnost ćelija je proverena 0.4% tripan blu rastvorom, nakon čega je određen ukupan broj ćelija. Ćelije su zatim zasejavane u 96-bunarske mikrotitarske ploče (10 000 ćelija / 100 µL medijuma po bunaru) i inkubirane 24 h do formiranja monosloja.

4.2.1.3. Test citotoksičnosti

Iz mikrotitarskih ploča je uklonjen medijum a u bunare sa ćelijama je dodato po 200 µL testiranih materijala. Sveži rastvori materijala i izlušci vezanih materijala u svakoj gore pomenutoj koncentraciji su testirani u po 6 bunara. Pozitivna kontrola (medijum) i

negativna kontrola (ćelije bez materijala) su takođe testirane u po 6 bunara. Kompletna procedura je izvedena pod aseptičnim uslovima u Laminaru (BIO-CL-130, EHRET GmbH & CO.KG). Po dodavanju materijala, mikrotitarske ploče sa ćelijama su inkubirane 20h u atmosferi sa 5% CO₂ na 37°C. Nakon toga materijali su uklonjeni a ćelije isprane fiziološkim rastvorom. Citotoksičnost materijala je određivana MTT testom, korišćenjem 1-(dimethyliazol-2-yl) -2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT), kao indikatora ćelijske vijabilnosti. U svaki bunar dodato je 200 µl, 10% MTT (20 µL MTT u 180 µl medijuma), nakon čega su ploče inkubirane 3 h. Posle pažljivog uklanjanja MTT-a, u svaki bunar je dodato 200 µL dimetil sulfoksida (DMSO), da bi se rastvorili formirani kristali formazana. Optička gustina rastvorenih produkata formazana kvantifikovana je spektrofotometrijski na ELISA čitaču (Termo Scientific Multiscan FC, Finland) na talasnoj dužini od 570 nm. Procenat vijabilnosti ćelija izračunat je prema formuli:

$$100\% \times (\text{OD test materijal} - \text{OD medijum}) / (\text{OD kontrola} - \text{OD medijum})$$

4.2.1.4. Analiza pH vrednosti svežih rastvora materijala i izlužaka vezanih materijala

Vrednosti pH svežih rastvora materijala merene su u periodu do 30 minuta od rastvaranja materijala u medijumu, a vrednosti pH izlužaka nakon 24 h, 7 dana i 21 dana izluživanja. Merenja su realizovana kalibrisanim pH metrom (Cyberscan pH 510, Eutech Instruments Europe B.V, Landsmeer, The Netherlands).

4.2.1.5. Statistička analiza

Rezultati citotoksičnosti izlužaka statistički su obrađeni primenom trofaktorskog ANOVA testa za faktore materijal, koncentracija i vreme, a takođe je testirana i interakcija između faktora. Rezultati citotoksičnosti svežih rastvora materijala su statistički obrađeni primenom dvofaktorskog ANOVA testa. U slučaju postojanja značajnih interakcija, jednofaktorska ANOVA sa Tukey post-testom je korišćena za utvrđivanje razlika između materijala po pitanju koncentracije i vremena. Nivo značajnosti utvrđen je na $\alpha = 0.05$.

4.2.2. ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI I BIOINDUKTIVNOSTI:

IN VIVO STUDIJA

Istraživanje je realizovano na Institutu za hirurgiju Veterinarskog fakulteta i na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

4.2.2.1. Subjekti

Eksperimenti su sprovedeni u skladu sa principima Vodiča Nacionalnog Instituta za zdravlje, brigu i korišćenje laboratorijskih životinja i prema međunarodnom standardu ISO 10993-2. Animalni model u ovom istraživanju bila su četiri kunića (*Oryctolagus cuniculus*), oba pola, starosti oko 12 meseci i prosečne težine oko 4 kg. Životinje su bile smeštene u prostoru za eksperimentalne životinje na Veterinarskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, svaka u svom kavezu, u kontrolisanoj sredini, sa kontrolisanom ishranom i dnevnom profesionalnom negom.

4.2.2.2. Testirani materijali

Testirani su materijal na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS) i materijal na bazi mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS). Kao kontrolni materijal je korišćen beli MTA (MTA Angelus®).

4.2.2.3. Anestezija

Opšta anestezija kunića je realizovana premedikacijom Ksilazinom (2% Xylazin, 5mg/kg telesne težine, Cp Pharma, Bergdorf, Germany) intramuskularno, a zatim kombinacijom Ketamina (Laboratorio Sanderso S.A., Santiago, Chile) u dozi od 35mg/kg telesne težine i Acepromazina (Acepromazine 50 mL, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., USA) u dozi od 1mg/kg telesne težine. Trajanje anestezije je iznosilo prosečno oko 100 minuta.

4.2.2.4. Hiruška procedura

Nakon dezinfekcije operativnog polja rastvorom povidon jodida, dijamantskim borerom su formirani kaviteti I klase na oralnoj površini centralnih sekutića. Sterilnim karbidnim borerima je uklonjen krov zubne komore i koronarna pulpa. Korenska pulpa je uklonjena pulpektirpatorima, a kanali obilno isprani fiziološkim rastvorom. Kanali korena su instrumentirani ručnim K turpijama (K-files, VDW GmbH, Germany) uz obilno ispiranje fiziološkim rastvorom između instrumenata. Posle sušenja papirnim poenima, kanali su napunjeni sveže zamešanim materijalima. CS i HA-CS su pripremljeni sa destilovanom vodom u odnosu 3:1 prema. MTA je pripremljen sa destilovanom vodom prema upustu proizvođača, u odnosu 3:1. MTA je postavljan u gornji desni sekutić, dok su materijali CS i HA-CS postavljeni u preostala tri sekutića. Svi materijali su zamešani metalnim špatulama na sterilnim staklenim pločicama. U kanale korena materijali su unošeni lentulo spiralom a zatim kompakтовani ručnim kompakterima za vertikalnu kompaktaciju. Pristupni kaviteti su zatvoreni smolom modifikovanim glas jonomer cementom (GC FUJI VIII; GC Corporation, Tokyo, Japan).

Životinje su postoperativno smeštene u individualne kaveze i svakodnevno kontrolisane. Žrtvovane su posle 28 dana intravenskom injekcijom od 10 ml rastvora Pentobarbitola (Pentobarbital sodium salt 100 mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

4.2.2.5. Preparacija tkiva

Posle uklanjanja mekih tkiva, mandibula i maksila su odvojene od ostatka lobanje, a zubi isečeni dijamantskom šajbnom i fiksirani u 4% formalinu.

Svi uzorci su dekalcinisani u rastvoru za dekalcinaciju: 8% HCl iz 37% (v/v) koncentrata i 10% HCOOH iz 89% (v/v) koncentrata u PBS-u tokom 24 h na 37°C. Nakon dekalcinacije tkivo je fiksirano u kružnom tkivnom procesoru (Leica TP 1020, Germany), a potom kalupljeno u parafinske blokove. Iz parafinskih kalupa sečeni su serijski tkivni preseći (sa svakog uzorka po 8) debljine 5 µm. Preparati su standardno bojani hematoksilin eozin (HE) bojenjem.

Mikroskopski preparati su analizirani optičkom mikroskopijom uz primenu programa za morfometriju Software «Cell-B» by Olympus, mikroskopom Olympus 5, na uveličanjima x40, x100 i x200. Uz navedeni softver, patohistološki parametri su analizirani kvalitativno, semikvantitativno i kvantitativno. Istraživač koji je histološki analizirao uzorke nije bio upoznat kom materijalu pripada ispitivani uzorak.

4.2.2.6. Histološko ocenjivanje

Histomorfometrijska analiza tkiva je realizovana ocenjivanjem sledećih parametara:

- **Inflamatorna reakcija**

Intezitet inflamatorne reakcije	
Ocena 1	Odsustvo zapaljenja ili samo par ćelija zapaljenja
Ocena 2	Blago zapaljenje sa manje od 10 ćelija zapaljenja
Ocena 3	Umereno zapaljenje sa 10-25 ćelija zapaljenja
Ocena 4	Intezitevno zapaljenje sa više od 25 ćelija zapaljenje
Ekstenzija inflamatorne reakcije	
Ocena 1	Odsustvo ćelija zapaljenja
Ocena 2	Ćelije zapaljenja samo uz novostvoreno kalcifikovano tkivo ili materijal
Ocena 3	Ćelije prisutne dublje u tkivu
Ocena 4	Tkivo u potpunosti infiltrirano ćelijama zapaljenja ili nekrotično
Generalno stanje tkiva	
Ocena 1	Nema zapaljenske reakcije
Ocena 2	Prisutna zapaljenska reakcija
Ocena 3	Prisustvo abscesa
Ocena 4	Prisustvo nekroze

- **Novostvoreno kalcifikovano tkivo**

Kontinuitet	
Ocena 1	Kontinuirano novostvoreno kalcifikovano tkivo
Ocena 2	Minimalni diskontinuiteti u novostvorenom kalcifikovanom tkivu
Ocena 3	Minimalna količina novostvorenog kalcifikovanog tkiva
Ocena 4	Odsustvo novostvorenog kalcifikovanog tkiva
Morfologija	
Ocena 1	Novostvoreno tkivo regularne građe
Ocena 2	Iregularno kalcifikovano tkivo
Ocena 3	Tanak sloj kalcifikovanog tkiva
Ocena 4	Odsustvo kalcifikovanog tkiva
Debljina	
Ocena 1	Više od 250 μm
Ocena 2	150 -250 μm
Ocena 3	1 – 149 μm
Ocena 4	Odsustvo kalcifikovanog tkiva

- **Drugi nalazi u tkivu**

Džinovske ćelije	
Ocena 1	Prisutne
Ocena 2	Prisutne u malom broju
Ocena 3	Prisutne u umerenom broju
Ocena 4	Nekroza tkiva
Čestice materijala	
Ocena 1	Odsutne
Ocena 2	Prisutne u maloj količini
Ocena 3	Prisutne u umerenoj količini
Ocena 4	Prisutne u velikoj količini
Mikroorganizmi	
Ocena 1	Odsutni
Ocena 2	Prisutni

*Navedeni parametri ocenjivani su po modifikovanim kriterijumima Accorinte i sar. [1].

4.2.2.7. Statistička analiza

Za statističku analizu dobijenih rezultata korišćen je neparametrijski Kruskal-Wallis test i Dunn-ov post-hoc test za ispitivanje značajnosti razlika između parova, sa nivoom značajnosti od $\alpha=0.05$. Statistička analiza je urađena u softverskom paketu Minitab 16 (Minitab INC. State College, PA, USA).

5. REZULTATI

5.1. REZULTATI ISPITIVANJA FIZIČKIH SVOJSTAVA MATERIJALA

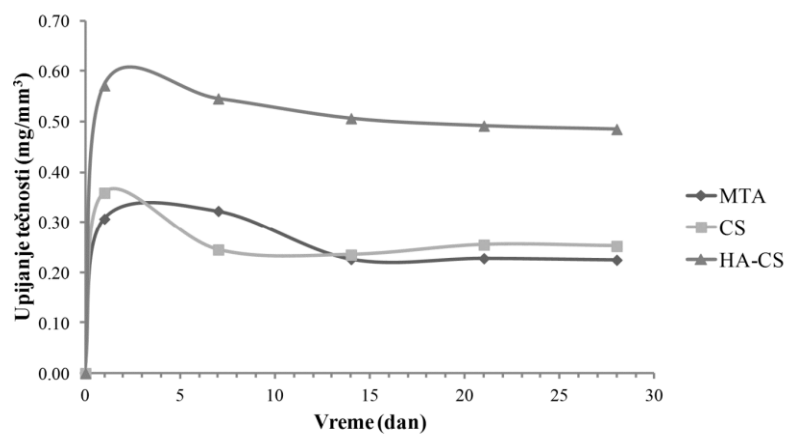
5.1.1. REZULTATI ISPITIVANJA RASTVORLJIVOSTI I POROZNOSTI

Rezultati ispitivanja rastvorljivosti i poroznosti materijala CS i HA-CS i silera CS i HA-CS su prikazani u tabelama 1-3 i na grafikonima 1-4.

Tabela 1. Srednje vrednosti i standardne devijacije mase uzoraka materijala (mg) tokom 28 dana u veštačkom tkivnom fluidu.

	m_1	24h	7 dan	14 dan	21 dan	28 dan
MTA	99.0 ± 2.8	111.0 ± 3.9	111.7 ± 3.3	107.9 ± 4.6	107.9 ± 4.5	107.8 ± 5.0
CS	99.2 ± 2.9	113.3 ± 3.3	108.8 ± 4.3	108.4 ± 4.0	109.2 ± 4.3	109.1 ± 4.2
HA-CS	73.8 ± 2.2	96.3 ± 1.8	95.2 ± 2.3	93.7 ± 2.1	93.1 ± 2.1	92.9 ± 1.7

* m_1 - srednje vrednosti i standardne devijacije inicijalne mase uzoraka materijala potapanja u veštački tkivni fluid.



Grafikon 1. Upijanje tečnosti (bubrenje uzoraka) testiranih materijala tokom 28 dana u veštačkom tkivnom fluidu.

Najveće upijanje tečnosti (bubrenje uzoraka) kod svih ispitivanih materijala, uočeno je posle 24h od potapanja uzoraka u veštački tkivni fluid. U ostalim eksperimentalnim intervalima (7, 14, 21 i 28 dan), nisu uočene značajnije promene mase uzoraka ni kod jednog testiranog materijala.

Najmanje upijanje tečnosti (bubrenje uzoraka) uočeno je kod MTA (0.31 ± 0.03 mg/mm³), a slične vrednosti izmerene su i za materijal CS (0.36 ± 0.01 mg/mm³). Najveće upijanje tečnosti izmereno je kod materijala HA-CS (0.57 ± 0.03 mg/mm³).

Izraženo u procentima, u odnosu na inicijalnu masu uzoraka (m_1), posle 24h u veštačkom tkivnom fluidu, masa uzoraka MTA uvećana je za 12.1%, materijala CS za 14.2% , a materijala HA-CS za 30.8%. Nisu uočene statistički značajne razlike u upijanju tečnosti (bubrenju uzoraka) između materijala CS i MTA. Kod uzoraka materijala HA-CS uočeno je značajno veće upijanje tečnosti (bubrenje uzoraka) u odnosu na materijale CS i MTA ($p < 0.05$).

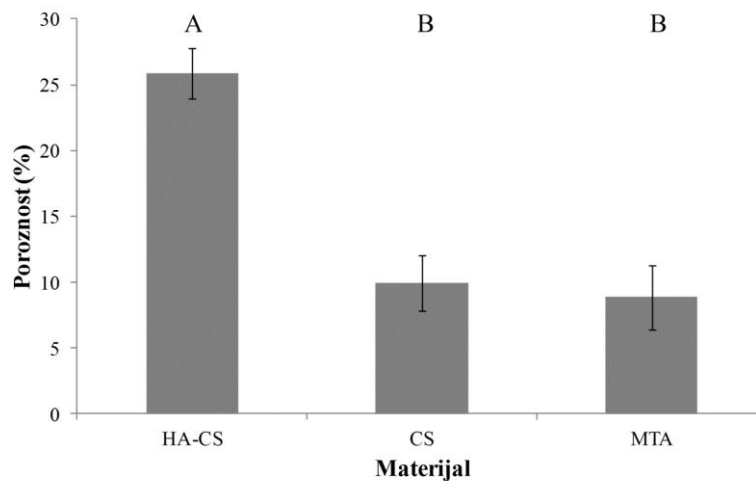
Tabela 2. Srednje vrednosti i standardne devijacije mase uzoraka materijala (mg)

Materijal	m_1	m_2	m_3
MTA	99.0 ± 2.8	107.8 ± 5.0	94.9 ± 4.4
CS	99.2 ± 2.9	109.1 ± 4.2	93.4 ± 4.7
HA-CS	73.8 ± 2.2	93.1 ± 2.1	64.3 ± 1.6

* m_1 - inicijalna masa uzoraka materijala pre potapanja u veštački tkivni fluid

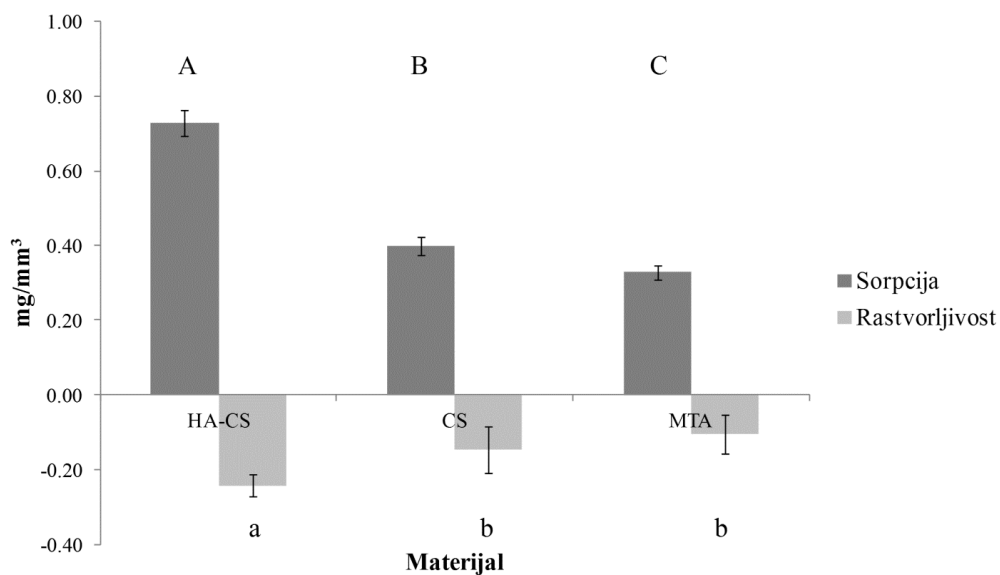
* m_2 - masa uzoraka materijala posle 28 dana u veštačkom tkivnom fluidu

* m_3 - masa uzoraka materijala nakon isušivanja



Grafikon 2. Srednje vrednosti i standardne devijacije poroznosti testiranih materijala. Kolone označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p > 0.05$).

Nisu uočene statistički značajne razlike u poroznosti materijala MTA (8.86%) i materijala CS (9.96%). Poroznost materijala HA-CS iznosila je 25.87% i bila je značajno veća u odnosu na poroznost materijala CS i MTA ($p < 0.05$).



Grafikon 3. Prosečne vrednosti i standardne devijacije sorpcije tečnosti i rastvorljivosti testiranih materijala posle 28 dana u veštačkom tkivnom fluidu. Kolone označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p > 0.05$).

Posle 28 dana u veštačkom tkivnom fluidu, najmanja sorpcija tečnosti izmerena je kod materijala MTA ($0.33 \pm 0.02 \text{ mg/mm}^3$). Kod materijala CS, izmerene vrednosti bile su nešto veće ($0.40 \pm 0.02 \text{ mg/mm}^3$), dok je najveća sorpcija tečnosti uočena kod materijala HA-CS ($0.73 \pm 0.03 \text{ mg/mm}^3$). Izraženo u procentima u odnosu na inicijalnu masu materijala apsorpcija tečnosti, tokom 28 dana u veštačkom tkivnom fluidu, iznosila je 14.0% za MTA, 16.8% za materijal CS i 44.5% za materijal HA-CS. Uočene razlike u apsorpciji tečnosti između ispitivanih materijala bile su statistički značajne ($p < 0.05$).

Najmanja rastvorljivost uočena je kod MTA ($0.10 \pm 0.02 \text{ mg/mm}^3$), a slične vrednosti dobijene su i za materijal CS ($0.15 \pm 0.06 \text{ mg/mm}^3$). Najveća rastvorljivost uočena je kod materijala HA-CS ($0.24 \pm 0.03 \text{ mg/mm}^3$). U procentima, rastvorljivost ispitivanih materijala posle 28 dana u veštačkom tkivnom fluidu, iznosila je 5,9% za CS, 12.9% za HA-CS i 4.2% za MTA. Nisu uočene statistički značajne razlike u pogledu rastvorljivosti materijala MTA i CS. Rastvorljivost materijala HA-CS je bila značajno veća u odnosu na materijale MTA i CS ($p < 0.05$).

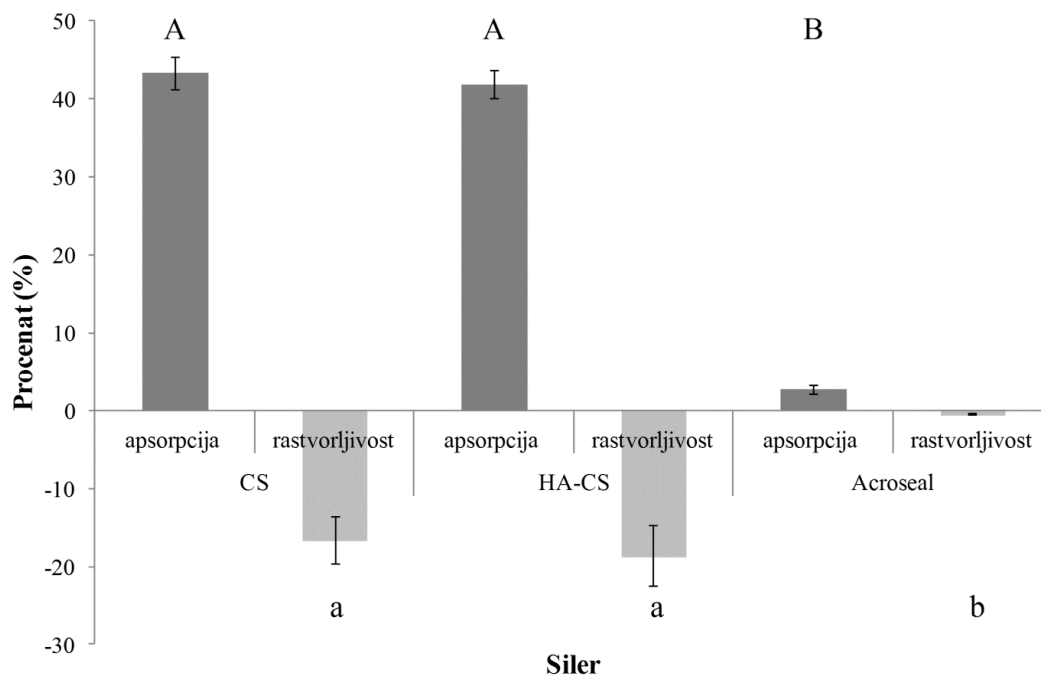
Tabela 3. Srednje vrednosti i standardne devijacije mase uzoraka (mg) silera

	m ₁	m ₂	m ₃
CS siler	67.3 ± 2.1	80.0 ± 3.9	56.3 ± 2.5
HA-CS siler	81.3 ± 2.4	93.9 ± 4.7	66.2 ± 3.9
Acroseal	92.2 ± 1.5	94.1 ± 1.9	91.7 ± 1.5

*m₁ - inicijalna masa uzoraka silera pre potapanja u veštački tkivni fluid

*m₂ - masa uzoraka silera posle 24h u veštačkom tkivnom fluidu

*m₃ - masa uzoraka silera nakon isušivanja



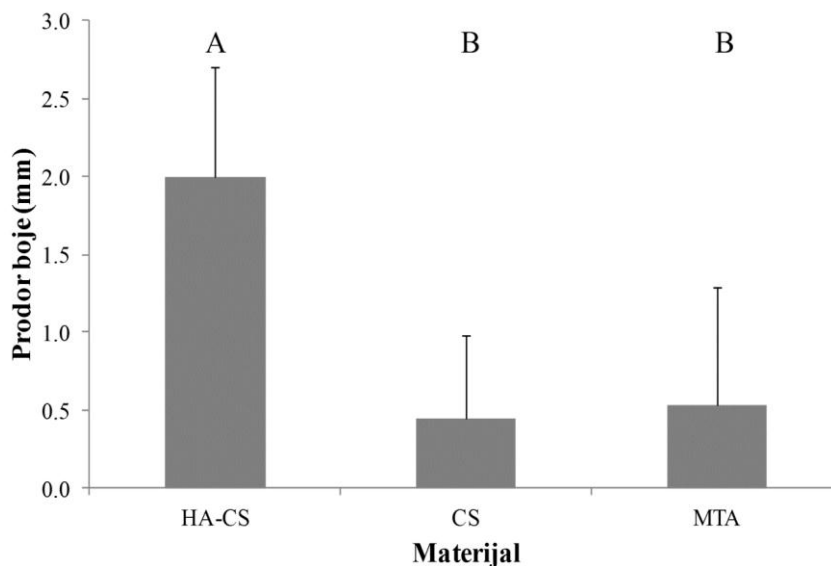
Grafikon 4. Srednje vrednosti i standardne devijacije apsorpcije tečnosti i rastvorljivosti testiranih silera (%).

Najveća apsorpcija tečnosti zabeležena je kod silera CS (43.3%). Slične vrednosti izmerene su i kod silera HA-CS (41.8 %). Najmanja apsorpcija tečnosti izmerena je kod kontrolnog silera Acroseal-a (2.7%). Nisu uočene statistički značajne razlike u apsorpciji tečnosti između silera CS i HA-CS, dok je Acroseal apsorbovao značajno manje tečnosti u odnosu na eksperimentalne silere CS i HA-CS ($p < 0.05$).

Najmanja rastvorljivost zabeležena je kod Acroseal-a (0.5%). Kod silera CS (16.6 %) i HA-CS (18.6%) uočena je značajno veća rastvorljivost u odnosu na Acroseal ($p < 0.05$), pri čemu nisu uočene statistički značajne razlike u rastvorljivosti silera CS i silera HA-CS.

5.1.2. REZULTATI ISPITIVANJA MARGINALNE MIKROPROPUSTLJIVOSTI

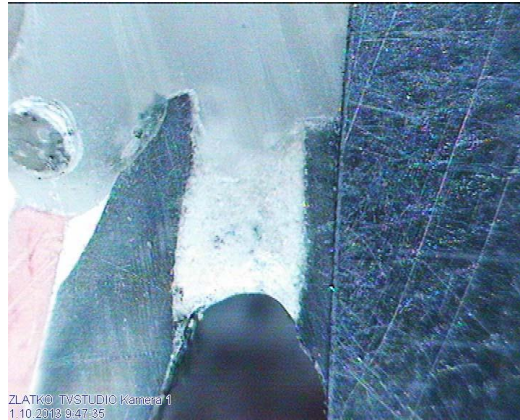
Rezultati ispitivanja marginalne mikropropustljivosti testiranih materijala prikazani su na grafikonu 5 i slikama 6 - 15.



Grafikon 5. Srednje vrednosti i standardne devijacije prodora boje ispitivanih materijala. Kolone označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p > 0.05$).

Najmanji prodor boje izmeren je kod materijala CS (0.44 ± 0.54 mm). Slične vrednosti izmerene su za materijal MTA (0.54 ± 0.76 mm). Najveći prodor boje zabeležen je kod materijala HA-CS (2.00 ± 0.70 mm).

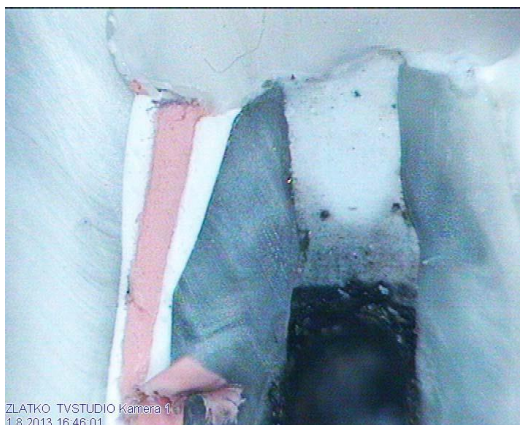
Nisu uočene statistički značajne razlike u marginalnom prodoru boje između materijala CS i MTA. Kod materijala HA-CS izmerene vrednosti prodora boje bile su značajno veće u odnosu na prodor boje kod materijala CS i MTA ($p < 0.05$).



