

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ**

Бојана Љ. Тетеновић

**ИСПИТИВАЊЕ БИОКОМПАТИБИЛНОСТИ НАНОМАТЕРИЈАЛА НА БАЗИ
КАЛЦИЈУМ СИЛИКАТА И ЊЕГОВОГ УТИЦАЈА НА
ПУЛПО-ПАРОДОНТАЛНО ТКИВО**

докторска дисертација

Београд, 2016.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE**

Bojana Lj. Cetenovic

**BIOCOMPATIBILITY INVESTIGATION OF NANOSYNTHESIZED MATERIALS
BASED ON CALCIUM SILICATES AND ITS IMPACT ON PULPO-PERIODONTAL
TISSUE**

doctoral dissertation

Belgrade, 2016.

Ментор:

Проф. др Дејан Марковић

Универзитет у Београду, Стоматолошки факултет
Клиника за Дечју и превентивну стоматологију

Чланови комисије:

Проф. др Момир Царевић

Универзитет у Београду, Стоматолошки факултет
Клиника за Дечју и превентивну стоматологију

Проф. др Славољуб Живковић

Универзитет у Београду, Стоматолошки факултет
Клиника за Болести зуба

Научни сарадник др сц. Снежана Пашалић

Универзитет у Београду
Институт за нуклеарне науке- Винча

Научни саветник др сц. Вукоман Јокановић

Универзитет у Београду
Институт за нуклеарне науке- Винча

Датум одбране: _____

Желела бих да се захвалим:

Свом ментору проф. др Дејану Марковићу на указаном поверењу од самог почетка наше сарадње, ентузијазму, пријатељским и стручним саветима. Неизмерно хвала на свему што сте учинили за мене и што даље чините!

Изузетном човеку и још већем научнику др Вукоману Јокановићу који је проширио моје хоризонте и омогућио ми да се бавим једном од најактуелнијих и најперспективнијих тема у оквиру стоматолошких материјала.

Др Снежани Пашалић са Института за нуклеарне науке на несебичној помоћи и корисним сугестијама.

Доценту Саше Василијићу са Војномедицинске академије на стицању знања о култури ћелија, свесрдној помоћи у лабораторијској изради дисертације, свеукупном доприносу и труду.

Доценткињи Биљани Дојчиновић са Института за хемију, технологију и металургију на несебичном ангажовању и драгоценим идејама.

Проф. др Звездани Тепавчевић на помоћи око интерпретације резултата биолошких својстава метеријала.

Др Богомиру Прокићу са Факултета ветеринарске медицине на помоћи око реализације експерименталног дела доктората на анималним моделима.

Својим драгим колегама, посебно др Дијани Тришић, др Бошку Тољићу и др Јелени Чаркић, на помоћи и времену проведеном у лабораторијском раду, што су били ту када је требало само слушати.

Брату Урошу на безрезервној подршци, што ме је враћао из мог света маште у реалност када је то било неопходно.

***Својим родитељима, Зорици и Љубинку, на љубави и свему што су ми омогућили у
име љубави.***

Надам се да сте поносни на мене колико и ја на Вас!

Сажетак

Увод: Биокомпатибилност се тумачи као способност материјала да делује уз адекватан одговор домаћина у одређеној ситуацији. Одговор домаћина на страни тело зависиће од његове хемијске реактивности, површинске структуре и топографије. Доказано је да наноструктурирана површина ближе подражава хијерархијску организацију коштаног ткива у односу на микроструктурирану, повећањем концентрације активних биомолекула који утичу на ћелијску миграцију, адхезију, диференцијацију и пролиферацију. Током деведесетих година, минерални триоксидни агрегат (МТА) представљен је као материјал избора за ретроградне кавитете због нижег апикалног микропропуштања, везивања у присуству влаге и високе рН вредности. Упркос повољним особинама, МТА показује суву конзистенцију, ниску вискозност и дуго времена везивања, што ограничава његову клиничку употребу. **Циљ** ове студије био је да се синтетишу наноматеријали на бази веома активних калцијум-силиката унапређених физичко-хемијских својстава и испитају њихова биокомпатибилност и биоактивност у односу на МТА⁺ (Cerkamed, Stalowa Wola- Пољска).