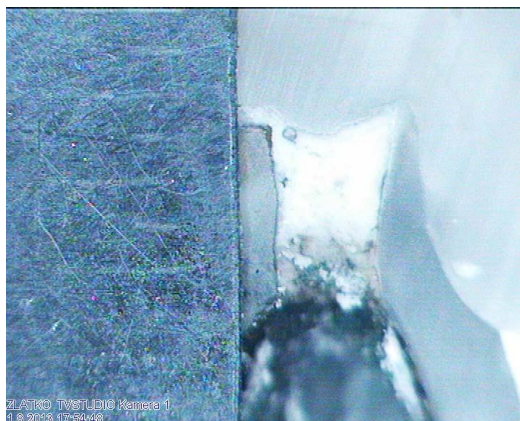
Slika 6. Interradiksna perforacija ispunjena materijalom CS. Ne uočava se marginalni prodor boje (x30).



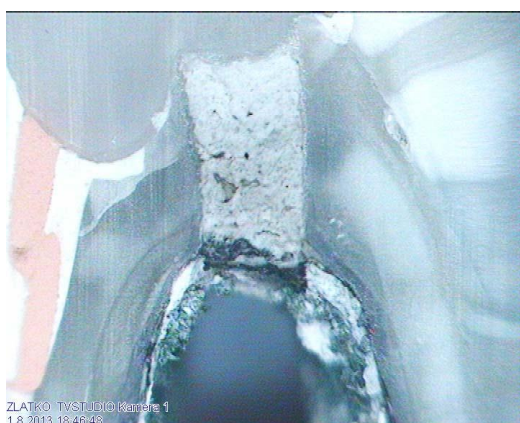
Slika 7. Interradiksna perforacija ispunjena materijalom CS. Uočava se marginalni prodor boje sa delimičnim prebojavanjem materijala (x30).



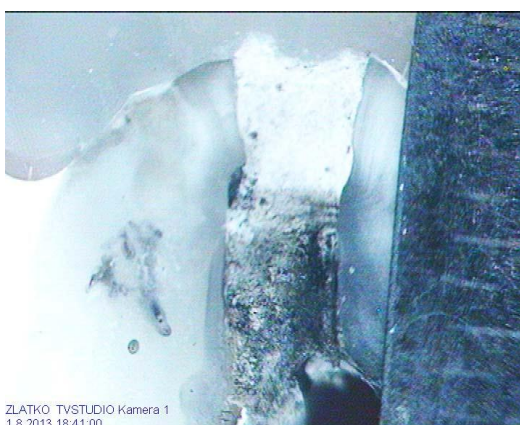
Slika 8. Interradiksna perforacija ispunjena materijalom CS. Uočava se apsorpcija boje sa delimičnim prebojavanjem materijala (x30).



Slika 9. Interradiksna perforacija ispunjena materijalom HA-CS. Uočava se apsorpcija boje sa delimičnim prebojavanjem materijala (x30).



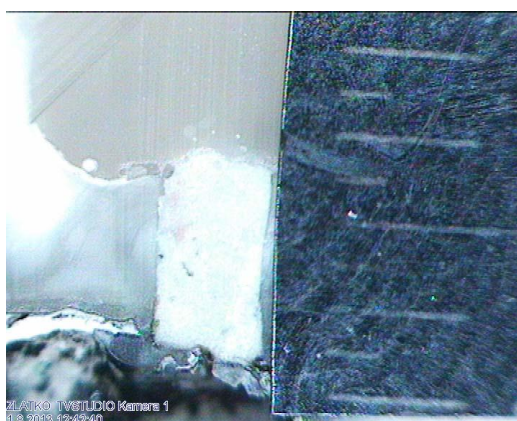
Slika 10. Interradiksna perforacija ispunjena materijalom HA-CS. Uočava se apsorpcija boje sa prebojavanjem većeg dela materijala (x30).



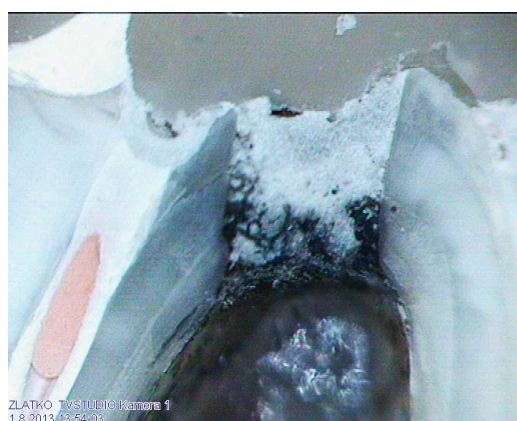
Slika 11. Interradiksna perforacija ispunjena materijalom HA-CS. Uočava se marginalni prodor boje sa apsorpcijom boje i delimičnim prebojavanjem materijala (x30).



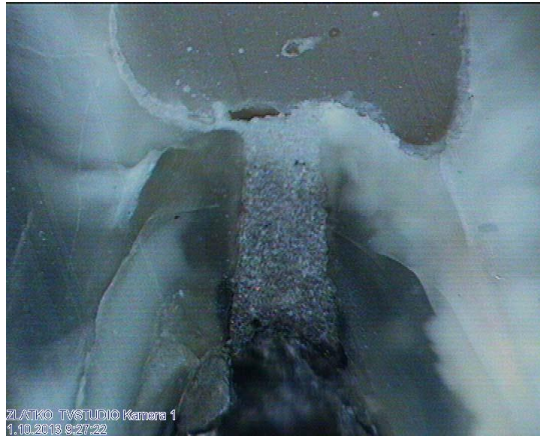
Slika 12. Interardiksna perforacija ispunjena materijalom HA-CS. Uočava se izražen prodor boje sa prebojavanjem kompletnog materijala (x30).



Slika 13. Intraradiksna perforacija ispunjena materijalom MTA. Ne uočava se marginalni prodor boje (x30).



Slika 14. Intraradiksna perforacija ispunjena materijalom MTA. Uočava se delimično rastvaranje materijala sa izraženim prodorom boje (x30).

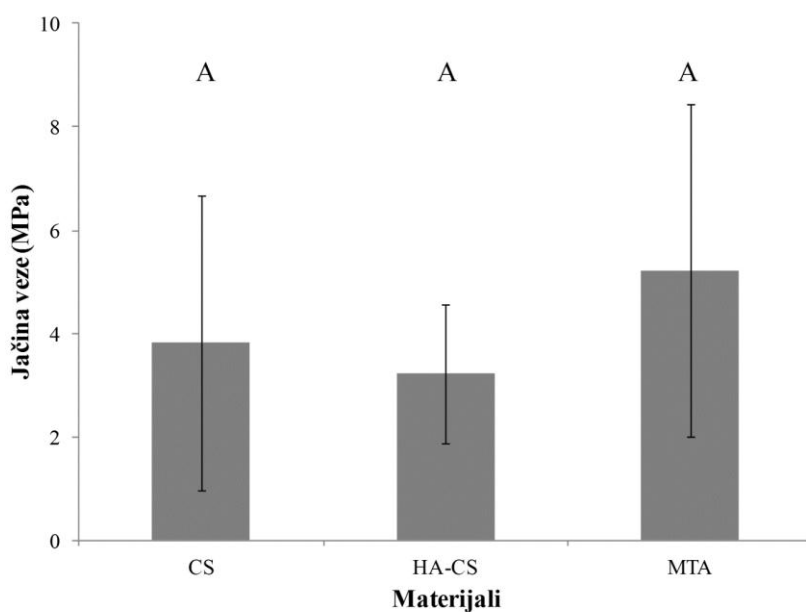


Slika 15. Interradiksna perforacija ispunjena materijalom MTA. Uočava se apsorpcija boje celom debljinom materijala (x30).

5.1.3. REZULTATI ISPITIVANJA JAČINE VEZE MATERIJALA SA DENTINOM KANALA KORENA

5.1.3.1. Rezultati ispitivanja jačine veze materijala i silera sa dentinom kanala korena - dentinski diskovi


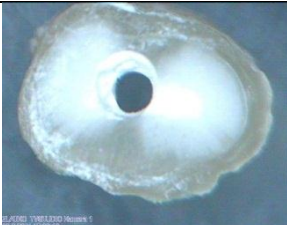
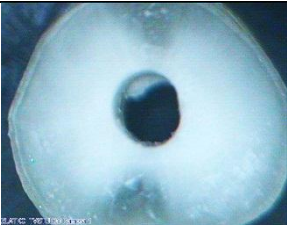

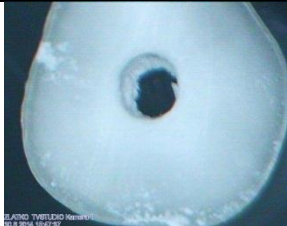


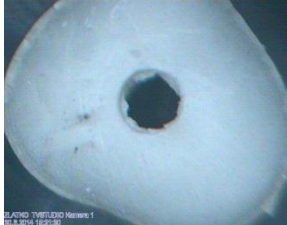

Rezultati su prikazani na grafikonima 6 - 7, u tabeli 4 i na slikama 16 - 17.



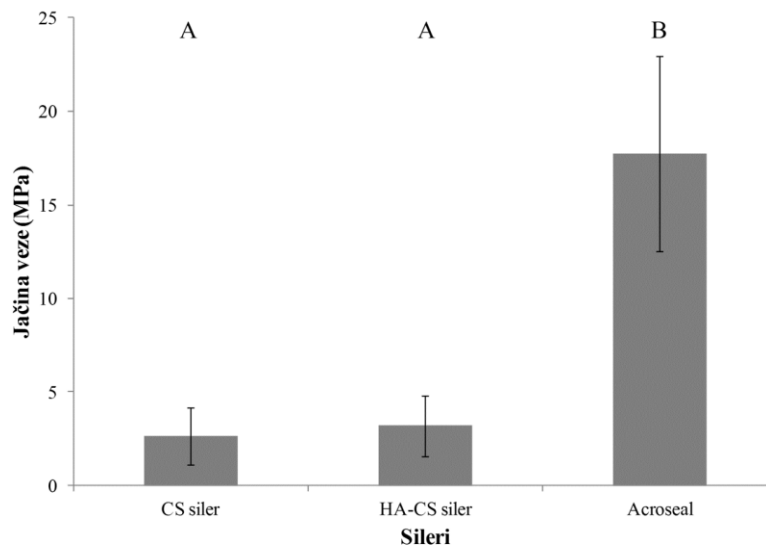
Grafikon 6. Srednje vrednosti i standardne devijacije jačine veze ispitivanih materijala sa dentinom kanala korena. Kolone označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p > 0.05$).

Najveće vrednosti jačine veze sa dentinom kanala korena izmerene su kod materijala MTA (5.23 ± 3.22 MPa). Jačina veze materijala CS sa dentinom iznosila je 3.83 ± 2.86 MPa, dok su kod materijala HA-CS izmerene nešto niže vrednosti (3.22 ± 1.35 MPa). Statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike u pogledu jačine veze sa dentinom kanala korena između testiranih materijala ($p > 0.05$).

Kod svih testiranih materijala dominirale su kohezivne (unutar materijala) i mešovite frakture. Adhezivna fraktura detektovana je u po jednom uzorku kod svih testiranih materijala.

			
CS	Kohezivna fraktura	Kohezivna fraktura	Mešovita fraktura
			
HA-CS	Kohezivna fraktura	Mešovita fraktura	Mešovita fraktura
			
MTA	Kohezivna fraktura	Mešovita fraktura	Adhezivna fraktura



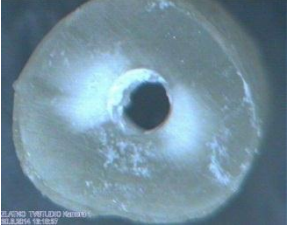



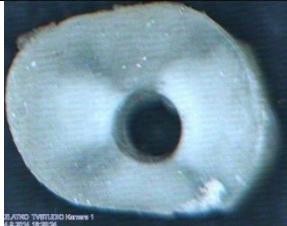

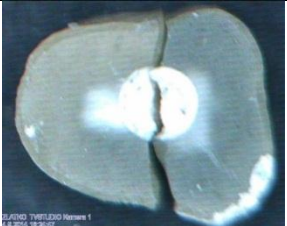
Slika 16. Tipovi fraktura nakon testa smicanja (x30).



Grafikon 7. Srednje vrednosti i standardne devijacije jačine veze testiranih silera sa dentinom kanala korena. Kolone označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p > 0.05$).

Najveće vrednosti jačine veze sa dentinom kanala korena, izmerene su kod kontrolnog silera (Acroseal) i iznosile su 17.74 ± 5.21 MPa. Veza sa dentinom kanala korena silera CS (2.64 ± 1.54 MPa) i silera HA-CS (3.20 ± 1.61 MPa) bila je značajno slabija u odnosu na Acroseal ($p < 0.05$). Između silera CS i silera HA-CS nije uočena statistički značajna razlika u pogledu jačine veze sa dentinom kanala korena.

U grupama uzoraka ispunjenih silerom CS i HA-CS silerom dominirale su kohezivne (unutar silera) i mešovite frakture. U grupi uzoraka ispunjenih Acroseal-om, dominirala je kohezivna fraktura unutar dentina, a u tri uzorka evidentirana je adhezivna fraktura na spoju silera i dentina.

			
Siler CS	Kohezivna fraktura	Mešovita fraktura	Mešovita fraktura
			
Siler HA-CS	Kohezivna fraktura	Mešovita fraktura	Mešovita fraktura
			
Acroseal	Adhezivna fraktura	Adhezivna fraktura	Kohezivna fraktura dentina

Slika 17. Tipovi fraktura nakon testa smicanja- metod dentinskih diskova (x30).

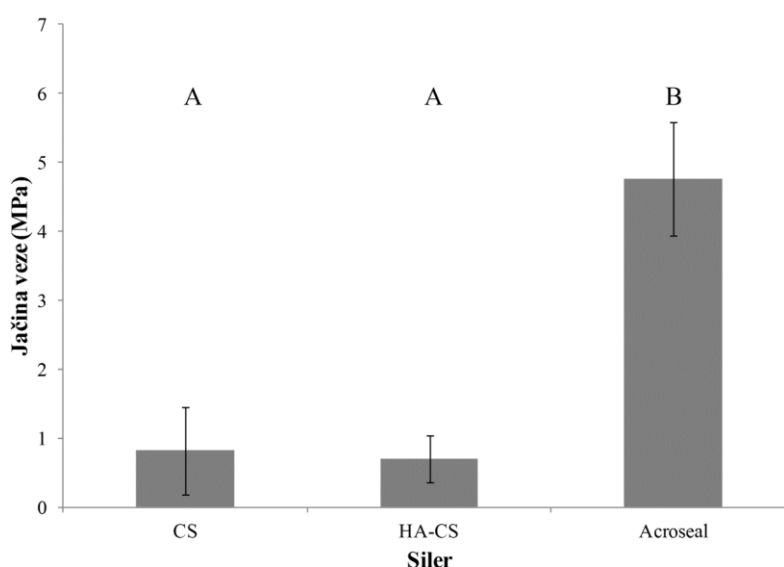
Tabela 4. Srednje vrednosti i standardne devijacije jačine veze materijala CS i HA-CS i silera CS i HA-CS (MPa).

Materijal CS	3.83 ± 2.86
Siler CS	2.64 ± 1.54
Materijal HA-CS	3.22 ± 1.35
Siler HA-CS	3.20 ± 1.60

Statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike u pogledu jačine veze silera CS i HA-CS u odnosu na osnovne formulacije materijala CS i HA-CS ($p > 0.05$).

5.1.3.2. Rezultati ispitivanja jačine veze silera sa dentinom kanala korena - konvencionalni metod






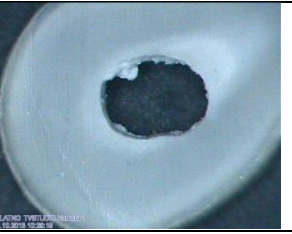






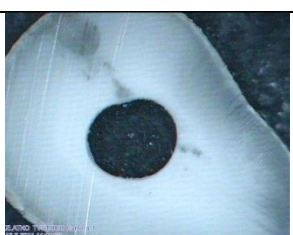
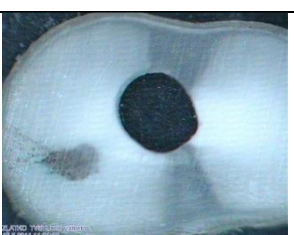

Rezultati su prikazani na grafikonu 8 i slici 18.



Grafikon 8. Srednje vrednosti i standardne devijacije jačine veze testiranih silera. Grupe označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p > 0.05$).

Najjača veza sa dentinom kanala korena je izmerena kod silera Acroseal (4.76 ± 0.82 MPa). Veza silera CS (0.82 ± 0.63 MPa) i HA-CS (0.70 ± 0.34 MPa) je bila značajno slabija u odnosu na Acroseal ($p < 0.05$). Između CS i HA-CS silera nije uočena statistički značajna razlika u pogledu jačine veze sa dentinom kanala korena.

U najvećem broju uzoraka sa silerima CS i HA-CS dominirale su kohezivne fraktura unutar materijala i mešovite frakture. U grupi uzoraka ispunjenih Acroseal-om detektovane su adhezivne frakture materijala i kohezivne frakture dentina.

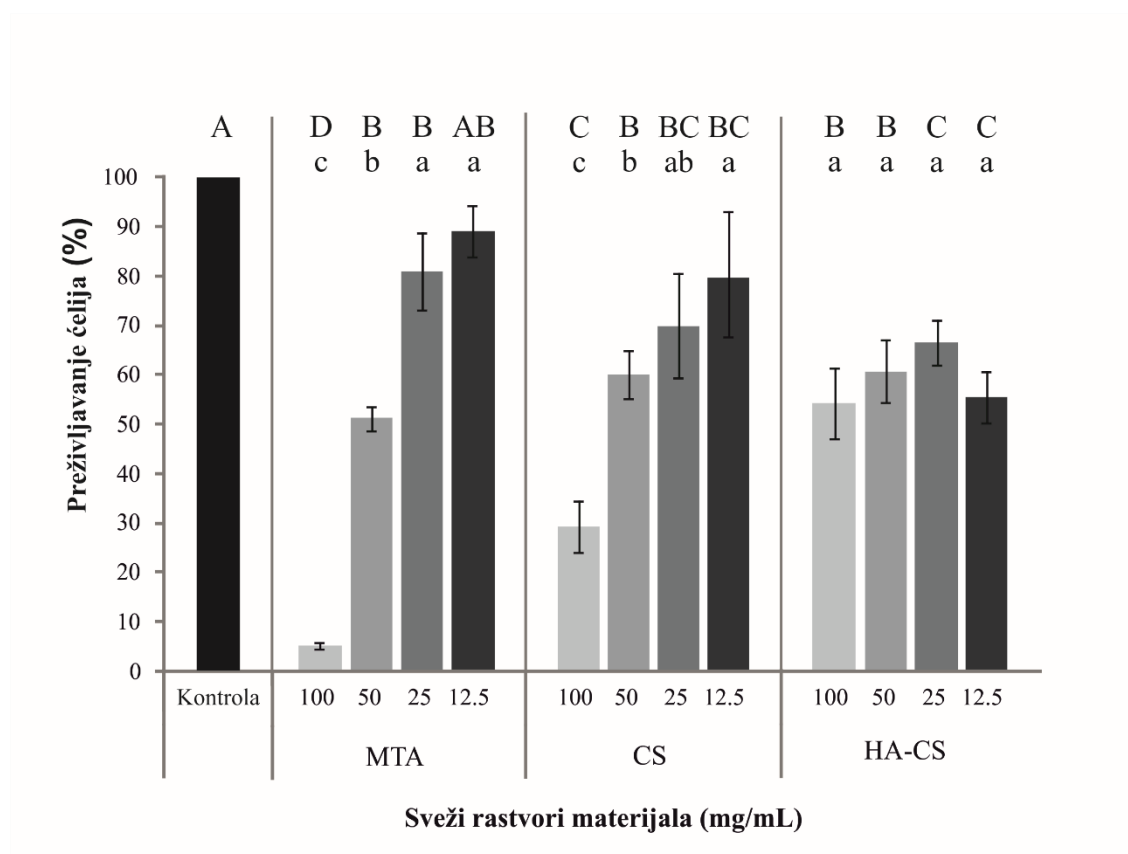
			
Siler CS	Kohezivna fraktura	Kohezivna fraktura	Kohezivna fraktura
			
Siler CS	Mešovita fraktura	Mešovita fraktura	Mešovita fraktura
			
Siler HA-CS	Kohezivna fraktura	Kohezivna fraktura	Kohezivna fraktura
			
Siler HA-CS	Mešovita fraktura	Mešovita fraktura	Mešovita fraktura
			
Acroseal	Adhezivna fraktura	Adhezivna fraktura	Adhezivna fraktura

Slika 18. Tipovi fraktura silera - konvencionalni metod (x30).

5.2. REZULTATI ISPITIVANJA BIOLOŠKIH SVOJSTAVA MATERIJALA

5.2.1. REZULTATI ISPITIVANJA CITOTOKSIČNOSTI

Rezultati citotoksičnosti i pH vrednosti svežih rastvora i izlužaka vezanih materijala prikazani su na grafikonima 9-13.

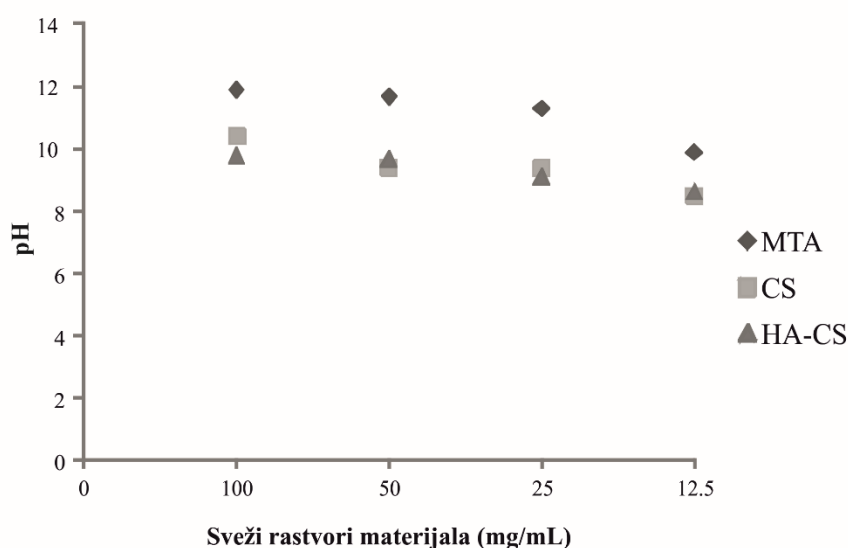


Grafikon 9. Preživljavanje ćelija nakon izlaganja svežim rastvorima materijala u različitim koncentracijama. Velika slova označavaju statistički značajne razlike između istih koncentracija testiranih materijala. Mala slova ukazuju na statističke razlike između različitih koncentracija rastvora istog materijala. Grupe označene istim slovima nisu značajno različite ($p > 0.05$).

Procenat preživljavanja ćelija nakon izlaganja svežim rastvorima materijala MTA i CS ukazuje na zavisnost toksičnosti materijala od njihove koncentracije. Najizraženija toksičnost uočena je posle izlaganja ćelija najvećoj testiranoj koncentraciji rastvora MTA (procenat preživljavanja ćelija 4.9%). Sa opadanjem koncentracije rastvora MTA uočena

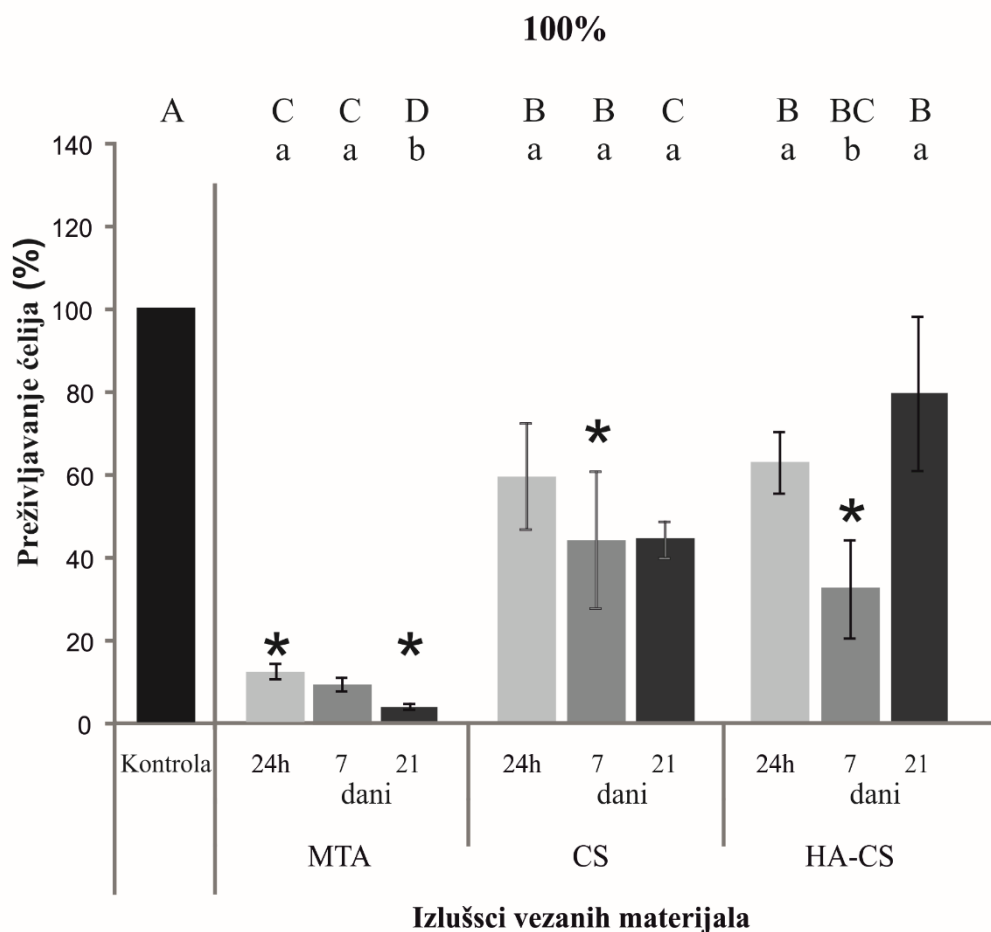
je značajno veće preživljavanje ćelija ($p < 0.001$). Nakon izlaganja ćelija rastvorima materijala CS, takođe je uočena najizraženija toksičnost rastvora najveće koncentracije (procenat preživljavanja ćelija 29.4%), sa linearnim porastom preživljavanja ćelija nakon izlaganja razblaženim rastvorima materijala ($p < 0.001$). Toksičnost materijala HA-CS se nije značajno menjala u zavisnosti od koncentracije rastvora ($p > 0.05$).