Материјали и Метод: Поступак сол-гел методе у комбинацији са методом високо-температурне ланчане реакције сагоревања примењен је у току синтезе испитиваних материјала. Анализа фаза пре и после хидратација изведена је помоћу XRD и FTIR, док је морфологија узорака проучавана SEM и EDS. рН мерења су обављена коришћењем рН-метра, док је количина ослобођених јона одређивана коришћењем ICP-OES. Биокомпатибилност свежих материјала и њихових екстраката (24h, 7 и 21 дан) је испитана применом индиректног теста (МТТ), директног теста (LDH), теста пролиферације (³H-тимидин) и директним методом (Неутрално црвена). Интеракција директно примењених испитиваних материјала са пулпним ткивом анализирана је на моделу културе хуманих зуба (15 и 30 дана). Осамнаест заморца служило је за интрамишићну имплементацију стерилних полиетиленских цевчица испуњених испитиваним материјалима (15, 30 и 60 дана). За интракоштани имплантациони тест употребљено је дванаест новозеландских белих зечева подељених у две групе (30 и 90 дана). По четири дефекта на калварији су формирана трепан борерима и испуњена свеже

замешаним испитиваним материјалима. Степен запаљенске реакције и коштане регенерације оцењиван је према претходно утврђеним критеријумима. Статистичка анализа података обављена је употребом *ANOVA Repeated Measures* и *Kruskal-Vallis* теста (IBM SPSS 20, New York, САД).

Резултати: Испитиваних материјала састојали су се од агломерата изграђених од наночестица, величине између 90 и 500 nm, сферичног или штапићастог облика са хомогеном дистрибуцијом фаза. рН вредности свежих раствора материјала ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂ и GREY-MPCA показале су тенденцију раста, за разлику од МТА⁺; док су рН вредности екстраката биле ниже, али алкалне. Концентрација ослобођених јона калцијума и алуминијума се смањивала, док се концентрација бизмута (ALBO-MPCA₁, МТА⁺), баријума (ALBO-MPCA₂) и магнезијума (у случају свих материјала), повећавала током периода од 21 дана. Само је тестирани материјал GREY-MPCA показао дозно-зависну цитотоксичност. Метаболичка активност ћелија повећавала се са временом екстракције, осим у случају неразблажених екстраката ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂ и GREY-MPCA (21 дан). Процент цитотоксичности се смањивао са временом екстракције, осим у случају разблажених узорака ALBO-MPCA₂ и GREY-MPCA (21 дана). Пораст у степену пролиферације ћелијска уочен је у случају неразблажених екстраката материјала ALBO-MPCA₁ и ALBO-MPCA₂ (7 дана). У директном контакту са ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂ и МТА⁺, SCAP ћелије су показале фибробластима сличну морфологију. Тестирани материјали су показали минималну запаљенску реакцију која се са временом смиривала. Након 90 дана, статистички значајна разлика у формирању коштаног ткива примећена је у поређењу МТА⁺ и ALBO-MPCA₁ са контролном групом.

Закључци: Резултати карактеризације показују да су синтетисани материјали адекватно дизајнирани и да имају одговарајућу морфологију површине која је од значаја за њихову биоактивност. Биокомпатибилност испитиваних материјала мерена тестовима цитотоксичности показала је добре резултате и компарабилне вредности са контролним материјалом. Материјал ALBO-MPCA₁ изазива слабији запаљенски одговор ткива и индукује бољу коштану регенерацију у односу на контролни материјал МТА⁺, стога је изузетно добар кандидат за даља клиничка истраживања.

Кључне речи: биокомпатибилност, калцијум силикат, МТТ, LDH, неутрално црвена, интамишићна имплементација, интракоштана имплементација, МТА, биоматеријали

Научна област: Стоматологија

Ужа научна област: Дечја стоматологија

УДК: 615.46:616.314.1(043.3)

Abstract

Introduction: Biocompatibility is interpreted as the material's ability to act within the adequate host response in a specific situation. The host's response to foreign body will depend on its chemical reactivity, surface structure and topography. It has been shown that nanostructured surface more closely mimic the hierarchical organization of the bone tissue in comparison to microstructured, by increasing the concentration of active biomolecules that may affect cell migration, adhesion, differentiation and proliferation. During the nineties, mineral trioxide aggregate (MTA) was presented as a material of choice for retrograde fillings because of its lower apical microleakage, setting in the presence of moisture and high pH. Despite some favorable properties, MTA exhibits dry consistency, low flowability and long setting time which limit its clinical use. **The aim** of this study was to synthesize nanostructured materials based on highly active calcium silicates with enhanced properties and analyze their biocompatibility and bioactivity in comparison to MTA⁺ (Cerkamed, Stalowa Wola-Poland).

Materials and Methods: The sol-gel method in a combination with high-temperature self-propagating reaction was applied for the synthesis of investigated materials. Phase analysis of investigated materials before and after hydration was performed by XRD and FTIR, while the morphology of the samples was studied by SEM and EDS. The pH measurements were performed using pH-meter, while the amount of released ions was determined using ICP-OES. Biocompatibility of fresh investigated materials and their elutes (24h, 7 and 21 day) was conducted using indirect (MTT), direct test (LDH), proliferation test (³H-thymidine) and direct method (Neutral red). The interaction of directly applied investigated materials with dental pulp tissue was analyzed in an entire human tooth culture model (15 and 30 days). Eighteen guinea pigs received intramuscular sterile polyethylene tubes filled with investigated materials (15, 30 and 60 days). For intraosseous implementation twelve New Zealand white rabbits, divided into two groups (30 and 90 days) were used. Four calvary defects per animal were created with trepan burs and filled with freshly prepared investigated materials. The occurrence of inflammatory responses and hard tissue formation was categorized according to the previously established scores. The statistical analysis was

performed using two-way ANOVA Repeated Measures test and Kruskal-Wallis test (IBM SPSS 20, New York, USA).

Result: Samples of investigated materials consisted of agglomerates built up from nanoparticles, mostly ranged between 90 and 500 nm, preferentially spherical and rod-like with the homogenous distribution of the phases. The pH values of fresh materials ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂ and GREY-MPCA showed increasing tendency, contrary to MTA⁺, while the pH values of materials' elutes were lower, but still alkaline. The amount of calcium and aluminum ion release decreased, while the amount of bismuth (ALBO-MPCA₁, MTA⁺), barium (ALBO-MPCA₂) and magnesium, (respecting all investigated materials) increased over the period of 21 days. Only investigated material GREY-MPCA exhibited dose-dependent cytotoxicity. The metabolic activity of cells increased following the extraction time, except in case of undiluted elutes of ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂ and GREY-MPCA (21-day). According to LDH test, cytotoxicity percent decreased with extraction time, except in case of diluted samples of ALBO-MPCA₂ and GREY-MPCA (21-day). An increase of cell proliferation was observed in the case of undiluted extracts of ALBO-MPCA₁ and ALBO-MPCA₂ (7-days). In direct contact with ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂ and MTA⁺, SCAP cells showed fibroblast like morphology. All tested materials exhibited mild to moderate inflammation which subsided with time. Following 90-day, statistically significant difference in hard tissue formation was observed in comparison of MTA⁺ and ALBO-MPCA₁ with control group.