Toksičnost rastvora MTA u najvećoj testiranoj koncentraciji (100 mg/mL) je bila značajno veća u odnosu na rastvore materijala CS i HA-CS iste koncentracije ($p < 0.001$). U nižim koncentracijama, rastvori materijala MTA i CS su pokazali sličnu toksičnost ($p > 0.05$). Rastvor materijala HA-CS u najvišoj testiranoj koncentraciji (100 mg/mL) je bio značajno manje toksičan u odnosu na rastvore materijala MTA i CS istih koncentracija ($p < 0.001$). Rastvori svih testiranih materijala koncentracije 50 mg/mL pokazali su sličnu toksičnost u ćelijskoj kulturi ($p > 0.05$). Toksičnost rastvora materijala HA-CS u nižim koncentracijama (25 mg/mL i 12.5 mg/mL) bila je slična rastvorima materijala CS ($p > 0.05$) ali izraženija u odnosu na rastvore MTA istih koncentracija ($p < 0.001$).



Grafikon 10. pH vrednosti svežih rastvora materijala različitih koncentracija.

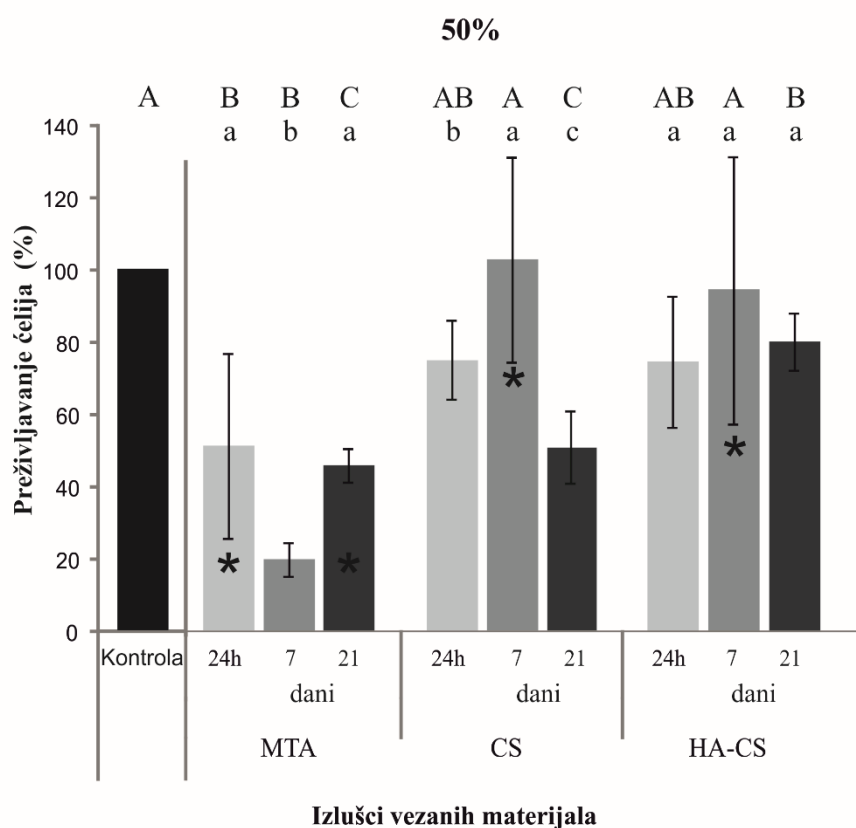
Najviše vrednosti pH izmerene su kod svežih rastvora MTA (11.89, 11.68, 11.30, 9.89). Vrednosti pH materijala CS (10.40, 9.41, 9.37, 8.49) i materijala HA-CS (9.78, 9.67, 9.09, 8.62) bile su niže u odnosu na vrednosti pH rastvora materijala MTA u svim testiranim koncentracijama.



Grafikon 11. Preživljavanje ćelija nakon izlaganja 100% izlušcima vezanih materijala. Velika slova označavaju statističke razlike između materijala u jednom test periodu (npr. MTA24h / CS24h / HA-CS24h). Mala slova označavaju statističke razlike između različitih test perioda unutar jednog materijala. Grupe označene istim slovima nisu značajno različite ($p > 0.05$).

Preživljavanje ćelija nakon izlaganja nerazblaženim (100%) izlušcima svih testiranih materijala je bila značajno manje u odnosu na kontrolu u svim testiranim periodima ($p < 0.001$). Nerazblaženi izlušci MTA su značajno redukovali preživljavanje ćelija u odnosu na nerazblažene izluške materijala CS i HA-CS u svim

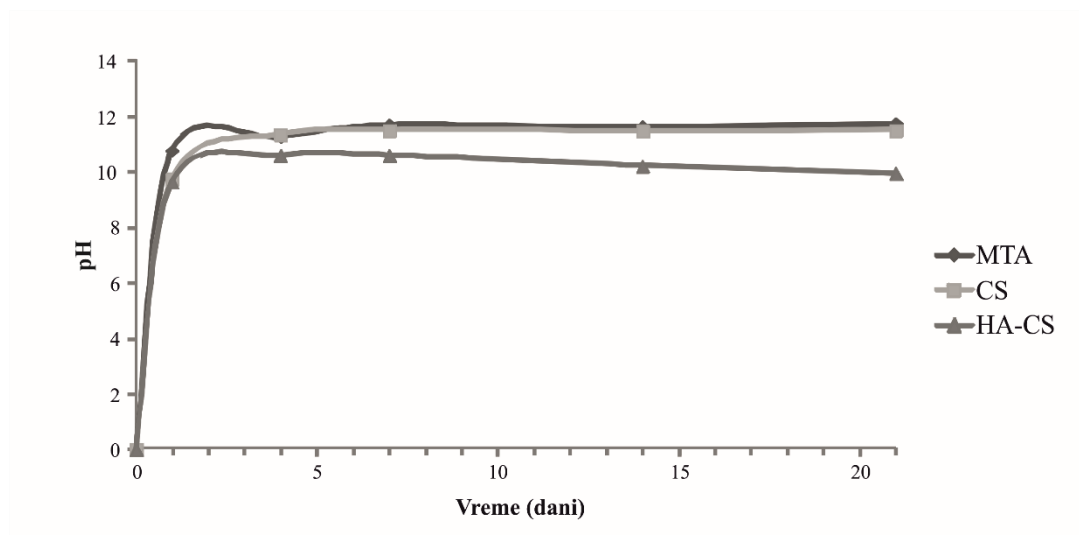
testiranim periodima ($p < 0.001$). Takođe, toksičnost izlužaka MTA je rasla u funkciji vremena sa značajno većom toksičnošću 21-dnevnih izlužaka u odnosu na 24h i 7-dnevne izluške ($p < 0.001$). Nerazblaženi 24h i 7-dnevni izluški materijala CS i HA-CS su pokazali sličnu toksičnost u ćelijskoj kulturi ($p > 0.05$). Nerazblaženi 21-dnevni izluški materijala HA-CS su bili značajno manje toksični od 21-dnevnih izlužaka materijala CS ($p < 0.001$).



Grafikon 12. Preživljavanje ćelija nakon izlaganja 50% izlušcima vezanih materijala. Velika slova označavaju statističke razlike između materijala u jednom test periodu. Mala slova označavaju statističke razlike između različitih test perioda unutar jednog materijala. Grupe označene istim slovima nisu značajno različite ($p > 0.05$). *Zvezdice označavaju značajne razlike između nerazblaženih (100%) i razblaženih izlužaka (50%) istog materijala u odgovarajućim test periodima ($p > 0.05$).

Preživljavanje ćelija nakon izlaganja razblaženim (50%), 7-dnevnim izlušcima materijala CS i HA-CS bilo je komparabilno sa kontrolom i značajno veće u odnosu na preživljavanje ćelija nakon izlaganja nerazblaženim (100%) izlušcima istih materijala (p

< 0.001). Razblaženi izlušci MTA su bili manje toksični od nerazblaženih izlužaka MTA ($p < 0.001$), ali je procenat preživelih ćelija bio značajno manji nego u kontrolnoj grupi ($p < 0.001$).



Grafikon 13. pH vrednosti nerazblaženih (100%) izlužaka vezanih materijala tokom 21dana.

Najviše vrednosti pH nerazblaženih izlužaka materijala izmerene su posle 7 dana izluživanja svih materijala (MTA-11.70, CS-11.49, HA-CS-10.59). pH vrednosti izlužaka CS i MTA se nisu menjale do kraja eksperimenta. Vrednosti pH izlužaka materijala HA-CS bile su niže u odnosu na CS i MTA u svim testiranim periodima, sa blagom tendencijom pada u funkciji vremena.

Rezultati citotoksičnosti silera CS i HA-CS su prikazani u tabelama 5 - 8.

Tabela 5. Srednje vrednosti i standardne devijacije preživljavanja ćelija nakon izlaganja rastvorima silera CS i rastvorima osnovne formulacije materijala CS (%).

	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL	12.5 mg/mL
kontrola	100	100	100	100
CS	28.2 ± 0.1	58.6 ± 0.2	69.1 ± 0.5	79.1 ± 0.2
Siler CS	56.9 ± 0.1	69.4 ± 0.4	76.9 ± 0.2	84.3 ± 0.1

Sve testirane koncentracije svežeg rastvora silera CS rezultirale su visokim preživljavanjem ćelija u kulturi (> 50%). Preživljavanje ćelija nakon izlaganja razblaženim rastvorima silera CS bilo je komparabilno sa rezultatima osnovne formulacije materijala CS. Značajno veće preživljavanje ćelija uočeno je samo nakon izlaganja ćelija rastvoru silera CS u najvećoj koncentraciji (100 mg/mL) ($p < 0.001$).

Tabela 6. Srednje vrednosti i standardne devijacije preživljavanja ćelija nakon izlaganja rastvorima silera HA-CS i rastvorima osnovne formulacije materijala HA-CS (%)

	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL	12.5 mg/mL
kontrola	100	100	100	100
HA-CS	52.5 ± 0.4	59.3 ± 0.2	53.8 ± 0.3	65.7 ± 0.2
Siler HA-CS	55.5 ± 0.3	74.5 ± 0.3	89.7 ± 0.3	97.2 ± 0.4

Sve testirane koncentracije svežih rastvora silera HA-CS rezultirale su visokim preživljavanjem ćelija u kulturi (> 50%). Rastvori silera HA-CS koncentracija 25 mg/mL i 12.5 mg/mL pokazali su značajno manju toksičnost u odnosu na rastvore istih koncentracija osnovnih formulacija materijala ($p < 0.001$).

Tabela 7. Srednje vrednosti i standardne devijacije preživljavanja ćelija nakon izlaganja izlušcima silera CS i izlušcima osnovne formulacije materijala CS (%).

	100% izlušci			50% izlušci		
	24h	7 dan	21 dan	24h	7 dan	21 dan
Kontrola	100	100	100	100	100	100
CS	58.6 ± 12.7	43.2 ± 16.6	43.4 ± 4.2	74.5 ± 11.0	102.1 ± 28.4	50.2 ± 10.0
siler CS	78.7 ± 12.0	36.9 ± 11.8	38.5 ± 6.3	78.0 ± 8.4	105.1 ± 26.4	58.9 ± 4.8

Nisu uočene statistički značajne razlike u toksičnosti izlužaka silera CS u odnosu na osnovnu formulaciju materijala CS, ni u jednom testiranom periodu ($p > 0.05$).

Tabela 8. Srednje vrednosti i standardne devijacije preživljavanja ćelija nakon izlaganja izlušcima silera HA-CS i izlušcima osnovne formulacije materijala HA-CS (%).

	100% izlušci			50% izlušci		
	24h	7 dan	21 dan	24h	7 dan	21 dan
Kontrola	100	100	100	100	100	100
HA-CS	62.1 ± 7.4	32.2 ± 11.7	79.2 ± 18.6	74.3 ± 18.0	94.1 ± 37.0	79.9 ± 7.9
siler HA-CS	62.5 ± 11.6	30.0 ± 15.1	45.5 ± 5.0	54.9 ± 2.3	89.9 ± 25.8	54.6 ± 4.3

Preživljavanje ćelija nakon izlaganja 24h i 7-dnevnim izlušcima silera HA-CS bilo je komparabilno sa preživljavanjem ćelija nakon izlaganja osnovnoj formulaciji materijala HA-CS ($p > 0.05$). Preživljavanje ćelija nakon izlaganja 21-dnevnim izlušcima silera HA-CS bilo je značajno manje u odnosu na osnovnu formulaciju materijala (HA-CS) ($p < 0.001$).

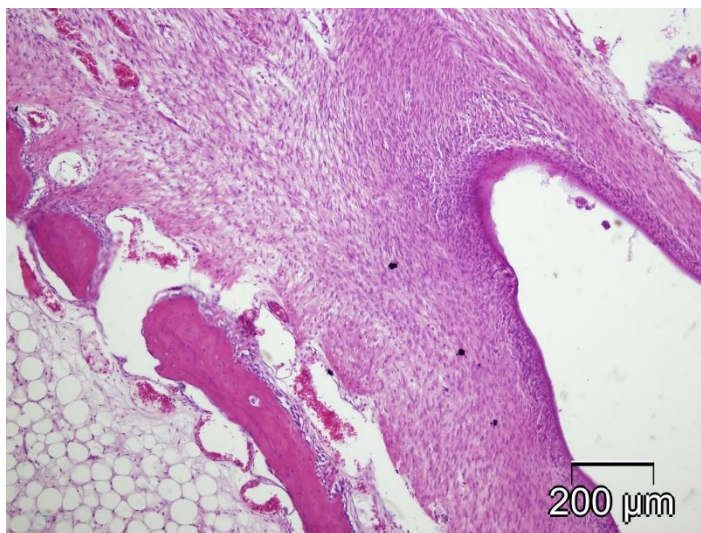
5.2.2. REZULTATI ISPITIVANJA BIOKOMPATIBILNOSTI I BIOINDUKTIVNOSTI: *IN VIVO* STUDIJA

Rezultati *in vivo* istraživanja na animalnom modelu kunića prikazani su na slikama 19-31.

- **Inflamatorna reakcija**

Inflamatorna reakcija nakon aplikacije materijala CS

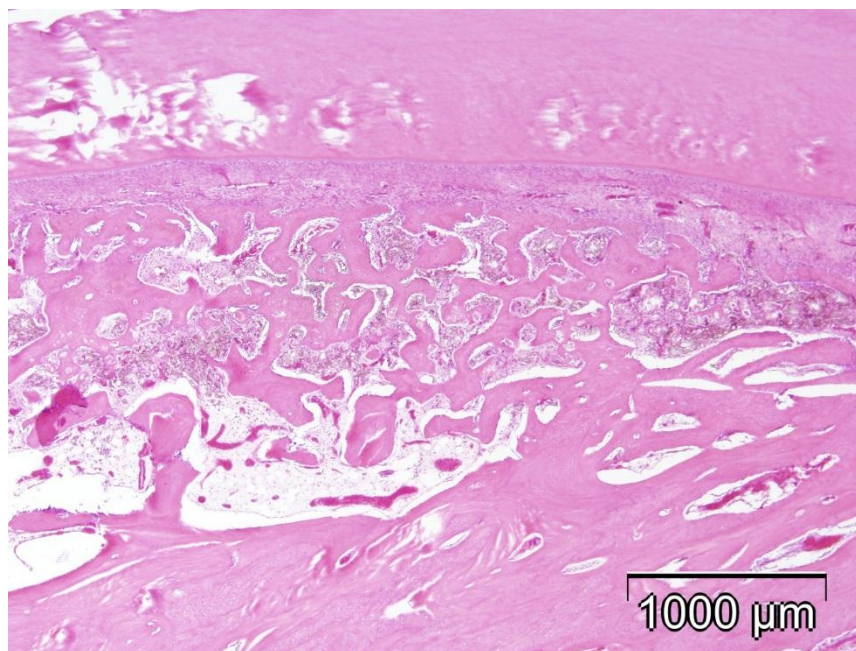
U uzorcima ispunjenim materijalom na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS), uočeno je prisustvo zapaljenske reakcije različitog inteziteta. U polovini uzoraka uočena je veoma blaga zapaljenska reakcija (*score* 1) sa samo nekoliko ćelija zapaljenja koje su se nalazile u zoni tkiva neposredno uz materijal (slika 19). U dva uzorka uočena je umerena (*score* 3), a u jednom uzorku i intezivna zapaljenska reakcija (*score* 4) sa ekstenzijom zapaljenja dublje u tkivo i formiranjem abscesa (*score* 3). Malobrojne džinovske ćelije, tipa oko stranog tela uočene su u polovini uzoraka (*score* 2), dok su čestice materijala detektovane u većoj količini u svim uzorcima. Mikroorganizmi nisu uočeni ni u jednom uzorku (*score* 1).



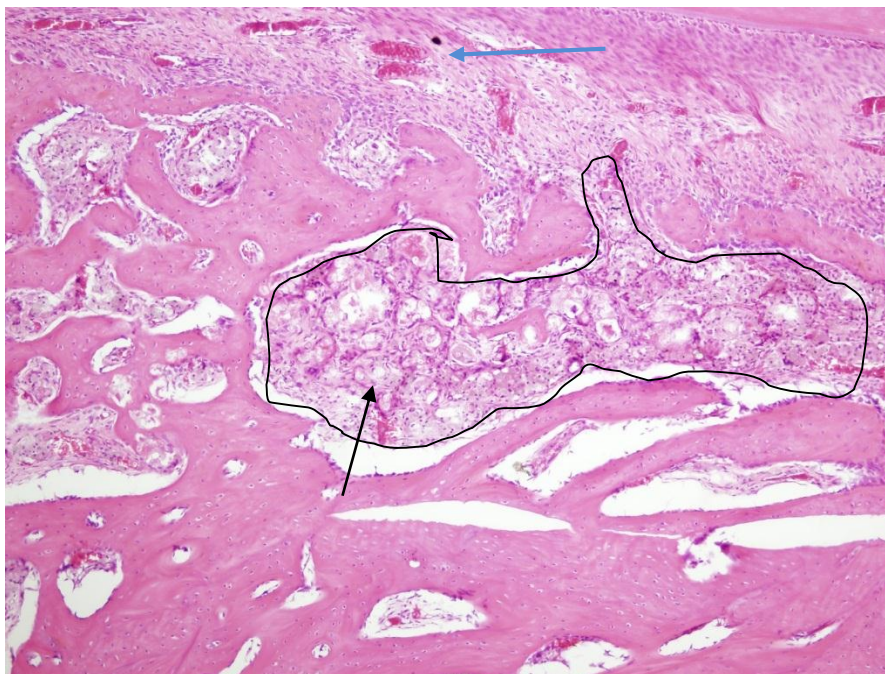
Slika 19. Materijal CS. Mikrofotografija koštanog tkiva sa proliferacijom vezivno-vaskularnog tkiva, umerene celularnosti uz oskudnu monocitnu infiltraciju (*score* 1). (HE, x100)

Inflamatorna reakcija u tkivu nakon aplikacije materijala HA-CS

U grupi uzoraka ispunjenih materijalom na bazi hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS), blaga inflamatorna reakcija je uočena u dva uzorka (*score* 2), sa ćelijama zapaljenja lokalizovanim neposredno uz implantirani materijal. U ostalim uzorcima tkivo je bilo neizmenjeno (*score* 1). U većini uzoraka, u tkivu je uočena i manja količina čestica materijala (*score* 2). Džinovske ćelije, kao ni mikroorganizmi nisu uočeni ni u jednom uzorku (*score* 1) (slike 20 - 21).



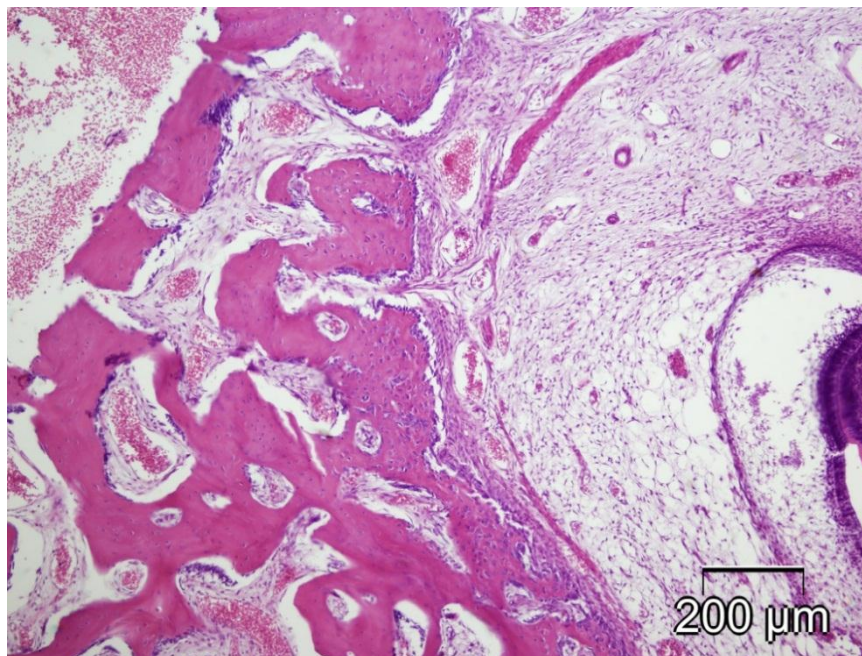
Slika 20. Materijal HA-CS. Na mikrofotografiji se ne uočava značajna vitalna reakcija koštanog tkiva. (HE, x40).



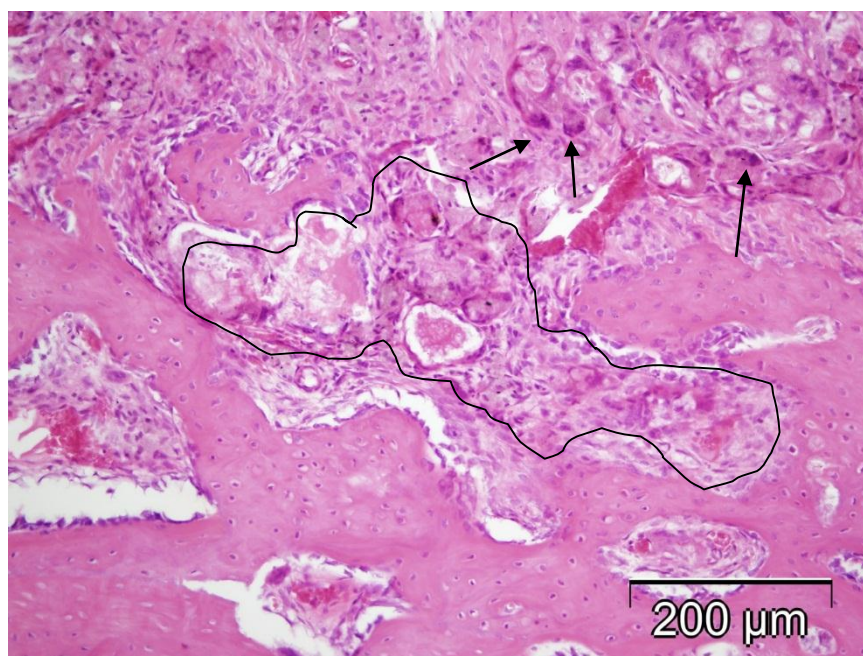
Slika 21. Materijal HA-CS. Detalj sa prethodne mikrofotografije. Uočavaju se čestice materijala (crna strelica), oko koga je prisutno hronično proliferativno zapaljenje umerenog intenziteta uz znake neoangiogeneze (plava strelica). (HE, x100).

Inflamatorna reakcija nakon aplikacije materijala MTA

Analizom uzoraka ispunjenih MTA-om, uočeno je prisustvo zapaljenske reakcije blagog do umerenog inteziteta (slike 22-23). Čelije zapaljenja su bile lokalizovane u uzanom pojasu tkiva, neposredno uz implantirani materijal (*score 2*). Manji broj džinovskih ćelija tipa oko stranog tela bio je prisutan u većini uzoraka. Čestice MTA rasute u tkivu dalje od mesta implantacije materijala uočene su u manjoj količini u svim uzorcima (*score 2*). Mikroorganizmi nisu detektovani ni u jednom uzorku (*score 1*).



Slika 22. Materijal MTA. Oskudna inflamatorna reakcija sa elementima proliferativnog hroničnog zapaljenja uz fokalne monocitne infiltrate. (HE, x100).



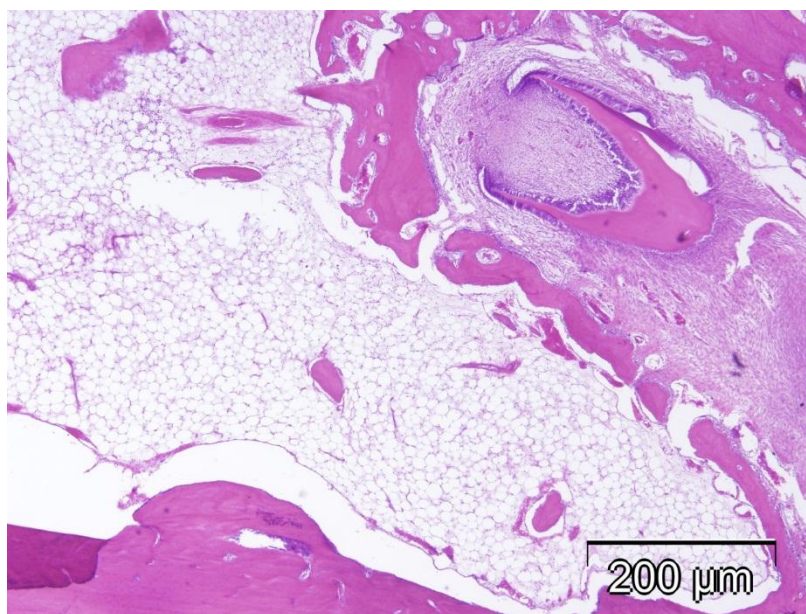
Slika 23. Materijal MTA. U tkivu se uočavaju rasute čestice materijala uz prisustvo džinovskih ćelija tipa oko stranog tela (strelice). (HE, x200).

Statističkom analizom nije utvrđeno postojanje značajnih razlika u intezitetu zapaljenske reakcije između testiranih materijala. U pogledu ekstenzije zapaljenja utvrđena je statistički značajna razlika između materijala CS i materijala HA-CS ($p = 0.004$). Analizirajući prisustvo džinovskih ćelija, nisu utvrđene značajne razlike između testiranih materijala. Najviše čestica materijala rasutih u tkivu dalje od mesta implantacije, uočeno je u uzorcima ispunjenim materijalom CS, značajno više u odnosu na uzorke ispunjene materijalom HA-CS ($p = 0.003$). Nisu utvrđene statistički značajne razlike u količini rasutih čestica između materijala CS i MTA, kao ni materijala HA-CS i MTA.