Conclusions: The results of characterization show that the synthesized materials are adequately designed and that they possess surface morphology of great importance for their bioactivity. Biocompatibility testing of investigated materials exhibited good results and comparable with the control material. ALBO-MPCA₁ provokes less inflammatory response and enhances better bone regeneration than control material MTA⁺, thus it is a especially good candidate for further clinical investigations.

Key words: biocompatibility, calcium silicates, MTT, LDH, neutral red, intramuscular implementation, intraosseous implementation, MTA, biomaterials

Scientific field: Dental Medicine

Narrower scientific field: Paediatric Dentistry

UDC: 615.46:616.314.1(043.3)

САДРЖАЈ

1. Увод	1
1.1. Појам биокомпатибилности	1
1.2. Лекови и средстава	2
1.3. <i>In vitro</i> тестови	3
1.4. <i>In vivo</i> тестови	4
1.5. Клинички тестови	6
1.6. Стандардизација тестова биокомпатибилности	7
1.7. Хемијске карактеристике материјала на бази калцијум-силиката	8
1.8. Хемијске и технолошке модификације материјала на бази калцијум-силиката	12
1.9. Процес хидратације материјала на бази калцијум-силиката	13
1.10. рН и кинетика ослобађања јона из материјала на бази калцијум-силиката	19
1.11. Биокомпатибилност материјала на бази калцијум-силиката	20
1.12. Биоактивност материјала на бази калцијум-силиката	26
2. Циљеви истраживања	30
3. Материјали и методе	31
3.1. Синтеза и карактеризација испитиваних материјала	31
3.1.1. <i>Синтеза испитиваних материјала</i>	31
3.1.2. <i>Карактеризација испитиваних материјала</i>	33
3.2. Анализа рН вредности испитиваних материјала	35
3.3. Анализа кинетике отпуштања јона из испитиваних материјала	35
3.4. Испитивање цитотоксичности наноматеријала на бази калцијум-силиката у <i>in vitro</i> условима применом индиректног теста	36
3.4.1. <i>Испитивани материјали</i>	36
3.4.2. <i>Припрема свежег раствора материјала</i>	36
3.4.3. <i>Припрема екстракта везаних материјала</i>	37
3.4.4. <i>Ђелијска култура</i>	37
3.4.5. <i>Тест цитотоксичности</i>	38
3.5. Испитивање цитотоксичности наноматеријала на бази калцијум-силиката у <i>in vitro</i> условима применом директног теста	39
3.5.1. <i>Ђелијска култура</i>	39
3.5.2. <i>Тест цитотоксичности</i>	39
3.6. Испитивање цитотоксичности наноматеријала на бази калцијум-силиката у <i>in vitro</i> условима применом теста пролиферације	41
3.6.1. <i>Ђелијска култура</i>	41
3.6.2. <i>Тест цитотоксичности</i>	41