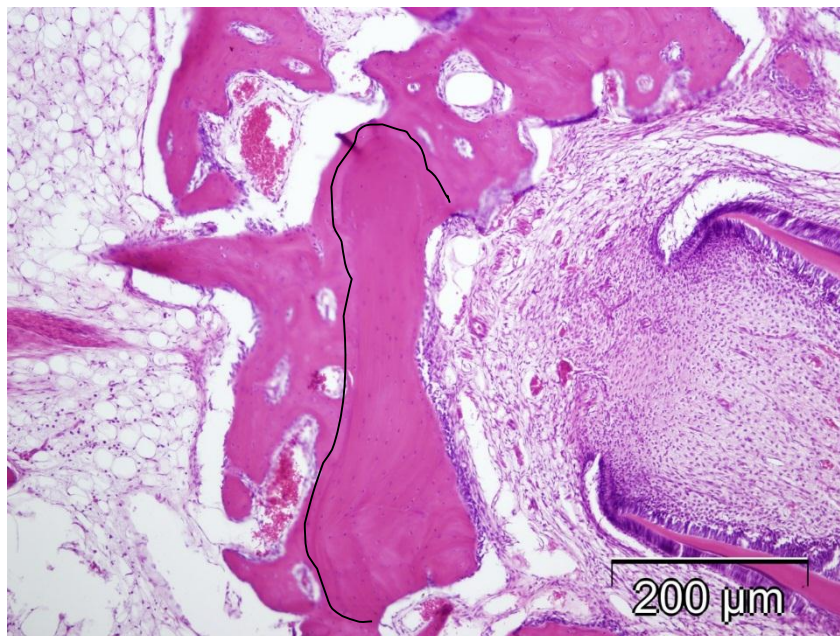
- **Novostvoreno kalcifikovano tkivo**

Formiranje kalcifikovanog tkiva nakon aplikacije materijala CS

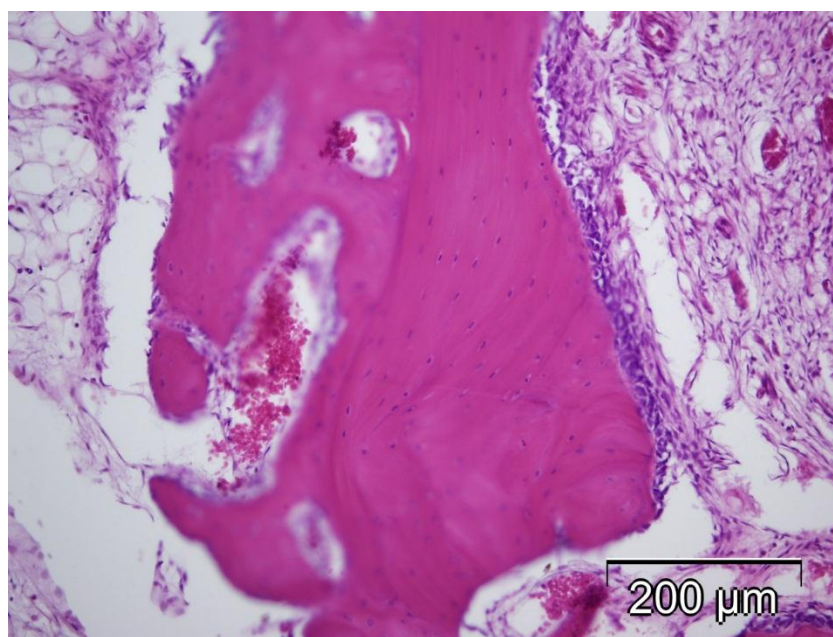
U uzorcima ispunjenim materijalom CS, novostvoreno kalcifikovano tkivo je bilo uglavnom nepravilne morfologije (*score 2*), nepotpuno mineralizovano, deponovano u debljini od 150-250 μm (*score 1*), isprekidanog kontinuiteta sa fokusima fibrovaskularnog tkiva (slike 24 - 26).



Slika 24. Materijal CS. Diskontinualno novostvoreno kalcifikovano tkivo. (HE, x40).



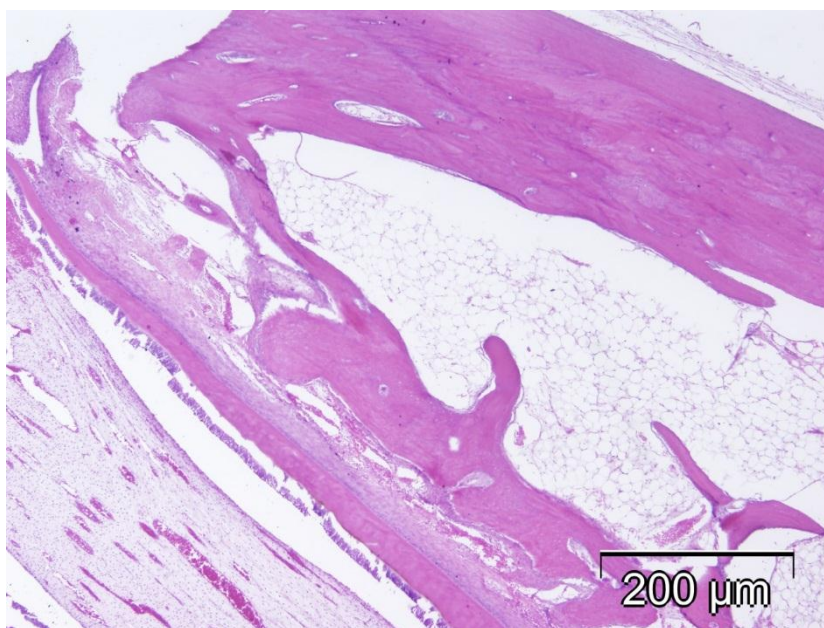
Slika 25. Materijal CS. Incipijentna tubularna građa sa jasnom granicom koja ukazuje na iregularnu građu kalcifikovanog tkiva, uz znake neoangiogeneze. (HE, x100).



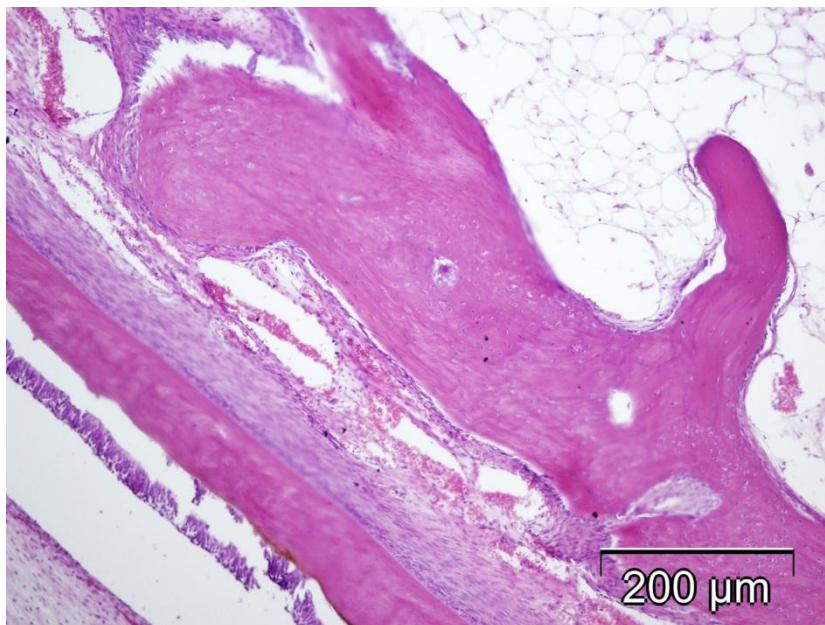
Slika 26. Materijal CS. Detalj sa prethodne mikrofotografije. Na periferiji kalcifikovanog tkiva uočavaju se mezenhimalne ćelije, osteoblastne diferencijacije. (HE, x200).

Formiranje kalcifikovanog tkiva nakon aplikacije materijala HA-CS

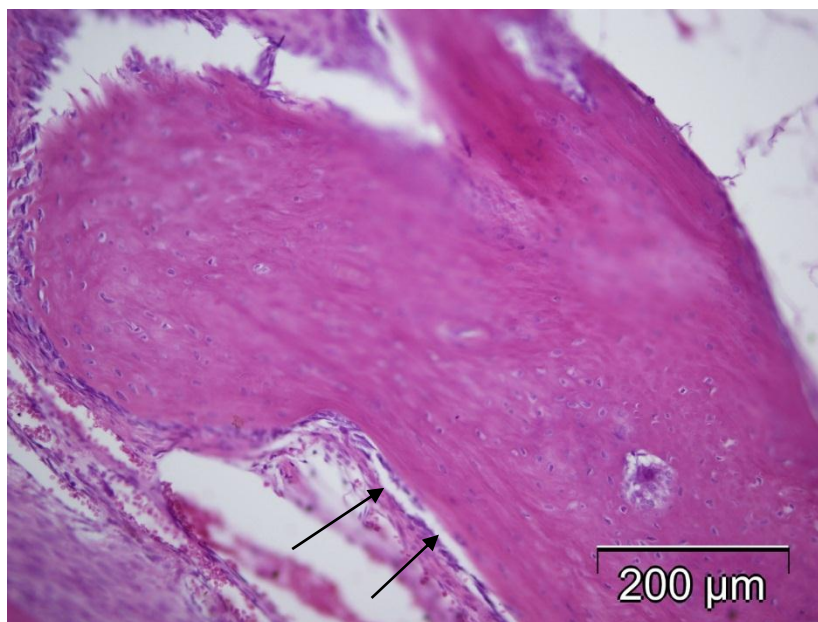
U većini uzoraka ispunjenih materijalom HA-CS (5/6), implantirani materijal je od susednog tkiva bio u potpunosti odvojen kontinuiranim novostvorenim kalcifikovanim tkivom (*score* 1), lamelarne gradje (*score* 1), debljine preko 250 μm kod 4 uzorka (*score* 1), odnosno preko 150 μm kod dva uzorka (*score* 2). Na periferiji novostvorenog kalcifikovanog tkiva uočene su mezenhimalne ćelije sa osteoblastnom diferencijacijom (slike 27-29).



Slika 27. Materijal HA-CS. Na mikrofotografiji se uočava kontinuirano kalcifikovano tkivo lamelarne građe. (HE, x 40).



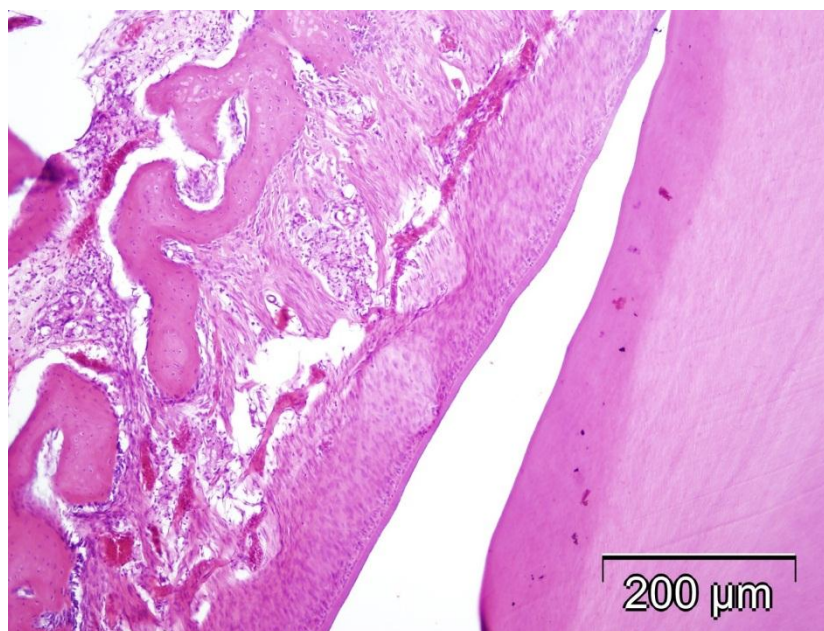
Slika 28. Materijal HA-CS. Kalcifikovano tkivo regularne mineralizacije, lamelarne građe i umerene celularnosti. (HE, x100)



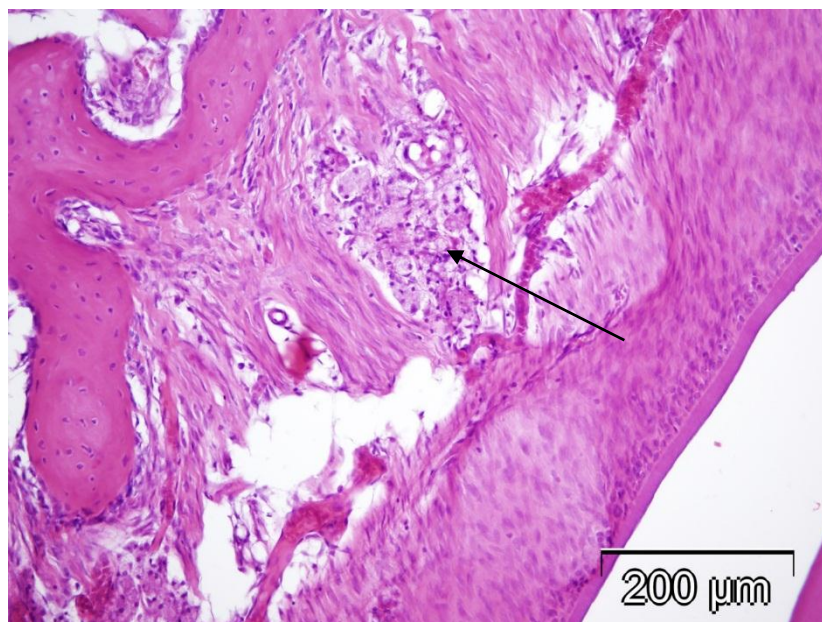
Slika 29. Materijal HA-CS. Detalj sa prethodne mikrofotografije. Na periferiji novostvorenog kalcifikovanog tkiva uočavaju se mezenhimalne ćelije osteoblastnog tipa. Prisutna fibroplazija sa neoanginoenezom uz znake hroničnog inaktivnog zapaljenja. (HE, x200).

Formiranje kalcifikovanog tkiva nakon aplikacije materijala MTA

U svim uzorcima ispunjenim MTA-om, novostvoreno kalcifikovano tkivo, deponovano je u manjoj količini, u debljini do 149 μm (*score* 3) (slike 30-31). U novostvorenom kalcifikovanom tkivu konstatovani su disokontinuiteti sa fokusima fibrovaskularne proliferacije (*score* 3).



Slika 30. Materijal MTA. Na mikrofotografiji se uočava novostvoreno kalcifikovano tkivo prožeto fokusima fibrovaskularne proliferacije. (HE, x100)



Slika 31. Materijal MTA. Detalj sa prethodne mikrofotografije. Kalcifikovano tkivo regularne građe uz lako povećanu celularnost. Uočava se prisustvo čestica materijala (strelica). (HE, x200).

Statističkom analizom utvrđene su značajne razlike u pogledu kontinuiteta novostvorenog kalcifikovanog tkiva između materijala HA-CS i MTA ($p=0.003$), kao i između materijala HA-CS i materijala CS ($p=0.010$). Statistički značajne razlike utvrđene su i u pogledu količine novostvorenog kalcifikovanog tkiva, između materijala CS i MTA ($P=0.004$), kao i između materijala HA-CS i MTA ($p=0.012$).

6. DISKUSIJA

6.1. DISKUSIJA REZULTATA ISPITIVANJA FIZIČKIH SVOJSTAVA MATERIJALA

6.1.1. DISKUSIJA REZULTATA ISPITIVANJA RASTVORLJIVOSTI I POROZNOSTI

Za procenu rastvorljivosti i poroznosti ispitivanih materijala primenjeni su standardni testovi objedinjeni u ISO 6876, kojima se pomenuta svojstva ispituju merenjem promena u težini materijala nakon njihovog čuvanja u tečnosti. Važno je napomenuti da se ISO 6876 odnosi na kanalne silere koji se vezuju u prisustvu ili odsustvu vlage i koji se koriste za definitivnu opturaciju kanala korena. Testovima nisu eksplicitno obuhvaćeni kalcijum silikatni materijali kojima je neophodno da apsorbuju vodu kako bi oslobodili bioaktivne jone. Međutim kako odgovarajući standardni test za procenu rastvorljivosti i poroznosti kalcijum silikatnih cementata još uvek nije ustanovljen [77], brojna istraživanja koja su se bavila ovom problematikom realizovana su u skladu sa preporukama ISO 6876 [30, 65, 68, 77, 80, 160, 182, 194], što je bio razlog da se on primeni i u ovom istraživanju.

Obzirom da se labaratorijski uslovi pod kojima se procenjuju rastvorljivost i poroznost materijala u velikoj meri razlikuju od kliničkih uslova u kojima se materijali primenjuju, u literaturi se uočavaju česta odstupanja od standardnih propozicija testa. Uslovi testiranja materijala modifikovani su najčešće u pogledu veličine uzoraka materijala [22, 41, 77, 194], dužine vezivanja materijala [77], količine tečnosti u koju su uzorci materijala potopljeni [22, 41, 65, 77], vrste tečnosti [41, 65] odnosno vremena u kome se ispituju svojstva materijala [65, 77, 194].

U ovom istraživanju, rastvorljivost i poroznost materijala su ispitivani posle čuvanja uzoraka tokom 28 dana u veštačkom tkivnom fluidu u skladu sa metodologijom Formosa i sar. (2013) [65]. Na ovaj način, praćena je rastvorljivost materijala u dužem vremenskom intervalu, u tečnosti koja po svom hemijskom sastavu odgovara tkivnoj tečnosti sa kojom je materijal u kontaktu u *in vivo* uslovima. Takođe istraživanje je

realizovano na većem broju uzoraka manje zapremine, koji su potopljeni u proporcionalnu količinu tečnosti što je omogućilo statističku analizu dobijenih rezultata [77, 194].

Kod svih materijala ispitivanih u ovom istraživanju uočeno je upijanje tečnosti i posledično uvećanje mase (bubrenje materijala) u odnosu na inicijalnu masu materijala. Najizraženije upijanje tečnosti, odnosno bubrenje uzoraka zabeleženo je posle prvih 24h od potapanja uzoraka u veštački tkivni fluid, a dobijeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature [30, 65]. Najveće promene u težini uzoraka zabeležene su kod materijala HA-CS. Kod materijala CS i MTA količina upijene tečnosti bila je slična i značajno manja u odnosu na materijal HA-CS. Posle 24h pa do kraja eksperimentalnog perioda od 28 dana, kod svih materijala, uočene su samo minimalne oscilacije u težini uzoraka, što je takođe saglasno sa podacima iz literature [30, 65].

Dobijeni rezultati ukazali su na hidrofilnu prirodu svih testiranih materijala. Najveća sorpcija tečnosti na kraju eksperimentalnog perioda od 28 dana, izmerena je kod materijala HA-CS, dok su kod materijala CS i MTA izmerene vrednosti bile slične i značajno niže u odnosu na materijal HA-CS. Vrednosti sorpcije tečnosti posle 28 dana izmerene kod MTA u skladu su sa nalazima Formosa i sar. (2013) koji su sorpciju tečnosti određivali u istom vremenskom periodu. Obzirom na to da je najveće upijanje tečnosti evidentirano u prvih 24h, dobijeni rezultati se mogu uporediti i sa rezultatima drugih autora koji su upijanje tečnosti MTA pratili u kraćim vremenskim intervalima [65]. U studiji Gandolfi i sar. (2012) koji su vrednosti upijene tečnosti određivali posle 24h čuvanja uzoraka u dejonizovanoj vodi, dobijeni rezultati (13.96%) u skladu su sa rezultatima ovog istraživanja [77].

Iako sličnog hemijskog sastava, eksperimentalni materijal CS je ispoljio nešto veću sorpciju tečnosti u odnosu na MTA. Dobijeni rezultati bi mogli biti posledica različite veličine čestica ovih materijala. Manje čestice nanostrukturnog kalcijumsilikatnog sistema (CS) i posledično veća reaktivna površina mogle su omogućiti izraženiji kontakt molekula tečnosti sa česticama ovog materijala što je moglo rezultirati i većom sorpcijom tečnosti. Kod materijala HA-CS izmerena je značajno veća sorpcija tečnosti u odnosu na materijale CS i MTA, što se pored male veličine čestica može objasniti i drugačijim hemijskim sastavom ovog materijala. U sintezi materijala, pored kalcijum silikatnog sistema korišćen je i hidroksiapatit u količini od 40%, što je imajući

u vidu fizička svojstva hidroksiapatita, moglo imati uticaja na ponašanje ovog materijala u vlažnoj sredini.

Prema mišljenju pojedinih autora, upijanje tečnosti i posledično bubrenje materijala može poboljšati njegove zaptivajuće sposobnosti sa potencijalnom redukcijom mikrocurenja između materijala i zubnih struktura. Istovremeno, obzirom da se apsorbovana tečnost nalazi unutar materijala, izražena sorpcija može povećati rizik od curenja kroz sam materijal [30].

Sorpcija tečnosti evidentirana u ovom istraživanju kod svih cemenata koji su testirani posle kompletnog vezivanja (24h) ukazuje na inicijalno poroznu strukturu svih ispitivanih materijala. Određeni stepen poroznosti je karakteristika svih dentalnih cemenata koji se pripremaju sa vodom i posledica je inkorporiranja mehurića vazduha tokom procesa mešanja. Međutim, u slučaju kalcijum silikatnih cemenata koji su testirani u ovom istraživanju, specifična amorfnost struktura samih cemenata značajno doprinosi njihovoj poroznosti [68]. Mešanjem čestica praha sa vodom nastaje porozni kalcijum silikatni hidratni gel koji vremenom očvršćava. Pore unutar vezanog cementa mogu se ispuniti vodom iz okruženja, s tim da se očvršćavanjem cementa broj pora smanjuje čime se može objasniti i manje upijanje tečnosti u funkciji vremena [20], što je potvrđeno i u ovom istraživanju.

U brojnim studijama koje su poroznost kalcijum silikatnih cemenata određivale na osnovu razlike u težini materijala pre i posle čuvanja u tečnosti, potvrđena je izražena poroznost ovih materijala [43, 65, 80]. Dobijene vrednosti za poroznost kalcijum silikatnih cemenata variraju u zavisnosti od uslova testiranja, kao i u zavisnosti od tipa korišćenog materijala odnosno njegovog hemijskog sastava. Poznato je da bizmut oksid, koji se najčešće dodaje komercijalnim kalcijum silikatnim cementima radi postizanja rendgen kontrastnosti, povećava poroznost materijala [43]. Bizmut oksid je nerastvorljiv u vodi tako da njegovo dodavanje prahu umanjuje količinu kalcijum silikatnih čestica, što rezultira većom količinom neizreagovane vode unutar cementa, a što posledično vodi većoj poroznosti. Takođe, veća količina vode upotrebljena za mešanje cementa rezultira poroznijim cementom [68]. Poroznost MTA, dobijena u ovom istraživanju slična je rezultatima De Souza i sar. (2013) [51]. Poroznost eksperimentalnog materijala CS komparabilna je sa MTA-om i značajno manja u odnosu na materijal HA-CS. Najveća poroznost materijala HA-CS u skladu je sa rezultatima sorpcije tečnosti gde su najveće

vrednosti zabeležene takođe kod ovog materijala. S obzirom da se eksperimentalni materijali testirani u ovom istraživanju razlikuju samo u pogledu prisustva hidroksiapatita (HA-CS), razlike u poroznosti između ovih materijala mogle bi se pripisati najpre njihovom različitom hemijskom sastavu. Dobijeni rezultati su u skladu sa nalazima Vitti i sar. (2013) koji su ispitujući različite formulacije eksperimentalnih kalcijum silikatnih cemenata utvrdili da prisustvo hidroksiapatita u kalcijum silikatnom cementu značajno povećava njegovu poroznost [194]. Poroznost hidroksiapatita dobro je poznata i smatra se jednom od prednosti ovog materijala prilikom njegove primene u reparaciji mukoskeletnog i stomatognatnog sistema, gde ovakva struktura omogućava prorastvanje tkiva unutar pora materijala. Kod endodontskih cemenata velika poroznost nije poželjna s obzirom na to da je blisko povezana sa velikom rastvorljivošću materijala [51].

Pomenuti nalazi potvrđeni su i rezultatima ovog istraživanja. Materijal HA-CS je pokazao izraženiju rastvorljivost u odnosu na materijale CS i MTA. Na bazi dobijenih rezultata moglo bi se pretpostaviti da je izražena poroznost materijala omogućila značajnu sorpciju tečnosti što je rezultiralo većom rastvorljivošću materijala HA-CS (> 12%). Rastvorljivost materijala CS bila je značajno manja u odnosu na HA-CS i slična rastvorljivosti kontrolnog materijala (MTA). Čestice manje veličine koju su kao što je napomenuto mogle dovesti do izraženije sorpcije tečnosti, mogle su usloviti i nešto izraženiju rastvorljivost materijala CS u odnosu na MTA.

U ovom istraživanju, tokom čuvanja uzoraka u tkivnoj tečnosti zabeležen je minimalan gubitak težine svih materijala. Gubitak u težini kalcijum silikatnih cemenata u funkciji vremena, zabeležen je i u istraživanjima Bodanezi i sar. (2007), kao i Chiang & Ding (2013) [20, 41]. Dobijene rezultate autori su objasnili oslobađanjem solubilne frakcije materijala u vlažnoj sredini. Glavna solubilna frakcija kalcijum silikatnih cemenata je kalcijum hidroksid koji u vlažnoj sredini disosuje na Ca i OH jone. Kako se ova hemijska disocijacija odvija u prisustvu tečnosti, pretpostavlja se da će u kliničkim uslovima aplikovani materijali postati izvor kalcijum hidroksida, odnosno da će vlažna sredina u *in vivo* uslovima obezbediti konstantu disocijaciju jona iz materijala [68, 77]. Alkalni pH i joni kalcijuma su zaslužni za bioaktivnost kalcijum silikatnih cemenata i njihovo antimikrobno delovanje [165, 184]. Iako veća rastvorljivost materijala može rezultirati višim vrednostima pH i većim oslobađanjem jona kalcijuma odnosno

izraženijom bioaktivnošću materijala, balans između oslobađanja jona kalcijuma i rastvorljivosti je neophodan u cilju očuvanja integriteta cementa [35].

Borges i sar. (2011), su SEM analizom uzoraka, nakon testa rastvorljivosti uočili morfološke promene kako na spoljašnjoj tako i na unutrašnjoj površini kalcijum silikatnih materijala. Posle testa, na spoljašnjoj površini MTA uočene su ravne strukture koje nisu uočene pre potapanja uzoraka u tečnost [22]. Slične promene uočene su i u ovom istraživanju, ali obzirom na to da EDX analiza nije urađena ne može se sa sigurnošću tvrditi o kakvim strukturama je reč. Ipak, u literaturi je dokumentovano da se potapanjem kalcijum silikatnih cemenata u tečnosti bogate fosfatnim jonima na površini materijala stvara hidroksapatit [74, 165]. Pojedini autori su mišljenja da upravo istaloženi hidroksiapatit na površini materijala može kompenzovati njegovu rastvorljivost [22, 41]. U tom smislu značajni su nalazi Gandolfi i sar. (2013) koji su ispitujući mikro CT-om mikrostrukturu kalcijum silikatnih materijala posle 7 dana i 6 meseci u fosfatnom rastvoru, uočili redukciju veličine i procentualne zastupljenosti pora unutar cementa u funkciji vremena, a što su pripisali upravo taloženju hidroksiapatita unutar cementa [79].