3.7. Испитивање цитотоксичности наноматеријала на бази калцијум-силиката у <i>in vitro</i> условима применом директне методе	42
3.7.1. <i>Фелијска култура</i>	42
3.7.2. <i>Припрема узорака свежих материјала</i>	43
3.7.3. <i>Тест цитотоксичности</i>	43
3.8. Испитивање биокомпатибилности наноматеријала на бази калцијум-силиката на анималном моделу- интрамишићна имплементација.....	44
3.8.1. <i>Субјекти</i>	44
3.8.2. <i>Испитивани материјали</i>	44
3.8.3. <i>Анестезија</i>	45
3.8.4. <i>Рандомизација</i>	45
3.8.5. <i>Хируршка процедура</i>	45
3.8.6. <i>Припрема ткива и хистолошко оцењивање</i>	47
3.9. Испитивање биокомпатибилности наноматеријала на бази калцијум-силиката на анималном моделу- интракоштана имплементација.....	48
3.9.1. <i>Субјекти</i>	49
3.9.2. <i>Испитивани материјали</i>	49
3.9.3. <i>Анестезија</i>	49
3.9.4. <i>Рандомизација</i>	50
3.9.5. <i>Хируршка процедура</i>	50
3.9.6. <i>Припрема ткива и хистолошко оцењивање</i>	51
3.10. Испитивање биокомпатибилности наноматеријала условима након директног прекривања пулпе зуба.....	54
3.10.1. <i>Тест процедура</i>	54
3.10.2. <i>Припрема ткива и хистолошко оцењивање</i>	55
3.11. Статистичка анализа	56
4. Резултати	57
4.1. Резултати XRD анализе испитиваних материјала	57
4.1.1. <i>Резултати XRD анализе ALBO-MPCA₁ пре и након хидратације</i>	57
4.1.2. <i>Резултати XRD анализе ALBO-MPCA₂ пре и након хидратације</i>	58
4.1.3. <i>Резултати XRD анализе GREY-MPCA пре и након хидратације</i>	59
4.1.4. <i>Резултати XRD анализе MTA⁺ пре и након хидратације</i>	61
4.2. Резултати FTIR анализе испитиваних материјала	62
4.2.1. <i>Инфрацрвени спектар ALBO-MPCA₁ пре и након хидратације</i>	62
4.2.2. <i>Инфрацрвени спектар ALBO-MPCA₂ пре и након хидратације</i>	64
4.2.3. <i>Инфрацрвени спектар GREY-MPCA пре и након хидратације</i>	64
4.2.4. <i>Инфрацрвени спектар MTA⁺ пре и након хидратације</i>	66
4.3. Резултати SEM и EDS анализа испитиваних материјала.....	68
4.3.1. <i>SEM и EDS анализа ALBO-MPCA₁</i>	68

4.3.2. SEM и EDS анализа ALBO-MPCA ₂	69
4.3.3. SEM и EDS анализа GREY-MPCA	70
4.3.4. SEM и EDS анализа MTA ⁺	71
4.4. Резултати рН анализа и кинетике отпуштања јона	72
4.5. Резултати цитотоксичности свежих раствора испитиваних материјала (МТТ тест)	76
4.6. Резултати цитотоксичности екстраката испитиваних материјала (МТТ тест)	78
4.7. Резултати цитотоксичности екстраката испитиваних материјала (LDT тест).....	80
4.8. Резултати цитотоксичности екстраката испитиваних материјала (тест пролиферације)	83
4.9. Резултати цитотоксичности свеже замешаних испитиваних материјала (директна метода)	85
4.10. Резултати интрамишићне имплементације испитиваних материјала	90
4.11. Резултати интракоштане имплементације испитиваних материјала.....	97
4.12. Резултати директног прекривања пулпе зуба испитиваним материјалима	110
5. Дискусија.....	113
5.1. Дискусија резултата карактеризације испитиваних материјала	114
5.2. Дискусија резултата испитивања рН и кинетике ослобађања јона.....	117
5.3. Дискусија резултата <i>in vitro</i> испитивања биокомпатибилности материјала.....	119
5.4. Дискусија резултата <i>in vivo</i> испитивања биокомпатибилности материјала	129
6. Закључци.....	138
7. Литература.....	140

1. УВОД

1. Увод

1.1. Појам биокомпатибилности

Најчешће цитирана дефиниција биокомпатибилности предложена је 1987. године као „способност материјала да делује уз адекватан одговор домаћина у специфичној ситуацији“. Супротно ранијим ставовима о њиховој инертности, предложена дефиниција подразумева да материјал мора да одигра одређену улогу у организму, односно да интеракција материјала и биолошког система узрокује одговор домаћина (Williams, 2008).

Прихватање активног односа између материјала и биолошког система довело је до развоја неколико основних идеја о биокомпатибилности. Прва идеја подразумева да се интеракција материјал - биолошки систем карактерише обостраним променама, односно материјал изазива реакцију биолошког система, али и сам материјал по имплементацији у биолошки систем трпи промену у неком обиму, корозијом, хемијском модификацијом, депозицијом супстанци, деградацијом или другим механизмом (Wataha, 2012). Друга идеја представља интеракцију материјал - биолошки систем као динамични процес, што значи да материјал и биолошки систем модификују један другог, а то даље узрокује промене у организму. Трећа идеја подразумева да су реакције на месту контакта материјал - биолошки систем директно у вези са функцијом ткива где је интеракција остварена, док четврта идеја која се односи на контакт материјала и биолошког система ставља акценат на оно што се често заборавља, а то је чињеница да материјали природно не припадају месту где су имплементирани (Anderson, 2001; Ratner и Bryant, 2004; Wataha, 2012).

Биолошки одговор на присуство биоматеријала карактерише се промоцијом неспецифичног имунског система, односно накупљањем гигантских ћелија, моноцита и макрофага, и образовањем фиброзне аваскуларне баријере између материјала и ткива. Лимитирање одговора домаћина на присуство материјала као страног тела био је главни циљ њиховог развоја у току последњих деценија. Захтеви које се данас намећу денталним материјалима софистициранији су, обзиром да исти обављају

дугорочне улоге у организму, те се стога трага за начинима модификације и оптимизације контакта материјал - ткиво у циљу обезбеђивања најбољих дугорочних клиничких резултата (Anderson, 2001; Ratner и Bryant, 2004).

Због наведеног, Williams је 2008. године модификовао своју дефиницију биокомпатибилности као способност материјала да обави жељену функцију у организму у складу са терапијом, не изазивајући било коју нежељену локалну или системску реакцију домаћина, а при томе генеришући адекватан ћелијски и ткивни одговор у датој специфичној ситуацији (Williams, 2008).

1.2. Лекови и средстава

Америчка организација за храну и лекове (енгл. *Food and Drug Administration- FDA*) препознала је велики број супстанци које се користе у промоцији здравља, међу којима су две најчешће: лекови и медицинска средстава. Већина денталних материјала класификовани су у групу медицинских средстава, укључујући материјале за испуне, дијагностичка средства, цементе, адхезивна средства и имплантате. FDA дефинише медицинско средство као: инструмент, апарат, имплемент, машину, имплантат, *in vitro* реагенс и сл., док је Законом Европске уније 93/42, медицинско средство дефинисано као материјал који не остварује свој примарни ефекат фармаколошким, имунолошким или метаболичким путем (Monsein, 1997).

Лекови се разликују од медицинских средстава по томе што своје примарне ефекте остварују путем хемијске реакције. Стога, лекови захтевају како сигурносне провере, тако и прецизно дефинисање њиховог намењеног хемијског ефекта. Медицинска средства, са друге стране, морају да поседују само сигурност провере за њихову намењену употребу да лече, третирају или превенирају обољења (Wataha, 2012).

FDA класификује медицинска средства на Класу I, II и III (Monsein, 1997). Већина денталних средстава припадају Класи I или II. У Класу I се убрајају дентални артикулатори, дентални цементи (на бази цинк оксид еугенола, привремени),

дентални восак. У класу II се убрајају дентални цементи (нису на бази цинк-оксид еугенола, трајни), амалгами, легуре племенитих и неплетитих метала, лајнери на бази калцијум-хидроксида, ендосеални имплантати (енгл. *root forms*), материјали за отиске, заливачи фисура и јамица, порцелан, акрилатни зуби, дентални адхезиви на бази смоле, материјали на бази смоле, материјали за каналну оптурацију (без хлороформа). У класу III се убрајају ендосеални имплантати (енгл. *blade forms*) и материјали за каналну оптурацију са хлороформом. Класа III медицинских средстава односи се на материјале који представљају највећи ризик за човека (Monsein, 1997).