Generalno, rastvorljivost MTA iako ispitivana u brojnim istraživanjima još uvek je stvar debate među istraživačima. Prema rezultatima velikog broja istraživanja MTA je nerastvorljiv odnosno minimalno rastvorljiv cement [65, 68, 182]. Pa ipak u literaturi su dostupni podaci i o izraženoj rastvorljivosti ovog materijala [77, 80], kao i o porastu rastvorljivosti u funkciji vremena [69]. Generalno, rezultate rastvorljivosti različitih istraživača je teško porediti obzirom na pomenute, brojne metodološke razlike prilikom realizacije eksperimenata. Različiti rezultati mogu biti posledica pre svega različitog odnosa praha i tečnosti prilikom mešanja materijala, različitog vremena čuvanja uzoraka u tečnosti ili ispitivanja različitih tipova MTA, delimično različitog hemijskog sastava [146]. Kao što je napomenuto, veća količina upotrebene vode prilikom mešanja, rezultira poroznijim i posledično rastvorljivijim cementom [35, 68]. Takođe količina bizmut oksida u prahu kalcijum silikata može biti značajna za njegovu rastvorljivost, obzirom na činjenicu da je ovaj oksid nerastvorljiv u vodi i da time doprinosi nerastvorljivosti MTA [30]. Prema pisanju Chiang i Ding-a (2012) poroznost i rastvorljivost kalcijum silikatnih cemenata je i pH zavisna, pri čemu je i poroznost i rastvorljivost izraženija u kiselj sredini [41]. Bizmut oksid je rastvorljiv u kiselinama, tako da niske vrednosti pH sredine u koju se materijal aplikuje (usled inflamacije ili

prisustva infekcije) mogu rezultirati njegovim većim izluživanjem i posledičnom degradacijom cementa [27].

Prilikom interpretacije rezultata rastvorljivosti kalcijum silikatnih cemenata neophodno je imati u vidu i nedostatke standardnih testova koji se uobičajeno koriste za procenu ovih svojstava. Prema definiciji rastvorljivost čvrstih materijala se određuje količinom supstance koja se može rastvoriti u određenoj količini rastvarača. Testovi koji se uobičajeno koriste se baziraju na razlici u težini uzoraka materijala pre i posle njihovog potapanja u tečnost, odnosno posle kompletnog isušivanja uzoraka. Iako je to standardan način za procenu rastvorljivosti njime se zapravo meri izluživanje materijala rastvorljivih u vodi, a ne rastvorljivost [146]. Pored toga, u realnim kliničkim uslovima samo mali deo materijala je u kontaktu sa vlagom okolnog tkiva, za razliku od labaratorijskih uslova gde je ceo uzorak u kontaktu sa velikom količinom tečnosti zbog čega je i osmotski efekat kalcijum silikatnih cemenata izraženiji [68]. Takođe pod ovakvim eksperimentalnim uslovima čestice materijala se mogu odvojiti od cementa tokom njegovog čuvanja u tečnosti sa posledičnim gubitkom težine materijala, a sam cement može apsorbovati tečnost, što sve zajedno može sprečiti procenu realne rastvorljivosti materijala [20].

Gandolfi i sar. (2012) su ispitujući rastvorljivost MTA izmerili značajan gubitak težine materijala posle 24h čuvanja uzoraka u destilovanoj vodi. Rastvorljivost od više od 18%, autori su pripisali dugom vremenu vezivanja i posledičnoj dezintegraciji materijala pre nego njegovoj stvarnoj rastvorljivosti. Važno je napomenuti da su se u istraživanju pomenutih autora, uzorci MTA vezivali 50% kraće u odnosu na vreme neophodno za inicijalno vezivanje materijala (165 minuta), te da je nekompletno vezivanje MTA moglo biti jedan od razloga njegove izraženije rastvorljivosti odnosno dezintegracije [77].

Generalno, ispiranje kalcijum silikatnih cemenata sa mesta aplikacije, odnosno sklonost sveže zamešanog materijala da se dezintegriše u kontaktu sa tkivnim fluidima smatra se jednom od glavnih mana ovih materijala [65], a posledica je pre svega, dugog vezivanja materijala. U većini istraživanja testiranje rastvorljivosti se realizuje nakon 24h vezivanja uzoraka, što zapravo ne odgovara realnim kliničkim uslovima u kojima se materijal postavlja neposredno po mešanju. Bez obzira na to što je vezivanje eksperimentalnih materijala koji su ispitivani u ovom istraživanju značajno kraće, da bi se sprečila dezintegracija MTA (koji je korišćen kao kontrolni materijal), istraživanje je

realizovano posle 24-časovnog vezivanja svih testiranih materijala. Time je jedna od osnovnih prednosti eksperimentalnih materijala bila isključena.

Dugo vezivanje kalcijum silikatnih cemenata, osim što povećava rizik od ispiranja, otvara pitanje moguće interakcije kalcijum silikata sa komponentama restaurativnih dentalnih materijala. I po ovom pitanju mišljenja su podeljena. Camilleri i sar. (2011) su uočili da postavljanje glas jonomer cementa preko sveže zamešanog MTA rezultira izraženim narušavanjem strukture materijala na njihovom međuspoju, usled sklonosti GJC da upije vodu koja je neophodna za vezivanje MTA [34]. Eid i sar. (2012) u nedavnoj studiji takođe uočavaju određene mikrostrukturne promene na međuspojevima ovih materijala ali, suprotno prethodnim autorima, zaključuju da su one privremene i prolazne i da se postavljanjem GJC preko MTA ne narušavaju dublje strukture materijala kao ni njihovo vezivanje [55]. O tome da je moguće postaviti GJC preko nepotpuno vezanog MTA i time endodontski tretman realizovani u jednoj poseti pisali su ranije i drugi autori [138].

Imajući u vidu sve navedeno, moglo bi se zaključiti da bi primena nanostrukturnih eksperimentalnih materijala, naročito kalcijum silikatnog sistema, sa česticama izražene aktivnosti i značajno kraćeg vezivanja u odnosu na materijale sličnog hemijskog sastava ali značajno dužeg vremena vezivanja, mogla značajno umanjiti rizik od dezintegracije i ispiranja materijala sa mesta aplikacije i stvoriti uslove za postavljanje definitivne restauracije u istoj poseti.

U ovom delu istraživanja ispitivana je i rastvorljivost i poroznost eksperimentalnih silera na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS siler) i mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS siler). Osnovne formulacije materijala CS i HA-CS su modifikovane dodatkom hemijski inertnih supstanci da bi se unapredila fluidnost materijala, odnosno materijalima obezbedila konzistencija kanalnih silera. Istovremeno, radno vreme i vreme vezivanja materijala je produženo čime su stvoreni uslovi za eventualnu primenu materijala u svojstvu kanalnih silera.

Tokom realizacije eksperimenta, utvrđeno je da sileri CS i HA-CS, za razliku od osnovnih formulacija materijala CS i HA-CS kao i u odnosu na kontrolni siler, pokazuju makroskopski vidljive znake dezintegracije u periodu između 24h i 7 dana boravka u

tečnosti. Na bazi toga, odlučeno je da se njihova svojstva testiraju u kraćem vremenskom intervalu (24h).

Dobijeni rezultati ukazali su na značajno veću apsorpciju tečnosti kao i rastvorljivost eksperimentalnih silera CS i HA-CS u odnosu na kontrolni siler Acroseal. Tokom 24h u veštačkom tkivnom fluidu uzorci Acroseal-a su apsorbovali minimalnu količinu tečnosti što ukazuje na neporoznu strukturu ovog silera. Takođe, određivanjem stepena rastvorljivosti, uočeno je da je ovaj siler praktično nerastvorljiv u veštačkom tkivnom fluidu. Dobijeni rezultati su u skladu sa dosadašnjim istraživanjima [85, 154]. Prema podacima iz literature, Acroseal se po svojim fizičko-hemijskim svojstvima razlikuje od drugih komercijalnih silera na bazi kalcijum hidroksida. Naime, Eldeniz i sar. (2007) su utvrdili da Acroseal oslobađa manje kalcijumovih jona, kao i da ima niže vrednosti pH u odnosu na Sealapex i Apexit, što su pripisali manjoj rastvorljivosti ovog silera. Acroseal je siler na bazi kalcijum hidroksida u epoksi smoli, koja je poznata po svojoj nerastvorljivosti, pa su pomenuti autori mišljenja da je upravo epoksi matriks zaslužan za slabiju disocijaciju jona odnosno nerastvorljivost silera [56]. Da je po svojoj rastvorljivosti Acroseal sličniji silerima na bazi epoksi smola, nego silerima na bazi kalcijum hidroksida potvrđeno je i u istraživanju Grge i sar. (2011) [85]. Minimalna rastvorljivost Acroseal-a posle 28 dana u destilovanoj vodi (0.7%) zabeležena je i u istraživanju Azadi i sar. (2012) [11].

Imajući u vidu gore navedeno, dobijeni rezultati u ovoj studiji se najpre mogu pripisati različitom hemijskom sastavu testiranih silera. Silere CS i HA-CS, u skladu sa njihovim hemijskim sastavom, odlikuje porozna struktura te je izrazita apsorpcija tečnosti evidentirana u istraživanju, očekivana. Takođe, izraženija poroznost materijala rezultira i većom rastvorljivošću. Značajno je napomenuti da su sileri CS i HA-CS pokazali izraženiju rastvorljivost posle 24h u tkivnom fluidu, u odnosu na osnovne formulacije materijala CS i HA-CS posle 28 dana u veštačkom tkivnom fluidu. Iako statistička analiza nije urađena obzirom da se radi o dva nezavisna eksperimenta, realizovana pod drugačijim uslovima, očigledno je da su supstance dodate materijalima radi unapređenja njihove fluidnosti imale negativan uticaj na integritet materijala u tečnosti, odnosno značajno povećale rastvorljivost.

Pregledom literature, takođe se uočava izrazita rastvorljivost i poroznost kako komercijalnih tako i eksperimentalnih biokeramičkih silera, kao i to da su nove

formulacije silera na bazi kalcijum silikata i kalcijum fosfata rastvorljivije od MTA i drugih sličnih kalcijum silikatnih cemenata [22, 62, 194]. Biokeramički sileri su sintetisani sa ciljem da se iskoriste dobra biološka svojstva biokeramičkih materijala i polje indikacija ovih materijala proširi i na opturaciju kanala korena. S tim u vezi, bilo je neophodno konzistenciju kalcijum silikatnih materijala učiniti prikladnom za pomenutu kliničku indikaciju. Osnovne formulacije kalcijum silikatnih cemenata modifikovane su dodavanjem različitih hemijskih supstanci. Jedan od komercijalno dostupnih biokeramičkih silera je i MTA Fillapex (Londrina, Brazil), dvokomponentni siler na bazi kalcijum silikata i salicilatne smole. Poslednjih par godina intezivno se istražuje i iROOT SP, biokeramički siler na bazi kalcijum silikata sa dodatkom kalcijum fosfata. Ovaj siler, je unapred pripremljen i pakovan u špricu sa ciljem da se unapredi odnosno olakša njegova aplikacija. Rastvorljivost pomenutih silera ispitivana je u studiji Borges i sar. (2011), i posle eksperimentalnog perioda od 7 dana čuvanja uzoraka u dejonizovanoj vodi, rastvorljivost iROOT SP-a iznosila je više od 20%, što je komparabilno sa rezultatima ovog istraživanja u kome su testirani eksperimentalni sileri vrlo sličnog hemijskog sastava. Rastvorljivost MTA Fillapex-a iznosila je više od 14%, pri čemu su oba komercijalna silera bila značajno rastvorljivija od MTA. Očekivano oba silera su oslobodila i veću količinu kalcijumovih jona u odnosu na MTA. SEM analizom su utvrđene i značajne razlike u izgledu površine pomenutih silera pre testa rastvorljivosti. Površina uzoraka MTA Fillapex-a je bila sličnija površini uzoraka AH Plus silera nego površini iROOT SP-a, usled smole u sastavu silera, dok je površina iROOT SP-a bila značajno poroznija što je mogao biti razlog i njegove veće rastvorljivosti u odnosu na MTA Fillapex [22]. Treba takođe imati u vidu činjenicu da svaka izmena u hemijskom sastavu materijala koja utiče na njegova fizičko-hemijska svojstva može uticati i na biološka svojstva materijala. O većoj toksičnosti MTA Fillapex-a u odnosu na konvencionalne kalcijum silikatne cemente pisali su drugi autori, a dobijene rezultate upravo su pripisali salicilatnoj smoli u sastavu materijala [18, 166].

Obzirom da sileri moraju da obezbede dugoročno zaptivanje sistema kanala korena i onemogućće mikrocurenje iz apikalnog odnosno koronarnog pravca, mala rastvorljivost, odnosno balans između oslobađanja jona kalcijuma i rastvorljivosti je neophodan. Shodno tome, izražena rastvorljivost silera testiranih u ovom istraživanju, bez obzira što može doprineti većem oslobađanju jona kalcijuma, nije poželjna i ukazuje da su neophodne dalje modifikacije u sastavu eksperimentalnih silera CS i HA-CS.

6.1.2. DISKUSIJA REZULTATA ISPITIVANJA MARGINALNE MIKROPROPUSTLJIVOSTI

Za procenu marginalne mikropropustljivosti materijala u *in vitro* studijama uobičajeno se koriste metode prodora boje [92, 180], prodora bakterija [145] i filtracije fluida [48].

U ovom istraživanju za procenu mikropropustljivosti je primenjena metoda prodora boje koja je zbog svoje jednostavnosti korišćena u velikom broju istraživanja [64, 92, 163, 180, 190]. Jedna od glavnih zamerki metodi prodora boje je u tome što je veličina molekula boja koje se uobičajeno koriste, manja od veličine bakterija [92]. Takođe, ovom metodom nije moguće odrediti zapreminu apsorbovane boje već se meri najdublja tačka do koje je boja prodrila. Ipak, od materijala koji onemogućavaju prodor malih molekula boje, može se očekivati da će sprečiti mikrocurenje većih molekula poput bakterija i njihovih produkata [186].

Prilikom odabira boje za procenu marginalne propustljivosti uzeta je u obzir hemijska priroda materijala koji se ispituje. Naime, Wu i saradnici (1998) su ustanovili da je metilen plavo nestabilno u prisustvu alkalnih supstanci što rezultira njegovim obezbojavanjem. Kako je kalcijum hidroksid glavna hemijska smeša koja se oslobađa iz MTA, upotreba metilen plavog prilikom testiranja MTA i drugih materijala sličnog hemijskog sastava, bi usled diskoloracije boje, mogla dovesti do nepouzdanih rezultata [198]. Rastvor srebra nitrata je stabilan u prisustvu materijala visokog pH, a čestice srebra imaju veliku molekulsku masu, što su bili razlozi za njegovu primenu u ovom istraživanju [190].

Marginalna mikropropustljivost je ispitivana nakon aplikacije testiranih materijala u eksperimentalno preparisane intreradiksne perforacije na ekstrahovanim zubima. Tokom eksperimentalnog perioda zubi su čuvani u inkubatoru, u sunderu natopljenim veštačkim tkivnim fluidom da bi se što približnije simulirali klinički uslovi [145]. Vrednosti prodora boje izražene su u milimetrima, određivanjem najdublje tačke do koje je boja prodrila. Prečnik preparisanih kaviteta odgovarao je prečniku borera dok je dubina kaviteta bila različita. Razlike u debljini poda komore pulpe (pa posledično i u dimenzijama perforacija), u kliničkim uslovima mogu biti još izraženije s obzirom na fiziološki ali i patološki status zuba prilikom tretmana, kao i činjenice da perforacije

najčešće nastaju kao posledica potrebe za ekstenzivnijim uklanjanjem dentina u cilju lociranja kalcifikovanih kanala [190].

U ovom istraživanju, merena je najdublja tačka prodora boje uz napomenu da longitudinalnim sečenjem zuba, koje se uobičajeno primenjuje, nije moguće precizno utvrditi u kom delu kaviteta je boja najdublje prodrła. Iz tih razloga, prodor boje pri određivanju *in vitro* mikropropustljivosti se ne može direktno uporediti sa kompleksnim *in vivo* mikrocurenjem ali se može smatrati indikatorom moguće propustljivosti materijala u kliničkim uslovima [180].

Najmanji prodor boje u ovom istraživanju je uočen je kod materijala CS. Vrednosti prodora boje kod MTA bile su nešto veće ali bez statistički značajne razlike. S obzirom na to da su CS i MTA materijali sličnog hemijskog sastava i njihove fizičke osobine mogu biti slične. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja, MTA ispoljava značajno manje mikrocurenje u odnosu na Super EBA cement, amalgam i IRM cement [186], bez razlika u kvalitetu rubnog zaptivanja sive i bele formulacije materijala. Takođe, obe formulacije materijala ostvaruju adekvatno rubno zaptivanje i u kavitetima koji su kontaminirani krvlju [137, 186], zbog čega je ovaj materijal inicijalno i preporučen za tretman korenskih perforacija i zatvaranje vrha korena nakon apeksne hirurgije. Prema mišljenju pojedinih autora [94, 176], dobro rubno zaptivanje kalcijum silikatnih cemenata je posledica ekspanzije materijala prilikom vezivanja. Sarkar i sar. (2005) su dobro rubno zaptivanje MTA pripisali stvaranju hidroksiapatita na površini materijala u kontaktu sa tkivnim fluidima [165].

Ipak, različitim metodama ispitivanja mikropropustljivosti uočeno je da MTA i slični kalcijum silikatni cementi nemaju sposobnost apsolutnog hermetičnog zaptivanja [48, 49, 145, 190] što je u skladu i sa rezultatima ovog istraživanja. U grupi uzoraka ispunjenih materijalom CS, izmerene su nešto manje vrednosti prodora boje u odnosu na uzorke ispunjene MTA-om ali je prodor boje uočen u većem broju uzoraka nego u MTA grupi. Izmerene vrednosti prodora boje u MTA grupi bile su vrlo različite, a dobijeni rezultati su u skladu sa nalazima De Deus i sar. (2007) koji su ispitujući marginalnu mikropropustljivost različitih vrsta kalcijum silikatnih cemenata (PC, MTA Angelus i MTA Bio), pisali o vrlo varijabilnim rezultatima unutar grupa. U istraživanju ovih autora mikropropustljivost je detektovana u svim uzorcima, bez statistički značajnih razlika u pogledu propustljivosti različitih komercijalnih kalcijum silikatnih cemenata [49].

Hashem i sar. (2008) uočavaju razlike u propustljivosti različitih komercijalnih preparata, i ukazuju na značajno veći prodor boje kod MTA Angelus-a u odnosu na ProRoot MTA. Dobijene rezultate autori su pripisali različitom hemijskom sastavu i različitoj brzini vezivanja testiranih materijala. Izbacivanjem gipsa, proizvođači su vezivanje MTA Angelus-a značajno skratili, što je moglo biti uzrok nedovoljnog vlaženja čestica materijala i samim tim lošije adaptacije materijala za zidove kaviteta [92].

Prema rezultatima sprovedenog istraživanja, nešto manji prodor boje uočen je kod materijala CS, iako je vreme vezivanja eksperimentalnog materijala značajno kraće (15 minuta) u odnosu na kontrolni MTA Angelus. Razlog tome bi mogla biti nanostruktura materijala CS koja obezbeđuje izraženu aktivnost čestica i posledičnu brzu hidrataciju ovog materijala.

U studijama u kojima je propustljivost kalcijum silikatnih cemenata testirana metodom prodora bakterija takođe je detektovana određena propustljivost materijala. Montelano i sar. (2006) tokom 30-dnevne studije, najizraženije mikrocurenje beleže u prvim danima od aplikacije MTA. Nalaze da kontaminacija kanala korena pljuvačkom rezultira značajno lošijim zaptivanjem u odnosu na kontaminaciju kanala krvlju i fiziološkim rastvorom [137]. Parirokh i sar. (2009) testirajući dugoročne (180 dana) zaptivajuće sposobnosti kalcijum silikata, detektuju prodor bakterija kod svih uzoraka ali tek između 39 i 73 dana eksperimenta. Isti autori uočavaju i da je čuvanje uzoraka u fosfatnom rastvoru pre testiranja mikropropustljivosti, rezultiralo boljim adhezivnim sposobnostima materijala (curenje bakterijala detektovano značajno kasnije) u odnosu na uzorke čuvane u slanom (fiziološkom) rastvoru. Na bazi dobijenih rezultata zaključeno je da tkivni fluidi unapređuju zaptivajuće sposobnosti kalcijum silikatnih cemenata [145].

Za razumevanje dobijenih rezultata u ovom istraživanju, značajno je napomenuti i način prodora boje. U uzorcima u kojima je uočen prodor boje ne može se govoriti o striktno marginalnoj mikropropustljivosti. Naime, osim boje detektovane na spoju materijala i zubnih struktura uočeno je prebojavanje samog materijala koje je verovatno posledica apsorpcije boje od strane materijala. Do sličnih rezultata došli su i Tobón-Arroyave i sar. (2007) koji su utvrdili da se način prodora boje kod MTA razlikuje u odnosu na konvencionalne cemente (IRM i Super EBA). Ispitujući mikropropustljivost materijala nakon njihove aplikacije u formi apeksnog čepa prodor boje kod IRM-a i Super EBA cementa detektovan je kružno oko materijala odnosno između materijala i dentina

kanala korena. Suprotno tome, u svim uzorcima sa MTA-om uočena je apsorpcija boje čitavom debljinom materija [180]. Razlog ovakvih rezultata može biti sama struktura cementa izgrađena od brojnih pora i kapilara koji su mogli dovesti do izraženije propustljivosti. Važno je međutim napomenuti da su se u pomenutom istraživanju uzorci MTA vezivali samo 30 minuta pre njihovog potapanja u boju, te dobijeni rezultati mogu biti i posledica nekompletnog vezivanja materijala. U ovom istraživanju uzorci materijala su se vezivali 24h i nakon toga su inkubirani u vlažnoj sredini još 6 meseci. Ovakav protokol je mogao rezultirati kompletnijim vezivanjem i posledično manjim prodorom odnosno manjom apsorpcijom boje.

Generalno, pregledom literature uočava se nekonzistentnost rezultata u pogledu dobijenih vrednosti propustljivosti kalcijum silikatnih cemenata u okviru različitih metoda ispitivanja. Iz dosadašnjih istraživanja može se zaključiti da brojni faktori utiču na mikropropustljivost MTA, od vrste boje, pH vrednosti boje, uslova čuvanja uzoraka pre eksperimenta, odnosno vremena vezivanja uzoraka materijala pre njihovog potapanja u boju [186]. Takođe, različiti rezultati mogu biti posledica razlika u dijametru i dubini perforacija, broja uzoraka, odnosno razlika u trajanju opservacionih perioda [49].

Kod materijala HA-CS izmeren je najveći prodor boje, a u većini uzoraka je uočena i izražena dezintegracija materijala. Veći deo materijala HA-CS čini hidroksiapatit, poznat po poroznoj strukturi i neadekvatnim mehaničkim svojstavima, te su dobijeni rezultati očekivani. Prilikom sinteze materijala HA-CS, hidroksiapatitu je dodat kalcijum silikatni sistem upravo u cilju poboljšanja njegovih mehaničkih svojstava. Međutim na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da dodata količina kalcijum silikata (HA: CS, 2:1) u eksperimentalnim uslovima ove studije, nije sprečila rastvaranje i ispiranje materijala sa mesta aplikacije, čime je i u ovom delu istraživanja potvrđena izražena poroznost i rastvorljivost kalcijum fosfatnih cemenata. Dobijeni rezultati su u skladu sa nalazima Sanghavi i sar. (2013) koji su ispitujući mogućnost primene kalcijum fosfatnog cementa u tretmanu korenskih perforacija uočili značajan prodor boje već nakon 24h od aplikacije materijala. CPC je bio značajno propustljiviji od MTA što je takođe u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju [163]. U studiji Tsatsas i sar. (2005) postavljanje kalcijum fosfatnog cementa, u funkciji matriksa sa ciljem da se spreči ekstruzija materijala preko rubova kaviteta, rezultiralo je kompletnim rastvaranjem materijala tokom eksperimentalnog perioda od 8 meseci [190].

Značajno je napomenuti da je i u pojedinim uzorcima sa MTA-om i materijalom CS, uočena površinska dezintegracija odnosno rastvaranje spoljašnjeg sloja materijala, ali u znatno manjoj meri u odnosu na materijal HA-CS. U kontaktu sa vodom ili fosfatnim rastvorom, cement otpušta kalcijumove jone sa delimičnom dekalifikacijom kalcijum silikatnog hidrata, a ekspanzija cementa posle kontakta sa tečnošću može rezultirati mikropukotinama, što sve zajedno može predstavljati prepreku dugoročnoj stabilnosti materijala [65].

Ipak, prilikom tumačenja rezultata *in vitro* studija, mora se imati u vidu da tokom ovih ispitivanja izostaje kompleksan tkivni odgovor na aplikovane materijale. Naime, jedna od karakteristika bioaktivnih materijala testiranih u ovom istraživanju je stvaranje hidroksiapatita na njihovoj površini u kontaktu sa tkivnim fluidima [74, 165], kao i stvaranje kalcifikovanog tkiva preko kalcijum silikatnih odnosno kalcijum fosfatnih cemenata. Stoga bi se moglo pretpostaviti da u kliničkim uslovima ne bi došlo do površinske dezintegracije materijala u tom obimu. Moglo bi se očekivati da bi dezintegracija bila samoograničavajuća i da bi hidroksiapatit, formiran u funkciji vremena mogao ispuniti pore unutar materijala i obezbediti hemijsku vezu sa dentinom i time doprineti kvalitetnijem rubnom zaptivanju [79, 149].

6.1.3. DISKUSIJA REZULTATA ISPITIVANJA JAČINE VEZE MATERIJALA SA DENTINOM KANALA KORENA

Među brojnim zahtevima koji se postavljaju pred endodontske materijale, svakako jedan od najznačajnijih je i otpornost na dislokaciju, odnosno otpornost materijala na mehaničke stresove tokom operativnih procedura (kondezacije definitivnih restaurativnih materijala), odnosno tokom funkcije zuba [86]. Stoga je adhezivnost, odnosno sposobnost materijala da se integriše sa zubnim strukturama, osobina koja u velikoj meri određuje mogućnost kliničke primene materijala [71].

Za procenu adhezivnosti materijala koriste se različite vrste testova: test savojne čvrstoće, test otpornosti na istezanje i test smicanja (engl. push-out test). U savremenoj literaturi, push-out test je najčešće korišćen test za procenu adhezivnosti kalcijum silikatnih materijala u *in vitro* uslovima [57, 59, 65, 86, 97, 158, 168]. Test smicanja je jednostavna i efikasna metoda kod koje se fraktura materijala događa paralelno sa međuspojem materijala i dentina, što omogućava realnu procenu jačine veze materijala sa dentinom [161], što je bio razlog da se ovaj test primeni i u ovom istraživanju.

U prvom delu istraživanja jačina veze testiranih cemenata i silera, ispitivana je na dentinskim diskovima u skladu sa metodologijom aktuelnih istraživanja [65, 86]. Korišćeni su dentinski diskovi jednake debljine sa kavitetima paralelnih zidova, standardizovane veličine i oblika, čime je isključena mogućnost uticaja različite morfologije korenova na dobijene rezultate.

Imajući u vidu da se testirani materijali shodno indikacijama, postavljaju u vlažnu sredinu, uzorci su čuvani u inkubatoru na 37°C, umotani u gazu natopljenu veštačkim tkivnim fluidom, da bi se što približnije simulirali klinički uslovi [145].

Vrednosti jačine veze kontrolnog materijala, MTA dobijene u ovom istraživanju u skladu su sa podacima iz literature [57, 65]. Kod materijala CS i HA-CS veza je bila nešto slabija ali bez statistički značajne razlike u odnosu na MTA. Dobijeni rezultati mogu se najpre objasniti sličnim hemijskim sastavom materijala i posledično sličnim načinom vezivanja za zubne strukture. Poznato je da se veza biokeramičkih materijala sa dentinom kanala korena ostvaruje depozicijom hidroksiapatita na površini materijala usled postepenog rastvaranja materijala i reakcije oslobođenog kalcijuma sa fosfatima iz

tkivnih fluida. Inicijalno, izgrađeni kristali hidroksiapatita ispunjavaju mikro prostore između dentina i materijala obezbeđujući mehaničku vezu materijala sa dentinom. Vremenom se reakcijom apatita sa dentinom ostvaruje hemijska veza [165]. Nedavno je demonstrirano da osim što se talože na površini materijala, mineralni kristali prodiru i u dentinske kanaliće doprinoseći tako boljoj adhezivnosti materijala [91]. Pri tome količina hidroksiapatita odnosno nivo prodora mineralnih kristala se povećava dužim kontaktom sa tkivnim fluidima [74, 91]. Atmeh i sar. (2012) su mineralne produžetke unutar dentinskih tubula povezane sa mineralnim slojem na dodirnim površinama materijala i dentina nazvali “mineralna infiltraciona zona”, potvrđujući u svom istraživanju ranije pretpostavke da se zapravo radi o hemijskoj vezi materijala sa dentinom [10].

Analizom tipa fraktura nastalih prilikom opterećivanja materijala, zaključeno je da je u većini uzoraka materijala CS i materijala HA-CS nastupila kohezivna fraktura unutar materijala, dok je u manjem broju uzoraka detektovana kombinovana fraktura. U grupi uzoraka ispunjenih MTA-om dominirale su kombinovane frakture. Adhezivne frakture zabeležene su u po jednom uzorku kod svih testiranih materijala. Dobijeni rezultati u skladu su sa nalazima Formosa i sar. (2013) i El Ma’aita i sar. (2013) koji testirajući različite kalcijum silikatne cemente takođe uočavaju kohezivne i kombinovane frakture u najvećem broju uzoraka [57, 65].

Veličina čestica materijala može omogućiti odnosno onemogućiti prodor materijala u dentinske tubule [19] i na taj način uticati na jačinu uspostavljene veze odnosno na tip nastale frakture. U ovom istraživanju testirani su nanostrukturni materijali, uniformnih čestica koje su s obzirom na svoju veličinu mogle penetrirati u dentinske kanaliće i time dovesti do kohezivne frakture unutar samog materijala. Saghiri i sar. (2012) su nakon testiranja jačine veze nanomodifikovanog MTA sa dentinom kanala korena pored adhezivnih fraktura, uočili i frakture kohezivnog tipa unutar nanomaterijala i to povezali sa veličinom čestica [159]. O značaju veličine čestica za tip nastale frakture pisali su i Guneser i sar. (2013). Ispitujući jačinu veze Biodentina i MTA sa dentinom kanala korena, ovi autori su uočili jaču vezu sa dominacijom kohezivne frakture u Biodentin grupi. Pretpostavili su da su se manje čestice Biodentina mogle bolje uzglobiti sa dentinom što je za posledicu imalo frakturu unutar samog materijala, a ne na spoju materijala i dentina [86]. Generalno, u istraživanjima u kojima je evidentirana adhezivna

fraktura MTA, dobijeni nalazi su povezani sa nemogućnošću čestica MTA da penetriraju u dentinske tubule [86, 159].

U ovom istraživanju pre postavljanja test materijala, dentinski diskovi su potopljani u 17% EDTA u cilju uklanjanja razmaznog sloja. Uticaj razmaznog sloja na jačinu veze kalcijum silikatnih materijala je nedovoljno istražen. Ipak, EL-Ma'aita i sar. (2013) su u svom istraživanju utvrdili da uklanjanje razmaznog sloja negativno utiče na jačinu veze kalcijum silikatnih cementa sa dentinom kanala korena [57]. Treba napomenuti da u pomenutom istraživanju, iako statistički značajne, dobijene vrednosti jačine veze kalcijum silikatnih materijala nisu bile drastično različite u zavisnosti od prisustva/odsustva razmaznog sloja. Ipak po mišljenju ovih autora, razmazni sloj ne treba uklanjati, jer može biti značajan za mineralnu interakciju između cementa i dentina. Moguće je da razmazni sloj koji sadrži vlagu može unaprediti hidrataciju hidrofilnih materijala i time poboljšati vezu materijala sa zidovima kanala korena. Treba napomenuti da su ovi autori testirali kalcijum silikatne cimente sa česticama većeg promera od promera dentinskih tubula, te da su smatrali da uklanjanje razmaznog sloja svakako ne bi rezultiralo prodorom čestica u dentinske tubule.

U ovom istraživanju su testirana dva nanostrukturalna cementa te bi se moglo pretpostaviti da je uklanjanje razmaznog sloja moglo omogućiti prodor materijala u dentinske tubule, o čemu govore i dominacija fraktura kohezivnog i kombinovanog tipa kod oba eksperimentalna cementa.

Ispitujući jačinu veze silera sa dentinom kanala korena najveće vrednosti su zabeležene kod Acroseal-a, dok je veza eksperimentalnih silera na bazi kalcijum silikata (CS siler) i silera na bazi mešavine kalcijum silikata i hidroksiapatita (HA-CS siler) bila značajno slabija. Između silera CS i HA-CS nisu utvrđene statistički značajne razlike u pogledu jačine veze sa dentinom kanala korena. Vrednosti jačine veze silera na bazi kalcijum silikata i hidroksiapatita testiranih u ovom istraživanju slične su rezultatima drugih istraživanja gde je ispitivana jačina veze komercijalnih biokeramičkih silera sa dentinom kanala korena [59, 161, 172]. Takođe, dobijene vrednosti za jačinu veze Acroseal-a sa dentinom kanala korena saglasne su sa podacima iz literature [157].

Razlike u jačini veze ispitivanih eksperimentalnih silera u odnosu na konvencionalni siler (Acroseal) mogle bi se pripisati različitom sastavu materijala i

posledično različitom vezivanju materijala za dentin kanala korena. Acroseal je siler na bazi kalcijum hidroksida u smoli. Pema podacima iz literature sileri na bazi smola ostvaruju jaču vezu sa dentinom u odnosu na većinu drugih silera [172]. Mehanizam vezivanja kalcijum silikatnih silera, koji su testirani u ovom istraživanju se razlikuje u odnosu na materijale na bazi smola koji reaguju sa amino grupama kolagena stvaranjem kovalentne veze između kolagena i smole [65].

Osim po jačini veze, testirani sileri su se u odnosu na konvencionalni siler razlikovali i po tipu frakture nastale nakon dislokacije kanalnog punjenja. U grupi uzoraka sa Acroseal-om dominirala je kohezivna fraktura dentina praćena pucanjem uzoraka. U manjem broju uzoraka detektovana je adhezivna fraktura materijala. Ovakav tip frakture materijala koji sadrže različite smole saglasan je sa podacima iz literature [59, 65] i najčešće se pripisuje polimerizacionoj kontrakciji usled vezivanja materijala. Suprotno tome, kod CS silera i HA-CS silera u većem broju uzoraka nastupile su kohezivne i mešovite frakture slično frakturama prilikom testiranja osnovnih formulacija materijala. Kohezivne frakture prilikom ispitivanja novih biokeramičkih silera na bazi kalcijum silikata i hidroksiapatita zabeležene su takođe u istraživanjima Ersahan i sar. (2010) i Shokouhinejad i sar. (2011) [59, 172].

U drugom delu istraživanja jačina veze testiranih silera ispitivana je takođe push-out test-om ali posle konvencionalnog endodontskog tretmana na ekstrahovanim zubima, koja je podrazumevala hemomehaničku preparaciju kanala korena uz finalnu irigaciju a zatim i opturaciju kanala testiranim silerima. I u ovom delu istraživanja, imajući u vidu činjenicu da je hidratacija dikalcijum silikatne faze kalcijum silikatnih cemenata sporija u odnosu na trikalcijum silikatnu fazu [182], nakon opturacije, a pre realizacije testa smicanja, uzorci su inkubirani 7 dana na 37°C, u veštačkom tkivnom fluidu, da bi se omogućilo kompletno vezivanje silera [57, 65].

Važno je napomenuti da su za opturaciju kanala korena u ovom istraživanju korišćeni samo sileri bez gutaperka poena, obzirom da bi upotreba gutaperke mogla rezultirati neuniformnom distribucijom stresa i deformacijom termoplastičnog materijala [59], što bi moglo uticati na dobijene rezultate. Primenjena metodologija je saglasna sa konvencionalnim načinom ispitivanja jačine veze materijala sa dentinom kanala korena [57].

Prema podacima iz literature ne postoje statistički značajne razlike u pogledu jačine veze materijala sa dentinom u zavisnosti od nivoa korena na kome se testira adhezivnost materijala [57, 102]. S obzirom na to da je sila potrebna za dislokaciju materijala direktno proporcionalna adhezivnoj površini uzorka testiranog materijala, u ovom istraživanju su u cilju što uniformnije adhezivne površine uzoraka, korišćene sekcije srednje trećine korenova zuba što je metodološki u skladu sa drugim istraživanjima u literaturi [65, 86, 159].

I u ovom delu istraživanja najjača veza zabeležena je kod Acroseal-a dok su sileri CS i HA-CS pokazali značajno niže vrednosti. Dobijeni rezultati biokeramičkih silera uporedivi su sa rezultatima metodološki sličnih studija. Treba napomenuti da standardi za procenu jačine veze testom smicanja, vezani za debljinu uzorka, promer utiskivača i brzinu opterećivanja nisu ustanovljeni, te da se pomenuti parametri razlikuju između istraživanja, što bi mogao biti razlog za nešto drugačije vrednosti u različitim studijama.

Takođe, prema pisanju Weller i sar.(2008), 7-dnevno čuvanje korenova ispunjenih kalcijum silikatnim cementom u veštačkom tkivnom fluidu dovodi do stvaranja amornog apatita duž apikalne trećine zidova kanala korena. Posle dužeg kontakta sa tkivnim fluidima, kristali apatita su detektovani i na nivou srednje trećine korena. S tim u vezi može se pretpostaviti da bi jačina veze ispitivanih eksperimentalnih silera bile veća pod drugačijim eksperimentalnim uslovima odnosno da bi vrednosti jačine veze rasle dužim čuvanjem uzoraka u veštačkom tkivnom fluidu [196].

U grupi uzoraka sa silerima CS i HA-CS dominirale su kohezivne i mešovite frakture, dok su kod većine uzoraka u Acroseal grupi zabeležene adhezivne frakture materijala, a kod pojedinih uzoraka i kohezivne frakture dentina slično frakturama nastalim prilikom testiranja jačine veze na dentinskim diskovima.

Važno je naglasiti da su u ovom delu istraživanja, gde su čitavi korenovi čuvani u veštačkom tkivnom fluidu, vrednosti jačine veze testiranih silera bile niže u odnosu na deo istraživanja u kome su u veštačkom tkivnom fluidu čuvani dentinski diskovi. Statistička analiza nije urađena, obzirom na razlike u metodološkom pristupu, ali se iz rezultata jasno uočavaju razlike kako kod CS i HA-CS silera tako i kod Acroseal-a. Više od tri puta jača veza materijala sa dentinom kanala korena dobijena prilikom ispitivanja dentinskih diskova mogla bi se pripisati najpre efikasnijoj hidrataciji silera u delu

istraživanja realizovanom na dentinskim diskovima. Hidratacija kalcijum silikatnih materijala je kompleksan fenomen koji, ukoliko se modifikuje, može uticati na biološka, hemijska kao i fizička svojstva materijala [27], što je potvrđeno i ovim istraživanjem.

Iako se na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju može zaključiti da su testirani ekperimentalni sileri na bazi kalcijum silikata i hidroksiapatita ostvarili određenu vezu sa dentinom kanala korena, pod uslovima u kojima je realizovana ova studija, ta je veza bila značajno slabija u odnosu na konvencionalni siler. Ipak, imajući u vidu bioaktivnu prirodu materijala, način njihovog vezivanja za dentin, dugotrajnu hidrataciju i porast kompresivne snage u funkciji vremena koji je karakterističan za ovu vrstu materijala, moglo bi se očekivati da bi u funkciji vremena veza ispitivanih materijala sa dentinom bila jača.

6.2. DISKUSIJA REZULTATA ISPITIVANJA BIOLOŠKIH SVOJSTAVA MATERIJALA

6.2.1. DISKUSIJA REZULTATA ISPITIVANJA CITOTOKSIČNOSTI

Test za procenu citotoksičnosti odabran je u skladu sa hemijskom prirodom materijala koji su testirani [115]. S obzirom na to da je u ovom istraživanju ispitivana citotoksičnost hidrofилnih materijala koji oslobađaju jonsku komponentu, odabran je MTT test, funkcionalni test za indirektno ispitivanje citotoksičnosti, kojim se procenjuje metabolička aktivnost ćelija. MTT test je jednostavna, brza i precizna kolorimetrijska metoda, jedan od najčešće korišćenih testova za procenu toksičnosti materijala u ćelijskoj kulturi [47, 50, 88, 112, 134, 174]. Test se bazira se na sposobnosti enzima mitohondrijalne dehidrogenaze da u živim, metabolički aktivnim ćelijama konvertuje žutu tetrazolijumsku so, MTT u tamno plave kristale formazana. Kristali formazana se dalje proceduralno rastvaraju, a količina rastvorenih produkata se kvantifikuje spektrofotometrijski. Količina rastvorenih produkata formazana je direktno proporcionalna broju živih ćelija u kulturi [115].

Ispitivanje citotoksičnosti je, prema preporukama ISO standarda (ISO 10993-5), realizovano na permanentnoj ćelijskoj liniji, humanim fibroblastima pluća. Permanentne ćelijske linije se lako gaje, dostupne su i omogućavaju dobru reproduktivnost eksperimenta. Za razliku od primarnih ćelijskih linija nemaju specifične metaboličke aktivnosti zbog čega se citotoksični efekti pripisuju isključivo efektima materijala [152].

Testiranje toksičnosti izlužaka materijala je uobičajen način za *in vitro* procenu toksičnosti degradacionih produkata materijala jer simulira kliničke uslove, obzirom da se isti produkti mogu izlužiti iz materijala u okolno tkivo, nakon njihove *in vivo* aplikacije [134]. Ispitivana je citotoksičnost nerazblaženih i razblaženih izlužaka vezanih materijala u tri vremenska perioda, sa ciljem da se ispita zavisnost toksičnosti materijala od njegove koncentracije, ali i da se ispitaju eventualne izmene u profilu toksičnosti u funkciji vremena izluživanja materijala. S obzirom da oslobađanje jona iz materijala može biti različito pre i posle vezivanja materijala [88], testirana je i citotoksičnost serijski

razblaženih svežih rastvora materijala. Takođe, citotoksičnost materijala je analizirana i u funkciji pH.

Ispitivanje citotoksičnosti rastvora materijala ukazalo je na zavisnost toksičnosti rastvora CS od njegove koncentracije. Razblaživanje rastvora materijala CS je rezultiralo skoro linearnim porastom preživljavanja ćelija u ćelijskoj kulturi. Vrlo slični rezultati uočeni su i posle ispitivanja citotoksičnosti rastvora MTA. Hakki i sar. (2009) su pisali o zavisnosti toksičnih efekata MTA od njegove koncentracije u rastvoru, kao i o visokom preživljavanju ćelija nakon izlaganja rastvorima nižih koncentracija što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju [88]. Za razliku od CS i MTA, razblaživanje rastvora materijala HA-CS nije dovelo do značajnijih promena u preživljavanju ćelija. Naime, u svim testiranim koncentracijama rastvora, broj preživelih ćelija je iznosio više od 50% u odnosu na kontrolu. Različite inicijalne vrednosti pH rastvora testiranih materijala, ukazuju na različitu rastvorljivost odnosno brzinu otpuštanja jona iz materijala, što je moglo rezultirati i različitom inicijalnom toksičnošću [125].

Iz rezultata toksičnosti izlužaka vezanih materijala može se uočiti da su svi testirani materijali redukovali preživljavanje ćelija u određenoj meri, čime je potvrđeno da se joni mogu izlužiti u medijum i posle vezivanja materijala [183]. Rezultati su takođe ukazali na zavisnost toksičnosti od koncentracije testiranih materijala. Generalno, uočena je manja toksičnost materijala CS i HA-CS u odnosu na MTA u svim testiranim periodima. Citotoksičnost izlužaka svih testiranih materijala je bila veća nakon 7 dana odnosu na 24h izluživanja, što je komparabilno sa rastom pH vrednosti u istom periodu. Porast vrednosti pH izlužaka u funkciji vremena ukazuje na kontinuirano oslobađanje jona iz kalcijum silikatnih cemenata u funkciji vremena, što je u skladu sa nalazima iz literature [54, 65]. Duže izluživanje MTA je rezultiralo porastom toksičnosti o čemu su pisali i drugi autori [50, 112, 123, 128]. Takođe, u nedavnoj studiji Yoshino-a i sar. (2013) uočeno je da duži kontakt izlužaka MTA sa ćelijama rezultira i većom toksičnošću [201]. Nalazi dobijeni u ovom istraživanju mogu se delimično uporediti i sa metodološki sličnom studijom Modareszadeh i sar. (2011), koji su toksičnost MTA pratili u dužem vremenskom periodu (21 dan). Ovi autori su pisali o značajnoj redukciji L-929 fibroblasta nakon izlaganja nerazblaženim (100%) kao i razblaženim (50%) izlušcima ProRoot MTA posle 24h i 7 dana izluživanja materijala, što je takođe u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju. U istraživanju pomenutih autora, najveća toksičnost MTA je uočena

nakon 14-dnevnog izluživanja materijala. Nerazblaženi 21-dnevni izlušci ProRoot MTA u njihovom istraživanju nisu imali toksične efekte na ćelije u kulturi, što je suprotno rezultatima dobijenim u ovom istraživanju [134].

Generalno, pregledom literature uočavaju se različiti rezultati citotoksičnosti MTA, počev od toga da MTA nema štetnog uticaja na preživljavanje ćelija u kulturi [135, 144], preko samo inicijalne toksičnosti (nakon 24h izluživanja) [47], pa do toksičnosti koja perzistira i nakon 14-dnevnog izluživanja [134]. Pojedini autori su pisali da posle inicijalne toksičnosti MTA, dalje izluživanje materijala ne redukuje vijabilnost ćelija u ćelijskoj kulturi [47], dok je u drugim istraživanjima uočen porast citotoksičnosti u funkciji vremena [50, 112]. Različiti rezultati pomenutih studija mogli bi biti posledica upotrebe različitih ćelijskih linija, različitih protokola prilikom pripreme i vezivanja materijala, odnosa površine uzorka i zapremine medijuma za izluživanje, trajanja izluživanja kao i primene različitih parametara za ocenu ćelijske vijabilnosti.

Izraženija citotoksičnost MTA u odnosu na CS, mogla bi se objasniti razlikama u sastavu materijala, odnosno izluživanjem različitih jona u medijum. CS je čist, laboratorijski sintetisan, nanostrukturni kalcijum silikatni cement koji sadrži barijum sulfat, kontrast koji se rutinski koristi u svakodnevnoj medicinskoj praksi. Za razliku od barijum sulfata kojim se takođe može postići rendgen kontrasnost propisana u ISO 6876 [32], a koji se u kalcijum silikatnom cementu ponaša kao punioc, bizmut oksid prisutan u MTA-u, se uključuje u hidrataciju materijala, ulazeći u sastav kalcijum silikatnog hidrata [31], odakle se izlužuje zajedno sa kalcijum hidroksidom [28]. Gomes Cornélio i sar. (2011) su ispitujući uticaj različitih rendgen kontrastnih sredstava na toksičnost kalcijum silikatnog cementa (PC), zaključili da kontrasti negativno utiču na biokompatibilnost jače koncentrovanih materijala (100mg/ml) [81]. Veća toksičnost MTA mogla bi se pripisati i činjenici da su u komercijalnim preparatima MTA detektovani teški metali [23], a prema nalazima Schembri i sar. (2010), MTA Angelus, testiran u ovom istraživanju, sadrži arsen u koncentracijama većim od propisanih ISO standardom [167].

Manja citotoksičnost materijala HA-CS u poređenju sa materijalom CS i naročito MTA-om može se pripisati drugačijem hemijskom sastavu materijala, različitoj kinetici otpuštanja jona i nižim vrednostima pH. U studiji na humanim limfocitima, HA-CS je takođe, pokazao manji genotoksični potencijal u poređenju sa materijalom CS [143].

Izlaganje ćelija materijalu HA-CS rezultiralo je visokim preživljavanjem ćelija bez obzira na koncentraciju rastvora, a izmerene vrednosti pH, bile su niže u odnosu na materijale CS i MTA. Huan i Chang (2009) takođe nisu uočili značajnije razlike u pogledu toksičnosti viših u odnosu na niže koncentracije materijala na bazi kalcijum silikata i kalcijum fosfata. Dobijene rezultate objasnili su činjenicom da kod ovih materijala ne dolazi do značajnijih promena u vrednostima pH, usled potrošnje kalcijum hidroksida za formiranje kalcijum deficijentnog hidroksiapatita (CDHA) tokom hidratacije materijala [99].

U ovom delu istraživanja ispitivana je i citotoksičnost silera na bazi kalcijum silikata i hidroksiapatita. Osnovne formulacije materijala su modifikovane dodatkom hemijski inertnih supstanci da bi se korigovala konzistencija materijala odnosno unapredila njihova fluidnost. Obzirom da je preživljavanje ćelija nakon izlaganja svežim rastvorima i izlušcima silera CS i HA-CS bilo slično ili veće u odnosu na preživljavanje ćelija nakon izlaganja osnovnim formulacijama materijala (CS i HA-CS), može se zaključiti da dodati modifikatori nisu štetno uticali na biokompatibilnost materijala. Nešto veća toksičnost u odnosu na osnovnu formulaciju materijala, uočena je samo kod izlužaka silera HA-CS nakon njegovog 21-dnevnog izluživanja. Razlog za to bi mogla biti veća rastvorljivost silera u odnosu na osnovnu formulaciju, koja je mogla rezultirati većom količinom oslobođenih jona te posledično izraženijom redukcijom ćelija u kulturi.

Ispitivanja mogućnosti primene nanostrukturnih materijala na bazi kalcijum silikata i kalcijum fosfata u endodonstkoj terapiji, aktuelna su od nedavno, pa su i podaci o njihovoj toksičnosti u ćelijskoj kulturi malobrojni. Generalno, kada su u pitanju nanomaterijali, njihova toksičnost se povezuje sa veličinom čestica, koja može dovesti do upijanja nanočestica od strane ćelija, odnosno do rastvaranja nanočestica unutar ćelija. Veća koncentracija oslobođenih jona može uticati na preživljavanje ćelija [38]. Istraživanja koja su se bavila ispitivanjem citotoksičnosti nanostrukturnog hidroksiapatita donela su podatke o njegovoj biokompatibilnosti nezavisno od oblika čestica [206], koncentracije materijala [169] i trajanja izluživanja [169]. Prema podacima iz literature, toksičnost komercijalnog nanostrukturnog endodontskog cementa (Bioagregat) na bazi kalcijum silikata sa dodatkom hidroksiapatita, u kulturi ćelija je slična [50], odnosno manja (sistemska) u odnosu na MTA [116]. Biokompatibilnost nanostrukturnih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum silikata i kalcijum fosfata potvrđena je i u

studiji Ma i sar., (2011), ali su autori uočili da kraće vezivanje uz duže izluživanje materijala može rezultirati većom količinom oslobođenih jona sa negativnim uticajem na biokompatibilnost [128].

Na kraju važno je napomenuti da se rezultati citotoksičnosti materijala u ovom istraživanju moraju analizirati unutar ograničenja *in vitro* uslova u kojima je eksperiment realizovan. U sprovedenoj studiji su dosledno primenjene preporuke ISO standarda koje se tiču odnosa površine uzorka i količine medijuma u kome se izlužuje. Pod takvim eksperimentalnim uslovima, izluživanje materijala se događa sa relativno velike površine uzorka, znatno veće nego što bi to bio slučaj u realnim kliničkim uslovima [68]. Takođe, medijum u kome su se materijali izluživali nije menjan tokom trajanja eksperimenta, što je moglo dovesti do akumulacije veće količine jona sa posledično izraženijom redukcijom preživljavanja ćelija. Osim toga, ispitivanje je sprovedeno na gusto zasejanoj, konfluentnoj ćelijskoj liniji, suprotno *in vivo* uslovima gde postoje različiti tipovi ćelija razdvojenih intracelularnim matriksom i gde tkivna drenaža može umanjiti toksične efekte izluženih degradacionih produkata materijala [24]. U studijama koje su analizirale kinetiku oslobađanja kalcijumovih i hidroksilnih jona iz kalcijum silikatnih materijala na standardan način, uočava se redukcija izluživanja ovih jona u funkciji vremena [77]. Takođe je uočeno da duže vezivanje materijala rezultira manjom toksičnošću u ćelijskoj kulturi [128]. Stoga bi drugačiji eksperimentalni protokol, pre svega u smislu izmene medijuma u testiranim vremenskim periodima kao i duže vezivanje materijala pre potapanja u medijum za izluživanje moglo rezultirati većim preživljavanjem ćelija u kulturi kod svih testiranih materijala.

6.2.2. DISKUSIJA REZULTATA ISPITIVANJA BIOKOMPATIBILNOSTI I BIOINDUKTIVNOSTI

Ispitivanja na animalnim modelima predstavljaju obavezan postupak u proceni biokompatibilnosti materijala, pre njihove kliničke primene. *In vivo* testovi, kao što su testovi subkutane [118, 147] odnosno intraosealne implantacije [131, 188] i takozvani testovi primene materijala (engl. usage tests) [12, 171, 173, 189, 192] omogućavaju praćenje kompleksne interakcije materijala i tkiva domaćina. Stoga se u ovim istraživanjima, pored procene biokompatibilnosti, može procenjivati i biofunktionalnost materijala nakon njihove *in vivo* implantacije [47].

Kao animalni modeli u endodontskim istraživanjima korišćene su različite vrste životinja: glodari (pacovi i kunići) [173, 188], lasice [52], svinje [171, 185], psi [155, 179] i majmuni [13]. Iako se zbog sličnosti sa ljudima, majmuni smatraju idealnim modelom za dentalna i medicinska istraživanja, visoka cena eksperimenata, ograničena raspoloživost, kao i teškoće u čuvanju i održavanju, doprinela su da se ove životinje retko koriste u istraživanjima dentalnih materijala [187]. Takođe su korišćeni i zubi pasa iako to takođe nije u skadu sa etičkim i principima dobre istraživačke prakse. Osim toga, u cilju standardizacije animalnog modela i prevazilaženja neujednačenosti prilikom eksperimenata na psima lualicama, kao i zbog eventualno zatečenih bolesti, za eksperimente se preporučuje posebno uzgajana Beagle rasa, što takođe ograničava njihovu raspoloživost. Zbog svega navedenog, aktuelna istraživanja se sprovode na životinjama koje se uzgajaju labaratorijski, u eksperimentalne svrhe, najčešće na glodarima [95, 103, 119, 173, 189].

Činjenica da su zubi kunića, korišćenih u ovom istraživanju, elodonti, odnosno da ih odlikuje konstantna erupcija (2 mm za maksilarne prve sekutiće i 2,4 mm za mandibularne sekutiće, nedeljno) [193], onemogućava praćenje efekata materijala, aplikovanih na nivou krunice zuba u dužem vremenskom intervalu. Stoga su materijali, nakon endodontskog tretmana, aplikovani u kanale korena što je omogućilo da se efekti materijala prate tokom 28 dana. Ovaj eksperimentalni period je odabran pod pretpostavkom da će intezivni fiziološki metabolički procesi karakteristični za denticiju glodara rezultirati odgovarajućim reparatornim procesima tkiva [45].

Aplikacija eksperimentalnih materijala testiranih u ovom istraživanju rezultirala je zapaljenskom reakcijom koja je po svom intezitetu bila slična zapaljenskoj reakciji nastaloj nakon aplikacije kontrolnog materijala (MTA). U najvećem broju uzoraka zapaljenska reakcija je ocenjena kao blaga do umerena uz prisustvo manjeg broja ćelija zapaljenja, lokalizovanih u blizini implantiranih materijala. Ovakav nalaz upućuje na dobru toleranciju aplikovanih materijala od strane tkiva domaćina. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora koji su pisali o biokompatibilnom ponašanju kalcijum silikatnih materijala nakon njihove subkutane [147] i intraosealne implantacije [185, 188] kao i posle primene ovih materijala za direktno prekrivanje pulpe [1, 170, 202], tretman korenskih perforacija [129, 173], odnosno zatvaranje vrha korena nakon apeksne hirurgije [12].

Razvoj inflamatorne reakcije nakon aplikacije kalcijum silikata se pripisuje kalcijum hidroksidu koji se oslobađa tokom hidratacije materijala. Rastvaranjem kalcijum hidroksida oslobađa se velika količina kalcijumovih i hidroksilnih jona sa posledičnom alkalizacijom sredine. Alkalni pH uzrokuje lokalnu nekrozu tkiva sa razvojem lokalne inflamatorne reakcije [189]. Obzirom na to da apozicija čvrstog tkiva nije viđena u studijama koje su koristile inertne materijale, smatra se da koagulaciona nekroza uzrokovana kalcijum hidroksidom inicira procese mineralizacije u tkivu [164]. Vezivanjem materijala količina oslobođenog kalcijum hidroksida se smanjuje [28], što stvara povoljnu sredinu za početak ozdravljenja, odnosno započinjanje reparatornih procesa u tkivu. Poznato je takođe i da kalcijum silikatni cementi indukuju ekspresiju proinflamatornog citokina IL-1, a što se takođe pripisuje inicijalno visokim vrednostima pH materijala [37].

Eksperimentalni materijal CS je po svom sastavu vrlo sličan MTA-u, što je moglo rezultirati sličnom inflamatornom reakcijom u tkivu nakon njihove aplikacije. Iako bez statistički značajne razlike, u grupi uzoraka sa materijalom CS, uočene su najveće varijabilnosti ocena inteziteta inflamatorne reakcije, što je moglo biti posledica i različite individualne osetljivosti eksperimentalnih životinja. Upotreba većeg broja životinja, odnosno većeg broja uzoraka svakako bi rezultirala i relevantnijom statističkom analizom dobijenih rezultata. Iako u pogledu inteziteta inflamacije nije bilo statistički značajnih razlika između testiranih materijala, stanje tkiva u uzorcima sa materijalom HA-CS je najbolje ocenjeno. Ovakav nalaz može biti posledica sastava materijala, obzirom da

najveći deo materijala HA-CS čini hidroksiapatit, zbog čega su vrednosti pH ovog materijala (iako alkalne) niže u odnosu na materijal CS i MTA. U literaturi je dokumentovano da i nešto niže vrednosti pH omogućavaju aktivnost alkalne fosfataze, pri čemu uzrokuju manje zone površne nekroze u poređenju sa visoko alkalnim materijalima kao što su kalcijum silikatni materijali [173].

Poznato je takođe da pored visokog pH, nastanku nekroze u tkivu nakon implantacije MTA i sličnih materijala, mogu doprineti i visoka temperatura tokom vezivanja materijala, odnosno indukcija citokina IL1 i IL 6. S tim u vezi, odsustvo nekroze u uzorcima sa materijalom HA-CS moglo bi biti i posledica niže temperature tokom vezivanja materijala odnosno različite indukcije inflamatornih citokina [147].

U ovom istraživanju je analizirano i prisustvo džinovskih ćelija tipa oko stranog tela (foreign body giant cells, FBGC) u tkivu nakon aplikacije ispitivanih materijala, a koje predstavljaju aktivirane tkivne histiocyte. Džinovske ćelije ukazuju da tkivo na čestice materijala reaguje kao na prisustvo stranog tela [118]. Rasipanje čestica materijala u tkivu dalje od mesta implantacije, uočeno je kod svih testiranih materijala. Uprkos tome, u uzorcima ispunjenim MTA-om i materijalom CS, uočen je samo mali broj džinovskih ćelija. U uzorcima ispunjenim materijalom HA-CS džinovske ćelije nisu detektovane ni u jednom uzorku što ukazuje na smanjenu aktivaciju tkivnih histiocita, u poređenju sa drugim ispitivanim materijalima. Međutim, obzirom na ograničeni broj preseka koji je analiziran u svakom uzorku, za očekivati je da bi se serijskim sečenjem istih, dublje u tkivu pojavile retke, pojedinačne džinovske ćelije.

Novostvoreno kalcifikovano tkivo je uočeno u svim uzorcima testiranih materijala, čime je potvrđeno da materijali pored biokompatibilnosti poseduju i induktivan potencijal. Indukcija mineralizovanog tkiva nakon aplikacije MTA uočena u ovom istraživanju u skladu je sa rezultatima drugih autora koji su uočili stvaranje mineralizovanog tkiva posle aplikacije MTA u različitim kliničkim indikacijama: u svojstvu materijala za direktno prekrivanje pulpe [1, 119, 170, 189, 202], tretman korenskih perforacija [105, 129, 199], zatvaranje vrha korena nakon apeksne hirurgije [12, 155, 186], odnosno nakon primene materijala kao sredstva za apeksifikaciju korena [58, 63].

Svi testirani materijali u ovom istraživanju pripadaju grupi bioaktivnih materijala, koje odlikuje oslobađanje biološki aktivnih jona i stvaranje hidroksiapatita na površini materijala. U sintezi eksperimentalnih materijala ispitivanih u ovom istraživanju korišćena je sol-gel metoda. Prema podacima iz literature, materijali dobijeni sol-gel metodom su bioaktivniji u odnosu na materijale istog sastava koji su dobijeni drugim metodama [126].

Kao što je već napomenuto hidratacijom kalcijum silikatnih materijala oslobađa se kalcijum hidroksid koji disosuje na kalcijumove i hidroksilne jone [28]. Kontinuirano oslobađanje kalcijumovih jona iz materijala smatra se ključnim za indukciju formiranja čvrstog tkiva [77]. Kontinuirano rastvaranje materijala stvara lokalnu mikrosredinu sa visokom koncentracijom kalcijuma. Koncentracija kalcijuma je najveća na mestu aplikacije materijala i postepeno opada sa formiranjem gradijenta. Ovakav gradijent jona kalcijuma može aktivirati stem ćelije, osteoblaste i fibroblaste i usloviti njihovu migraciju. Osim što ima ulogu u ćelijskoj hemotaksi, kalcijum je moćan regulator ćelijske proliferacije, diferencijacije i mineralizacije [164]. Potvrđeno je da materijali koji oslobađaju kalcijum indukuju proliferaciju periodontalnih fibroblasta [21], rast i diferencijaciju ćelija zubne pulpe [177], osteoblasta i ćelija nalik osteoblastima [72], kao i cementoblasta [89]. Takođe je utvrđeno da kalcijum stimuliše sintezu fibronektina [164], ekspresiju dentin sijaloproteina, osteonektina, koštanog sijaloproteina i osteopontina [87, 103, 124, 132, 133, 189, 205]. Pomenuti proteini predstavljaju biohemijske markere mineralizacije, čija ekspresija ukazuje na diferencijaciju indukovanih ćelija u fenotipski različite ćelije.

Procesi mineralizacije tkiva se takođe povezuju i sa oslobađanjem hidroksilnih jona iz materijala i posledično alkalnim pH. Porast vrednosti pH rezultira porastom nivoa alkalne fosfataze (ALP), ekspresijom koštanih proteina (BMP-2) i stvaranjem kalcifikovanih nodusa. Aktivnost ALP obezbeđuje neorganske fosfate te ima značajnu ulogu u formiranju čvrstog tkiva. Porast vrednosti pH u fiziološkim granicama, povećava mineralizacionu sposobnost humanih pulpnih ćelija [164]. Hidroksilni joni takođe, neutrališu medijatore inflamacije, aktivnost osteoklasta i deluju antimikrobno [136, 164].

U sastavu testiranih materijala nalaze se joni Si koji su, osim što imaju ulogu u bioaktivnosti materijala [99], značajni i za procese mineralizacije tkiva. Potvrđeno je da Si joni stimulišu proliferaciju i diferencijaciju ćelija nalik osteoblastima. Visoke

koncentracije jona Si (>30ppm) mogu inhibirati razvoj osteoklasta i procese resorpcije, ali i povećati nivo ALP učestvujući u mineralizaciji novostvorenog kalcifikovanog tkiva [153].

Novostvoreno kalcifikovano tkivo, uočeno u ovom istraživanju, razlikovalo se po debljini i kontinuitetu u zavisnosti od vrste implantiranog materijala. Aplikacija oba eksperimentalna materijala rezultirala je formiranjem kalcifikovanog tkiva u debljem sloju u odnosu na MTA. Takođe, za razliku od MTA i materijala CS, kod materijala HA-CS novoformirano čvrsto tkivo je bilo kontinuirano bez fokusa vaskularizovane fibroblastne proliferacije. Kako veći deo ovog materijala čini hidroksiapatit, do ovakvih rezultata mogli su između ostalog, dovesti fosfatni joni kojih nema u CS-u i MTA-u. Dobijeni rezultati su u skladu sa nalazima Zarrabi i sar. (2010) koji su pisali o efikasnijem stvaranju kalcifikovanog tkiva nakon aplikacije endodontskog cementa na bazi kalcijum silikata koji sadrži fosfatne jone, u odnosu na čist kalcijum silikatni cement (MTA). Deblje i brže formirano kalcifikovano tkivo, autori su pripisali većoj količini fosfatnih jona dostupnih za stvaranje hidroksiapatita [202]. Dobijeni rezultati su takođe u skladu i sa nalazima Zhang i sar. (2013) koji su testirajući dva materijala na bazi kalcijum silikata sa dodatkom hidroksiapatita (Bioagregat i iROOT BP Plus), uočili da ovi materijali indukuju izraženiju mineralizaciju i odontoblastnu diferencijaciju humanih ćelija pulpe u odnosu na čist kalcijum silikatni cement (MTA), sugerišući da ovi materijali imaju veći mineralizacioni potencijal od MTA [205]. U istraživanju pomenutih autora testirani su nanostrukturni materijali, poput materijala testiranih u ovom istraživanju.

Naime, poznato je da topografija površine materijala, a koja je u vezi sa hemijskim sastavom i strukturom materijala, utiče na ponašanje i aktivnost ćelija, pre svega na njihovu adheziju i vijabilnost [3]. U ovom istraživanju testirani su nanostrukturni materijali, pa je moguće (obzirom da je kost sama po sebi nanostrukturna) da je ovakva struktura materijala mogla pozitivno uticati na dobijene rezultate kod oba eksperimentalna materijala [98]. Pored veličine i geometrija kristala može uticati na odgovor tkiva na implantirani materijal [127].

Važno je naglasiti da je materijal HA-CS, korišćen u ovom istraživanju mešavina hidroksiapatita i kalcijum silikata i da kao takav ima unapređena svojstva u odnosu na čiste kalcijum fosfatne cimente. Pored kalcijumovih i fosfatnih jona, materijal HA-CS sadrži i Si jone što je sinergističkim efektom moglo rezultirati efikasnijim formiranjem

kalcifikovanog tkiva. U odnosu na čiste kalcijum fosfatne cimente, kompozitne cimente kojima je dodat kalcijum silikat odlikuju bolje mehaničke osobine ali i izraženija bioaktivnost [99]. Zhao i sar. (2010) su dokazali da dodavanje kalcijum silikata kalcijum fosfatu, rezultira izraženijom diferencijacijom preosteoblasta kao i višim nivoom ALP. Dobijene rezultate su pripisali Si jonima i zaključili da ova kombinacija ima veći osteogeni potencijal u odnosu na čist kalcijum fosfatni cement. Gandolfi i sar. (2010) su dodavanjem 5% alfa-trikalcijum fosfata kalcijum silikatu, konstatovali visoku proliferativnu aktivnost i produkciju kolagena tipa I u kulturi humanih ćelija koštane srži [75].

U ovom istraživanju mikroorganizmi nisu uočeni ni u jednom uzorku. Prisustvo mikroorganizama najčešće se povezuje sa neadekvatnim ispunima i posledičnim koronarnim mikroocurenjem [1, 61, 63]. Adhezivnost glas jonomer cementa, korišćenog za zatvaranje pristupnih kaviteta u ovom istraživanju, mogao je biti jedan od razloga dobijenih rezultata. Takođe, svi materijali testirani u ovom istraživanju imaju alkalni pH i prema pisanju pojedinih autora, ispoljavaju antimikrobne efekte na određene vrste mikroorganizama [2, 156, 183]. Ipak, mora se imati u vidu da je mikroorganizme, naročito kada su prisutni u malom broju, teško detektovati tehnikom histohemijskog bojenja zbog njene male senzitivnosti kao i da su mogli biti uklonjeni tokom pripreme tkiva za histološku analizu [1].

Rezultati dobijeni u ovoj studiji su pokazali da sve testirane materijale odlikuje biokompatibilnost i sposobnost indukcije kalcifikovanog tkiva, s tim da je aplikacija materijala na bazi mešavine hidroksiapatita i kalcijum silikata (HA-CS) rezultirala najboljim biološkim odgovorom tkiva. Dobra biološka svojstva testiranih eksperimentalnih materijala uz značajno kraće vreme vezivanja u odnosu na MTA i slične materijale predstavljaju dobru osnovu za njihova dalja *in vivo* testiranja u odgovarajućim kliničkim indikacijama.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu ispitivanja nanostrukturnih biomaterijala na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS) i mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS) i silera na bazi kalcijumsilikatnih sistema (CS siler) i mešavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS siler) može se zaključiti sledeće:

- Najveća poroznost zabeležena je kod materijala HA-CS. Poroznost materijala CS bila je značajno manja u odnosu na materijal HA-CS i komparabilna sa MTA-om.
- Kod svih testiranih materijala, rastvorljivost je bila veća od vrednosti propisanih ISO standardom. Najveću rastvorljivost pokazao je materijal HA-CS. Rastvorljivost materijala CS bila je značajno manja u odnosu na materijal HA-CS i nešto veća u odnosu na MTA.
- Kod silera CS i HA-CS uočena je izrazita poroznost i rastvorljivost. Poroznost i rastvorljivost oba eksperimentalna silera bila je značajno veća u odnosu na Acroseal.
- Najizraženija mikropropustljivost uočena je kod materijala HA-CS. Mikropropustljivost materijala CS bila je značajno manja u odnosu na materijal HA-CS i komparabilna sa MTA-om.
- Jačina veze materijala CS i HA-CS sa dentinom kanala korena bila je komparabilna sa jačinom veze dentina i MTA.
- U najvećem broju uzoraka svih testiranih materijala uočene su frakture mešovitog i kohezivnog tipa unutar materijala.
- Jačina veze silera CS i HA-CS sa dentinom kanala korena bila je značajno manja u odnosu na vezu kontrolnog silera (Acroseal).
- Kod silera CS i HA-CS uočene su kombinovane i kohezivne frakture unutar materijala, dok su kod Acroseal-a dominirale adhezivne frakture materijala i kohezivne frakture dentina.
- Materijali CS i HA-CS su pokazali komparabilnu citotoksičnost na ćelijskoj kulturi humanih fibroblasta, MRC-5. Citotoksičnost oba materijala (CS i HA-CS), bila je manja u odnosu na MTA.
- Citotoksičnost silera CS i HA-CS je bila komparabilna sa citotoksičnošću osnovnih formulacija materijala.

- *In vivo* aplikacija materijala CS i HA-CS u kanale korena kunića rezultirala je minimalnom zapaljenskom reakcijom, komparabilnom sa MTA-om.
- Aplikacija materijala CS i HA-CS rezultirala je efikasnijim formiranjem kalcifikovanog tkiva u odnosu na MTA.
- Najbolje organizovano novoformirano kalcifikovano tkivo uočeno je nakon implantacije materijala HA-CS.

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije može se zaključiti da je materijal CS po svojim fizičkim svojstvima komparabilan sa komercijalnim kalcijum silikatnim cementom MTA, dok je materijal HA-CS pokazao nešto slabija fizička svojstva. Materijali CS i HA-CS su pokazali superiorna biološka svojstva u odnosu na MTA, što uz značajno kraće vreme vezivanja predstavlja dobru osnovu za njihova dalja testiranja u odgovarajućim kliničkim indikacijama. Modifikacije materijala u cilju sinteze kanalnih silera nisu imale negativnog uticaja na biološka svojstva, ali su rezultirale slabijim fizičkim svojstvima silera, u odnosu na fizička svojstva osnovnih formulacija materijala CS i HA-CS.

8. LITERATURA

1. Accorinte MLR, Holland R, Reis A, Bortoluzzi MC, Murata SS, Dezan E Jr, Souza V, Allessandro LD. Evaluation of Mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *J Endod* 2008;34:1-6.
2. Al-Hezaimi K, Al-Shalan TA, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JHS, Rotstein I. Antibacterial effect of two Mineral trioxide aggregate (MTA) preparations against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus sanguis* *in vitro*. *J Endod* 2006;32:1053-6.
3. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000;21:667-81.
4. Antonijević Đ, Medigović I, Zrlić M, Jokić B, Vuković Z, Todorović LJ. The influence of different radiopacifying agents on the radiopacity, compressive strength, setting time, and porosity of Portland cement. *Clin Oral Invest* 2014;18:1597-1604.
5. Apaydin ES, Shabahang S, Torabinejad M. Hard-tissue healing after application of fresh or set MTA as root-end-filling material. *J Endod* 2003;30:21-4.
6. Asgary S, Shahabi S, Jafarzadeh T, Amini S, Kheirieh S. The properties of a New Endodontic Material. *J Endod* 2008;34:990-993.
7. Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M, Ghoddusi J. Comparison of Mineral trioxide aggregate's composition with Portland cements and a new endodontic cement. *J Endod* 2009;35:243-50.
8. von Arx T, Hänni S, Jensen SS. Clinical results with two different methods of root-end preparation and filling in apical surgery: Mineral trioxide aggregate and adhesive resin composite. *J Endod* 2010;36:1122-9.
9. Atabek D, Sillelioğlu, Ölmez A. Bond strength of adhesive system to Mineral trioxide aggregate with different time intervals. *J Endod* 2012;38:1288-92.
10. Atmeh AR, Chong EZ, Richard G, Festy F, Watson TF. Dentin-cement interfacial interaction: calcium silicates and polyalkenoates. *J Dent Res* 2012;91:454-9.

11. Azadi N, Fallahdoost A, Mehrvarzfar P, Rakhshan H, Rakhshan V. A four-week solubility assessment of AH-26 and four new root canal sealers. *Dent Res J* 2012;9:31-35.
12. Baek SH, Plenk H Jr, Kim S. Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, SuperEBA and MTA as root-end filling materials. *J Endod* 2005;31:444-9.
13. Balla R, LoMonaco CJ, Skribner J, Lin LM. Histological study of furcation perforations treated with tricalcium phosphate, hydroxylapatite, Amalgam, and Life. *J Endod* 1991;17:234-8.
14. Bashutski JD, Wang H-L. Periodontal and endodontic regeneration. *J Endod* 2009;35: 321-8.
15. Benoist FL, Ndiaye FG, Kane AW, Benoist HM, Farge P. Evaluation of Mineral trioxide aggregate (MTA) versus calcium hydroxide cement (Dycal) in the formation of a dentine bridge: a randomized controlled trial. *Int Dent J* 2012;62:33-9.
16. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of ProRoot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod* 2007;33:1231-4.
17. Bernardes RA, de Amorium Campelo A, Pereira LO, Duarte MAH, Moares IG, Bramante CM. Evaluation of the flow rate of 3 endodontic sealers: Sealer 26, AH Plus and MTA Optura. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:e47-e49.
18. Bin CV, Valera MC, Camargo SEA, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, Camargo CHR. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on Mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2012;38:495-500.
19. Bird DC, Komaabayashi T, Guo L, Opperman LA, Spears R. *In vitro* evaluation of dentinal tubule penetration and biomineralization ability of a new root-end filling material. *J Endod* 2012;38:1093-6.

20. Bodanezi A, Carvalho N, Silva D, Bernardineli N, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG. Immediate and delayed solubility of Mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Appl Oral Sci* 2008;16:127-31.
21. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res* 2004;83:408-13.
22. Borges RP, Sousa-Neto MD, Veriani MA, Rached-Júnior FA, De-Deus G, Miranda CES, Pécora JD. Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *Int Endod J* 2012;45:419-428.
23. Bramante CM, Demarchi ACCO, de Moraes IG, Bernadineli N, Garcia RB, Spångberg LSW, Duarte MAH. Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:909-113.
24. Bryan TE, Khechen K, Brackett MG, Messer RLW, El-Awady A, Primus CM, Gutmann JL, Tay FR. *In vitro* osteogenic potential of an experimental calcium silicate-based root canal sealer. *J Endod* 2010;36:1163-9.
25. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Pitt Ford TR. The constitution of Mineral trioxide aggregate. *Dent Mater* 2005;21:297-303.
26. Camilleri J. A review of the methods used to study biocompatibility of Portland cement-derived materials used in dentistry. *Malta Med J* 2006;18:9-14.
27. Camilleri J. Hydratation mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2007; 40:462-70.
28. Camilleri J. Characterization of hydration products of Mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2008;41:408-17
29. Camilleri J. The chemical composition of Mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent* 2008;11:141-3.
30. Camilleri J. The physical properties of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J* 2008;41:151-7.

31. Camilleri J. Hydratation characteristics of calcium silicate cements with alternative radiopacifiers used as root-end filling materials. *J Endod* 2010;36:502-8.
32. Camilleri J, Gandolfi MG. Evaluation of the radiopacity of calcium silicate cements containing different radiopacifiers. *Int Endod J* 2010;43:21-30.
33. Camilleri J, Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Dynamic sealing ability of MTA root canal sealer. *Int Endod J* 2011;44:9-20.
34. Camilleri J. Scanning electron microscopic evaluation of the material interface of adjacent layers of dental materials. *Dent Mater* 2011;27:870-8.
35. Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MAH, Ordinola-Zapata R, Marciano MA, Bramante CM, Bernardineli N. Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2014;47:120-6.
36. Chen C-C, Ho C-C, Chen C-HD, Ding S-J. Physicochemical properties of calcium silicate cements for endodontic treatment. *J Endod* 2009;35:1288-91.
37. Chen CC, Shie MY, Ding SJ. Human dental pulp cell response to new calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J* 2011;44:836-42.
38. Chen L, Mccrate JM, Lee JC-M, Li H. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. *Nanotechnology* 2011;22:1-10.
39. Chen F, Zhu Y, Wu J, Huang P, Cui D. Nanostructured calcium phosphates: Preparation and their application in biomedicine. *Nano Biomed Eng* 2012;4:41-9.
40. Chen Y-Z, Lü X-Y, Liu G-D. A novel root-end filling material based on hydroxyapatite, tetracalcium phosphate and polyacrylic acid. *Int Endod J* 2013;46:556-64.
41. Chiang TY, Ding SJ. Physicochemical properties of radiopaque dicalcium silicate cement as a root-end filling material in an acidic environment. *Int Endod J* 2013;46:234-41.

42. Collares FM, Leitune VCB, Rostirolla FV, Trommer RM, Bergmann CP, Samuel MW. Nanostructured hydroxyapatite as filler for methacrylate-based root canal sealers. *Int Endod J* 2012;45:63-7.
43. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod* 2007;33:295-8.
44. Damas BA, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparasion of Mineral trioxide aggregates and EndoSequence Bioceramic Root Repair Materials. *J Endod* 2011;37:372-5.
45. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim* 2010;44:1-6.
46. Danesh F, Vahid A, Jahanbani J, Mashhadiabbas F, Arman E. Effect of white Mineral trioxide aggregate compared with biomimetic carbonated apatite on dentine bridge formation and inflammatory response in a dental pulp model. *Int Endod J* 2012; 45: 26-34.
47. De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J* 2005;38:604-9.
48. De Deus G, Petruccelli V, Gurgel-Filho E, Coutinho-Filho T. MTA versus Portland cement as repair material for furcal perforations: a laboratory study using a polymicrobial leakage model. *Int Endod J* 2006;39:293-8.
49. De Deus G, Reis C, Brandão C, Fidel S, Fidel RAS. The ability of Portland cement, MTA, and MTA Bio to prevent trough-and-through fluid movement in repaired furcal perforations. *J Endod* 2007;33:1374-7.
50. De Deus G, Canabarro A, Alves G, linhares A, Senne MI, Granjeiro JM. Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. *J Endod* 2009;35:1387-90.
51. De Souza ETG, Tameirão MDN, Roter JM, de Assis JT, de Almeida Neves A, De-Deus GA. Tridimensional quantitative porosity characterization of three set

- calcium silicate- based repair cements for endodontic use. *Microsc Res Tech* 2013;76:1093-8.
52. Dickens SH, Flaim GM, Schumacher GE, Eichmiller FC, Schafer DR, Rutherford RB. Preclinical effectiveness of a novel pulp capping material. *J Endod* 2010;36:1222-5.
53. Ding SJ, Kao CT, Shie MY, Huang CJ, Huang TH. The physical and cytological properties of white MTA mixed with Na_2HPO_4 as an accelerant. *J Endod* 2006;34:748-51.
54. Duarte MAH, de Oliviera Demarchi ACC, Yamashita JC, Kuga MC, de Campos Fraga S. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:345-7.
55. Eid AA, Komabayashi T, Watanabe E, Shiraishi T, Watanabe I. Characterization of the Mineral trioxide aggregate-resin modified glass ionomer cement interface in different settings conditions. *J Endod* 2012;38:1126-9.
56. Eldeniz AU, Erdemir A, Kurtoglu F, Esener T. Evaluation of pH and calcium ion release of Acroseal sealer in comparasion with Apexit and Sealapex sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:e86-e91.
57. EL-Ma'aita A, Qualtrough AJE, Watts DC. The effect of smear layer on the push-out bond strength of root canal calcium silicate cements. *Dent Mater* 2013;29:797-803.
58. Erdem AP, Sepet E. Mineral trioxide aggregate for obturation of maxillary central incisors with necrotic pulp and open apices. *Dent Traumatol* 2008;24:38-41.
59. Ersahan S, Aydin C. Dislocation resistance of iRoot SP, a calcium silicate-based sealer, from radicular dentine. *J Endod* 2010;36:2000-2.
60. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pecora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J* 2000;11:3-9.

61. Faraco Jr IM, Holland R. Histomorphological response of dogs' dental pulp capped with white Mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J* 2004;15:104-8.
62. Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FLCV, Guerreiro-Tanomaru M. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J* 2013;46:755-62.
63. Felipe WT, Felipe MCS, Rocha MJC. The effect of Mineral trioxide aggregate on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. *Int Endod J* 2006;39:2-9
64. Ferris DM, Baumgartner JC. Perforation repair comparing two types of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2004;30:422-4.
65. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. Mineral trioxide aggregate with anti-washout gel: properties and microstructure. *Dent Mater* 2013;29:294-306.
66. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. A quantitative method for determining the antiwashout characteristics of cement-based dental materials including Mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2013;46:179-86.
67. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. Push-out bond strength of MTA with antiwashout gel or resins. *Int Endod J* 2014;47:454-62.
68. Fridland M, Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *J Endod* 2003;29:814-7.
69. Fridland R, Rosado R. MTA solubility: a long term study. *J Endod* 2005;31:376-9.
70. Gaitonde P, Bishop K. Apexification with Mineral trioxide aggregate: an overview of the material and technique. *Eur Jour Prosth Rest Dent* 2007;15:41-5.
71. Gancendo-Caravia L, Garcia-Barbero E. Influence of humidity and setting time on the push-out strength of Mineral trioxide aggregate obturations. *J Endod* 2006;32:894-6.

72. Gandolfi MG, Pagani S, Perut F et al. Innovative silicate-based cements for endodontics: a study of osteoblast-like cell response. *J Biomed Mater Research A* 2008;87:477-86.
73. Gandolfi MG, Ciapetti G, Perut F et al. Biomimetic calcium-silicate cements aged in simulated body solutions. Osteoblast response and analyses of apatite coating. *J Appl Biomater Biomech* 2009;7:160-70.
74. Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *Int Endod J* 2010;43:917-29.
75. Gandolfi MG, Ciapetti G, Taddei P, Perut F, Tinti A, Cardoso MV, Van Meerbeek B, Prati C. Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. *Dent Mater* 2010;26:974-92.
76. Gandolfi MG, Taddei P, Siboni F, Modena E, Ciapetti G, Prati C. Development of the foremost light-curable calcium-silicate MTA cement as root-end in oral surgery. Chemical-physical properties, bioactivity and biological behavior. *Dent Mat* 2011;27:134-157.
77. Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Chemical-physical properties of TheraCal, a novel light-curable MTA-like material for pulp capping. *Int Endod J* 2012;45:571-9.
78. Gandolfi MG, Iacono F, Pirani C, Prati C. The use of calcium-silicate cements to reduce dentin permeability. *Arch Oral Biol* 2012;57:1054-61.
79. Gandolfi MG, Parrilli AP, Fini M, Prati C, Dummer PMH. 3D micro-CT analysis of the interface voids associated with Thermafil root fillings used with AH Plus or a flowable MTA sealer. *Int Endod Jour* 2013;46:253-63.
80. Gandolfi MG, Siboni F, Primus CM, Prati C. Ion release, porosity, solubility and bioactivity of MTA Plus tricalcium silicate. *J Endod* 2014; in press.
81. Gomes Cornélio AL, Salles LP, da Paz MC, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Filho MT. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: A cell death study. *J Endod* 2011;37:203-10.

82. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC, Faria MD, Lodi CS, Oliviera SHP. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod* 2009;35:1577-9.
83. Gomes-Filho JE, Moreira JV, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LTA, Junior ED et al. Sealability of MTA and calcium hydroxide-containing sealers. *J Appl Oral Sci* 2012;20:347-51.
84. Grazziotin-Soares R, Nekoofar MH, Davies TE, Bafail A, Alhaddar E, Hüber R, Busato ALS, Dummer PMH. Effect of bismuth oxide on white Mineral trioxide aggregate: chemical characterization and physical properties. *Int Endod J* 2014;47:520-33.
85. Grga Đ, Dželetović B, Miletić V, Damjanov M. Water uptake and solubility of Acroseal sealer in comparison with Apexit and AH Plus sealers in Hank's solution. *Srp Arh Celok Lek* 2011;139:579-82.
86. Guneser M, Akbulut MB, Eldeniz AU. Effect of various endodontic irrigants on the push-out bond strength of Biodentin and conventional root perforation repair materials. *J Endod* 2013;39:380-4.
87. Güven EP, Taşlı PN, Yalvac ME, Sofiev N, Kayahan MB, Sahin F. *In vitro* comparison of induction capacity and biomineralization ability of Mineral trioxide aggregate and a bioceramic root canal sealer. *Int Endod J* 2013;46:1173-82.
88. Hakki SS, Bozkurt BS, Hakki EE, Belli S. Effect of Mineral trioxide aggregate on cell survival, gene expression associated with mineralized tissues, and biomineralization of cementoblasts. *J Endod*;2009;35:513-9.
89. Hakki SS, Bozkurt BS, Ozcopur B, Gandolfi MG, Prati C, Belli S. The response of cementoblasts to calcium phosphate resin-based and calcium silicate-based commercial sealers. *Int Endod J* 2013;46:242-52.
90. Han L, Okiji T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. *Int Endod J* 2011;44:1081-7.

91. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J* 2013;46:808-14.
92. Hashem AAR, Hassanien EE. ProRoot MTA, MTA-Angelus and IRM used to repair large furcation perforations: sealability study. *J Endod* 2008;34:59-61.
93. Hashem AAR, Amin SAW. The effect of acidity on dislodgment resistance of Mineral trioxide aggregate and Bioaggregate in furcation perforations: an *in vitro* comparative study. *J Endod* 2011;38:245-9.
94. Hawley M, Webb TD, Goodell GG. Effect of varying water-to-powder ratios on the setting expansion of white and grey Mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2010;36:1377-9.
95. Hayashi Y, Imai M, Yanagiguchi K, Vilorio IL, Ikeda T. Hydroxyapatite applied as direct pulp capping medicine substitutes for osteodentin. *J Endod* 1999;25:225-9.
96. Holland R, Filho JAO, de Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Dezan E Jr. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod* 2001;27:281-4.
97. Hong ST, Bae KS, Baek SH, Kum KY, Shon WJ, Lee W. Effects of root canal irrigants on the push-out strength and hydration behavior of accelerated mineral trioxide aggregate in its early setting phase. *J Endod* 2010; 36:1995-9.
98. Hu Q, Tan Z, Liu Y, et al. Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Mater Chem* 2007;17:4690-8.
99. Huan Z, Chang J. Calcium-phosphate-silicate composite bone cement: self-setting properties and *in vitro* bioactivity. *J Mater Sci: Mater Med* 2009;20:833-41.
100. Huang TH, Shie MY, Kao CT, Ding SJ. The effect of setting accelerator on properties of Mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2008;34:590-3.
101. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla. The potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod* 2008;34:645-51.

102. Huffman BP, Mai S, Pinna L et al. Dislocation resistance of ProRoot Endo Sealer, a calcium-based root canal sealer, from radicular dentin. *Int Endod J* 2009;42:34-46.
103. Hwang Y-C, Hwang I-N, Oh W-M, Park J-C, Lee D-S, Son H-H. Influence of TGF- β 1 on the expression of BSP, DSP, TGF- β 1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis. *J Mol Hist* 2008;39:153-160.
104. Iakono F, Gandolfi MG, Huffman B, Sword J, Agee K, Siboni F, Tay F, Prati C, Pashley D. Push-out strength of modified Portland cements and resins. *Am J Dent* 2010;23:43-46.
105. Ibarrola JL, Biggs SG, Beeson TJ. Repair of a large furcation perforation: A four-year follow-up. *J Endod* 2008;34:617-19.
106. International Standards Organization. Dental root canal sealing materials. ISO 6876;2002.
107. International Standards Organization. Biological evaluation of medical devices. ISO 10993;1992.
108. Jafarnia B, Jiang J, He J, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Evaluation of cytotoxicity of MTA employing various additives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:739-44.
109. Jean A, Kerebel B, Kerebel L-M, Legeros RZ, Hamel H. Effect of various calcium phosphate biomaterials on reparative dentin bridge formation. *J Endod* 1988;14:83-7.
110. Jokanović V. Nanomedicina najveći izazov 21. Veka. Data Status, Beograd, 2012.
111. Jokanović V, Čolović B, Jokanović B, Živković S. Superplastic, quick-bonding endodontic mixtures and their hydration. *Int J Appl Ceram Technol* 2014;1-9.

112. Karimjee CK, Koka S, Rallis DM, Gound TG. Cellular toxicity of Mineral trioxide aggregate mixed with an alternative delivery vehicle. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:115-120.
113. Katsamakidis S, Slot DE, Van der Sluis LWM, Van der Weijden F. Histological response of the periodontium to MTA: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2013;40:334-44.
114. Kayahan MB, Nekoofar MH, Kazandag M, et al. Effect of acid-etching procedure on selected physical properties of Mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2009;42:1004-14.
115. Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of Mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 2000;26:288-91.
116. Khalil WA, Eid NF. Biocompatibility of BioAggregate and Mineral trioxide aggregate on the liver and kidney. *Int Endod J* 2013;46:730-7.
117. Khashaba RM, Chutkan NB, Borke JL. Comparative study of biocompatibility of newly developed calcium phosphate-based root canal sealers on fibroblasts derived from primary human gingival and a mouse L929 cell line. *Int Endod J* 2009;42:711-8.
118. Khashaba RM, Moussa MM, Chutkan NB, Borke JL. The response of subcutaneous connective tissue to newly developed calcium phosphate-based root canal sealers. *Int Endod J* 2011;44:342-52.
119. Ko H, Yang W, Park K, Kim M. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate (MTA) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and response of rat pulp to MTA and BMP-2. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:103-8.
120. Koch K, Brave D. Bioceramic technology-the game changer in endodontics. *Endod Prac* 2009:13-8.
121. Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod* 2006;32:569-72.

122. Komabayashi T, Spanberg LS. Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available Mineral trioxide aggregates and Portland cement: a study with flow particle image analyzer. *J Endod* 2008;34:94-8.
123. Koulaouzidou EA, Economides N, Beltes P, Geromichalos G, Papazisis K. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of ProRoot MTA and MTA Angelus. *J Oral Sci* 2008;50:397-402.
124. Lee SK, Lee SK, Lee SI, Park JH, Jang JH, Kim HW, Kim EC. Effect of calcium phosphate cements on growth and odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod* 2010;36:1537-42.
125. Lee B-N, Son H-J, Noh H-J, Koh J-T, Chang H-S, Hwang I-N, Hwang Y-C, Oh W-M. Cytotoxicity of newly developed ortho MTA root-end filling materials. *J Endod* 2012;38:1627-30.
126. Li P, de Groot K. Better bioactive ceramics through sol-gel process. *J Sol-Gel Sci Tech* 1994;2:797-801.
127. Liu WN, Chang J, Zhu YQ, Zhang M. Effect of tricalcium aluminate on the properties of tricalcium silicate-tricalcium aluminate mixtures. Setting time, mechanical strength and biocompatibility. *Int Endod J* 2011;44:41-50
128. Ma J, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of two novel root repair materials. *J Endod* 2011;37:793-8.
129. Main C, Mitzayan N, Shabahang S, Torabinejad M. Repair of root perforations using Mineral trioxide aggregate: a long-term study. *J Endod* 2004;30:80-3.
130. Marković D. Histomorfometrijska istraživanja biokompatibilnosti biokeramičkih materijala na bazi kalcijum fosfata. Doktorska disertacija 2009, Beograd.
131. McNamara RP, Henry MA, Schindler WG, Hargreaves KM. Biocompatibility of Accelerated Mineral trioxide aggregate in a rat model. *J Endod* 2010;36:1851-1855.

132. Min K-S, Kim HI, Park HJ, Pi SH, Hong CU, Kim EC. Human pulp cells response to Portland cement *in vitro*. J Endod 2007;33:163-6.
133. Min KS, Park HY, Lee SK, Park SH, Hong CU, Kim HW, Lee HH, Kim EC. Effect of Mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp. J Endod 2008;34:666-70.
134. Modareszadeh MR, Chogle SA, Mickel AK, Jin G, Kowsar H, Salamat N, Shaikh S, Qutbudin S. Cytotoxicity of set polymer nanocomposite resin root-end filling materials. Int Endod J 2011;44:154-61.
135. Modareszadeh MR, Di Fiore PM, Tipton DA, Salamat N. Cytotoxicity and alkaline phosphatase activity evaluation of EndoSequence Root Repair Material. J Endod 2012;38:1101-1105.
136. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. Int Endod J 2011;44:697-730.
137. Montellano AM, Schwartz SA, Beeson TJ. Contamination of the tooth-colored Mineral trioxide aggregate used as a root-end filling material: a bacterial leakage study. J Endod 2006;32:452-5.
138. Nandini S, Ballal S, Kandaswamy D. Influence of glass-ionomer cement on the interface and setting reaction of mineral trioxide aggregate when used as a furcal repair material using laser raman spectroscopic analysis. J Endod 2007;33:167-72.
139. Nekoofar MH, Adusei G, Sheykhrezae MS, Hayes SJ, Bryant ST, Dummer PM. The effect of condensation pressure on selected physical properties of Mineral trioxide aggregate. Int Endod J 2007;40:453-61.
140. Noetzel J, Özer K, Reissbauer B-H, Anil A, Rössler R, Neuman K, Kielbassa AM. Tissue responses to an experimental calcium phosphate cement and Mineral trioxide aggregate as materials for furcation perforation repair: a histological study in dogs. Clin Oral Inest 2006;10:77-83.

141. Okiji T, Yoshiba K. Reparative dentinogenesis induced by Mineral Trioxide Aggregate: A review from the biological and physicochemical points of view. *Int J Dent* 2009; ID464280,12 pages.
142. Oliveira ACM, Tanomaru JMG, Faria-Junior N, Tanomaru-Filho M. Bacterial leakage in root canals filled with conventional and MTA-based sealers. *Int Endod J* 2011;44:370-5.
143. Opačić-Galić V, Petrović V, Živković S, Jokanović V, Nikolić B, Knežević-Vučković J, Mitić-Ćulafić D. New nanostructural biomaterials based on active silicate systems and hydroxyapatite: characterization and genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *Int Endod J* 2013;46:506-16.
144. Parirokh M, Agary S, Eghban MJ et al. A comparative of white and gray Mineral trioxide aggregate as pulp capping agents in dog's teeth. *Dent Traumatol* 2005; 21:150-4.
145. Parirokh M, Askarifad S, Mansouri S, Haghdost AA, Raof M, Torabinejad M. Effect of phosphate buffer saline on coronal leakage of Mineral trioxide aggregate. *J Oral Sci* 2009;51:187-91.
146. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide Aggregate: A comprehensive literature review-Part I: Chemical, physical and antibacterial properties. *J Endod* 2010;36:16-27.
147. Parirokh M, Mirsoltani B, Raof M, Tabrizchi H, Haghdost AA. Comparative study of subcutaneous tissue responses to a novel root-end filling material and white and grey Mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2011;44:283-9.
148. Pérez AL, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Osteoblast and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot MTA and White MTA. *Int Endod J* 2003;36:564-70.
149. Peters CI, Peters OA. Occlusal loading of EBA and MTA root-end fillings in a computer-controlled masticator: a scanning electron microscopic study. *Int Endod J* 2002;35:22-9.

150. Peters MC, Bresciani E, Barata THE, Fagundes TC, Navarro RL, Dickens SH. *In vivo* dentin remineralization by calcium-phosphate cement. *J Dent Res* 2010;89:286-91.
151. Peters OA. Research that matters-biocompatibility and cytotoxicity screening. *Int Endo J* 2013;46:195-7.
152. Petrović M. Biološka aktivnost kompozitnih ćelijskih nosača na bazi visoko poroznih hidroksiapatita i njihov uticaj na tkivno inženjerstvo kosti. Doktorska disertacija 2012, Beograd.
153. Pietak AM, Reid JW, Stott MJ, Sayer M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* 2007;28:4023-32.
154. Poggio C, Lombardini M, Alessandro C, Simonetta R. Solubility of root-end-filling materials: a comparative study. *J Endod* 2007;33:1094-7.
155. Regan JD, Gutmann JL, Witherspoon DE. Comparasion of Diaket and MTA when used as root-end filling materials to support regeneration of the periradicular tissues. *Int Endod J* 2002;35:840-7.
156. Ribeiro CS, Scelza MF, Hirata R Jr, de Oliviera LMB. The antimicrobial activity of gray-colored Mineral trioxide aggregate (GMTA) and white-colored MTA (WMTA) under aerobic and anaerobic conditions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* 2010;109:109-112.
157. Rosa RA, Bier CAS, Só MVR, Tanomaru JMG, Tanomatu-Filho M. Push-out bond strength of Calcium hydroxide and Mineral trioxide aggregate based sealers to root canal dentin. *Rev Odonto Cienc* 2012;27:320-4.
158. Saghiri MA, Asgar K, Lotfi M, Garcia-Godoy F. Nanomodification of Mineral trioxide aggregate for enhanced physicochemical properties. *Int Endod J* 2012;45:979-88.
159. Saghiri MA, Godoy FG, Gutmann JL, Lotfi M, Asatourian A, Ahmadi H. Push-out bond strength of a nano-modified Mineral trioxide aggregate. *Dent Traumatol* 2013;29: 323-7.

160. Saghiri MA, Godoy FG, Gutmann JL, Lotfi M, Asatourian A, Sheibani N, Elyasi M. The effect of pH on solubility of nano-modified endodontic cements. *J Conserv Dent* 2014;17:13-7.
161. Sagsen B, Ustün Y, Demirbuga S, Pala K. Push-out strength of two new calcium silicate-based endodontic sealers to root canal dentin. *Int Endod J* 2011;44:1088-91.
162. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg LSW. Cell and tissue reactions to Mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* 2003;95:483-9.
163. Sanghavi T, Shah N, Shah RR. Comparative analysis of sealing ability of Biodentin and calcium phosphate cement against Mineral trioxide aggregate (MTA) as a furcal perforation repair material (An *in vitro* study). *NJIRM* 2013;4:56-60.
164. Sangwan P, Sangwan A, Duha J, Rohilla A. Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: A review of proposed mechanisms. *Int Endod J* 2013;46:3-19.
165. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of Mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005;31:97-100.
166. Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J* 2012;45:12-8.
167. Schembri M, Peplow G, Camilleri J. Analyses of heavy metals in Mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod* 2010;36:1210-5.
168. Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, Samiei M, Janani M, Bahari M, Abdolrahimi M, Pakdel F, Aghbali A. Effect of various mixing techniques on push-out bond strength of white Mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2012;38:501-4.

169. Shahoon H, Hamed R, Yadegari Z, Hosseiny VAM, Golgounnia P, Amiri S. The comparison of silver and hydroxyapatite nanoparticles biocompatibility on L929 fibroblasts cells: An *in vitro* study. *J Nanomed Nanotechnol* 2013;4:1-4.
170. Shahravan A , Jalali SP, Torabi M, Haghdoost AA, Gorjestani H. A histological study of pulp reaction to various water/powder ratios of white mineral trioxide aggregate as pulp-capping material in human teeth: a double-blinded, randomized controlled trial. *Int Endod J* 2011;44:1029-33.
171. Shayegan A, Petein M, Abbeele AV. The use of beta-tricalcium phosphate, white MTA, white Portland cement and calcium hydroxide for direct pulp capping of primary pig teeth. *Dent Traumatol* 2009;25:413-9.
172. Shokouhinejad N, Gorrrjestani H, Nasseh AA, Hoseini A, Mohammadi M, Shamshiri AR. Push-out bond strength of gutta-percha with a new bond bio ceramic sealer in the presence or absence of smear layer. *Aust Endod J* 2013;39:102-6.
173. da Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. *Int Endod J* 2011;44:100-10.
174. Silva EJNL, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BPF, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod* 2013;39:274-7.
175. Sinai IH, Romea DJ, Glassman G, Morse DR, Fantasia J, Furst ML. An evaluation of tricalcium phosphate as a treatment for endodontic perforations. *J Endod* 1989;15:399-403.
176. Storm B, Eichmiller FC, Tordik PA, Goodell GG. Setting expansion of gray and white Mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod* 2008;34:80-2.
177. Takita T, Hayashi M, Takeichi O et al. Effect of Mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J* 2006;39:415-22.

178. Tanomaru Filho M, Figueiredo FA, Tanomaru JMG. Effect of different dye solutions on the evaluation of the sealing ability of Mineral trioxide aggregate. *Braz Oral Res* 2005; 19: 119-22.
179. Tawil PZ, Trope M, Curran AE, Caplan DJ, Kirakozova A, Duggan DJ, Teixeira FB. Periapical Microsurgery: An *In vivo* evaluation of endodontic root-end filling materials. *J Endod* 2009;35:357-362.
180. Tobón-Arroyave SI, Restrepo-Pérez MM, Arismendi-Echavarría, Velásquez-Restrepo Z, marin-Botero ML, Garcia-Dorado EC. Ex vivo microscopic assessment of factors affecting the quality of apical seal created by root-end fillings. *Int Endod J* 2007;40:590-602.
181. Torabinejad M, White DJ. Tooth filling material and use. US Patent Number 5.769.638.
182. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995;21:349-53.
183. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod* 1995;21:489-92.
184. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root and filling materials. *J Endod* 1995;21:403-6.
185. Torabinejad M, Pitt Ford TR, Abedi HR, Kariyawasam SP, Tang HM. Tissue reaction to implanted root-end filling materials in the tibia and mandible of guinea pigs. *J Endod* 1998;24:468-71.
186. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral Trioxide Aggregate: A comprehensive literature review-Part II: Leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* 2010;36:190-202.
187. Torabinejad M, Corr R, Buhrey M, Wright K, Shabahang S. An animal model to study regenerative endodontics. *J Endod* 2011;37:197-202.

188. Torreira MG, Santos AA, Cobos MAR, Boquete IF, Abelleira AC. The osteoinductive potential of MTA (Mineral trioxide aggregate): a histologic study in rabbits. *Eur J Anat* 2004;8:101-5.
189. Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, Opsahl Vital S, Chaussain C, Boukpepsi T. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res* 2012;91:1166-71.
190. Tsatsas DV, Meliou HA, Kerezoudis NP. Sealing effectiveness of materials used in furcation perforation *in vitro*. *Int Dent J* 2005;55:133-41.
191. Tsesis I, Fuss Z. Diagnosis and treatment of accidental root perforations. *Endod Topics* 2006;13:95-107.
192. Tziafas D, Pantelidou O, Avanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S. The dentinogenic effect of Mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *Int Endod J* 2002;35:245-54.
193. Verstraete FJM, Osofsky A. Dentistry in pet rabbits. 2005 compendium.
194. Vitti RP, Prati C, Sinhoreti MAC, Zanchi CH, Souza e Silva MG, Ogliari FA, Piva E, Gandolfi MG. Chemical-physical properties of experimental root canal sealers based on butyl ethylene glycol disalicylate and MTA. *Dent Mat* 2013;29:1287-1294.
195. Wang XP, Ye JD, Wang YL, Chen L. Self-setting properties of a β -dicalcium silicate reinforced calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res B Appl: Biomater* 2007;82:93.
196. Weller RN, Tay KC, Garret LV, et al. Microscopic appearance and apical seal of root canals filled with gutta-percha and ProRoot Endo Sealer after immersion in a phosphate-containing fluid. *Int Endod Jour* 2008;41:977-86.
197. Witherspoon DE. Vital pulp therapy with new materials: New directions and treatment perspectives-permanent teeth. *J Endod* 2008;34:S25-S28.
198. Wu MK, Kontakiotis EG, Wesselink PR. Decoloration of 1% methylene blue solution in contact with dental filling materials. *J Dent* 1998;26:585-9.

199. Yildirim G, Dalci K. Treatment of lateral root perforation with mineral trioxide aggregate: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* 2006; 102:e55-e58.
200. Yildirim T, Orucoglu H, Cobankara FK. Long-term evaluation of the smear layer on the apical sealing ability of MTA. *J Endod* 2008;34:1537-40.
201. Yoshino P, Nishiyama CK, da Silva Modena KC, Santos CF, Sipert CR. *In vitro* cytotoxicity of White MTA, MTA Fillapex and Portland Cement on human periodontal ligament fibroblast. *Braz Dent J* 2013;24:111-6.
202. Zarrabi MH, Javidi M, Jafarian AH, Joushan B. Histologic assessment of human pulp response to capping with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. *J Endod* 2010;36:1778-81.
203. Zeferino EG, Bueno CES, Oyama LM, Ribeiro DA. Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. *Int Endod J* 2010;43:843-8.
204. Zhang W, Li Z, Peng B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. *Int Endod J* 2010;43:769-74.
205. Zhang S, Yang X, Fan M. BioAggregate and iRoot BP Plus optimize the proliferation and mineralization ability of human dental pulp cells. *Int Endod J* 2013;46:923-9.
206. Zhao Y, Zhang Y, Ning F, Guo D, Xu Z. Synthesis and cellular biocompatibility of two kinds of HAP with different nanocrystal morphology. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2007;83:121-6.
207. Zhao Q, Qian J, Zhou H, Yuan Y, Mao Y, Liu C. *In vitro* osteoblast-like and endothelial cells' response to calcium silicate/calcium phosphate cement. *Biomed Mater* 2010;5:1-8.

BIOGRAFIJA

Dr Violeta Petrović je rođena 30.04.1972. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Stomatološki fakultet u Beogradu upisala je 1991. godine, a diplomirala 1997. godine sa prosečnom ocenom 8.88. Nagrađena je kao najbolji student šeste godine studija. Tokom studija učestvovala je na domaćim studentskim kongresima. Posle obavljenog pripravničkog staža, 1999. godine položila je stručni ispit za doktora stomatologije.

Od 01.07.1999. godine zaposlena je na Klinici za bolesti zuba, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Specijalistički ispit iz oblasti Bolesti zuba i endodoncije položila je 2004. godine sa ocenom odličan. Magistarsku tezu pod nazivom „Fizičko-hemijske i antimikrobne karakteristike sredstava za irigaciju kanala korena zuba“ odbranila je 2005. godine.

Od 2005. godine je u zvanju asistenta, aktivno uključena u procese nastave, kao i zdravstvene i naučne aktivnosti Klinike za bolesti zuba. Dr Violeta Petrović aktivno učestvuje u naučno-istraživačkom radu iz oblasti endodontske terapije, odnosno u istraživanjima biokompatibilnosti, kao i hemijskih i fizičkih svojstava dentalnih materijala.

Dr Violeta Petrović je član SLD, Sekcije za endodonciju SLD, Sekcije za bolesti usta i zuba SLD, Udruženja endodontista Srbije i Evropskog udruženja endodontologa (ESE).

Dr Violeta Petrović je na domaćim i međunarodnim kongresima stomatologa do sada prezentovala dvanaest naučnih radova i održala 2 predavanja po pozivu. Autor je tri rada objavljena u časopisima sa SCI liste, od koga su dva iz oblasti vezane za temu doktorske disertacije. Publikovala je sedam naučnih radova u časopisu od nacionalnog značaja i jedan u međunarodnom časopisu. Prisustvovala je na više akreditovanih seminara i kongresa u okviru Kontinuirane edukacije stomatologa.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а dr Violeta Petrović

број индекса 199

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„ISPITIVANJE BIOLOŠKIH I FIZIČKIH SVOJSTAVA NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI AKTIVNIH KALCIJUMSILIKATNIH SISTEMA I HIDROKSIAPATITA “

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

Потпис докторанда

У Београду, 30.09.2014

V. Petrović

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора dr Violeta Petrović

Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада „ISPITIVANJE BIOLOŠKIH I FIZIČKIH SVOJSTAVA
NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI AKTIVNIH KALCIJUMSILIKATNIH
SISTEMA I HIDROKSIAPATITA“

Ментор Prof. dr Slavoljub Živković

Потписани/а dr Violeta Petrović

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 30.09.2014

V. Petrović

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„ISPITIVANJE BIOLOŠKIH I FIZIČKIH SVOJSTAVA NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI AKTIVNIH KALCIJUMSILIKATNIH SISITEMA I HIDROKSIAPATITA“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 30.09.2014

V. Petrović