1.3. *In vitro* тестови

Биолошки одговор домаћина на денталне материјале може се процењивати на различите начине, али најосновнији начин представљају *in vitro* тестови. По дефиницији *in vitro* тестови подразумевају реакцију изван организма, односно на нивоу ћелијских култура. *In vitro* тестови се разликују од *ex vivo* тестова због чињенице да користе интактна ткива или органе који се одржавају у ћелијским посудама, обично до 24 сата (Schmalz, 1997; Wataha, 2012).

Први изведени тестови су били, технички се може рећи *ex vivo*, обзиром да су подразумевали коришћење ембрионалног кокошијег ткива. Kawahara је 1968. године представио методу у којој је користио ћелијске културе у циљу испитивања цитотоксичности материјала, укључујући и денталне материјале (Kawahara et al., 1968). Неколико година касније Leirskar и Helgeland су представили употребу мишјих фибробласта L929 у сврси испитивања биокompatбилности амалгама, композита, силикатних цемената и легура злата (Leirskar & Helgeland, 1972).

Први *in vitro* тест којим је квантификован биолошки одговор заснивао се на употреби ^{51}Cr подлоге. Користећи се способношћу виталних ћелија са интактном мембраном да везују радиоактивни изотоп ^{51}Cr , квантификовао је ослобађање ^{51}Cr , односно нарушавање интегритета ћелијске мембране, а самим тиме и токсични ефекат материјала (Spangberg, 1973). Појава агар тестова (енгл. *agar overlay*) представљала је прекретницу у развоју идеје о интерпонирању баријере између

материјала и ћелијске културе која би на тај начин симулирала *in vivo* услове (Hensten-Pettersen & Helgeland, 1977). Данас се *in vitro* тестовима могу проценити бројни аспекти ћелијске функције или метаболизма, укључујући генску експерсију, сигналне путеве, ћелијски циклус и деобу, експресију протеина, оксидативни стрес итд. *In vitro* тестови подразумевају дефинисање низа варијабли, као што су: компоненте материјала, контакт између материјала и ћелија, услови гајења ћелија, време контакта, врста ћелија, ефекти материјала и ћелија (ISO 10993-1). Дефинисање појединачних варијабли у току *in vitro* испитивања биокомпатибилности материјала приказано је у Табели 1.

1.4. *In vivo* тестови

Тестови на анималним моделима су од пресудног значаја за праћење биолошког одговора домаћина на присуство материјала, пре његове дефинитивне употребе на људима. За бројне аспекте биолошког одговора не постоје до сада патентирани *in vitro* модели, као што су на пример: крвне интеракције, зарастање рана, реакције хиперосетљивости, канцерогенеза, хронична инфламација итд. *In vivo* тестови могу да пруже значајне информације без излагања људи ризику, али као и у случају *in vitro* тестова, постоји значајан број варијабли које морају да буду узете у обзир пре започињања самог експеримента (Anderson, 2001; ISO 10993-1). Најзначајније варијабле које је потребно дефинисати су: форма испитиваног материјала, интеракцију материјал - ткиво, фактори који се односе на животињске врсте, време контакта материјала и ткива, те начине процене ефеката материјала (Табела 1).

Тестови биокомпатибилности на анималним моделима могу се генерално поделити на:

1. тестове који утврђују безбедност испитиваног материјала (енгл. *safety - oriented*) и
2. тестове који утврђују клиничку ефикасност испитиваног материјала (енгл. *function - oriented*).

Табела 1. Дефинисање појединачних варијабли у току *in vitro* и *in vivo* испитивања биокомпатибилности (ISO 10993-1)

<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	
Варијабла	Дефинисање	Варијабла	Дефинисање
Материјал-компоненте	<i>услови мешања, време везивања, карактеризација површине, стерилизација, величина честица; компоненте материјала - хемијски састав, окидација, комплекси, концентрација, коришћење средстава за растварање,</i>	Материјал-форма	<i>услови мешања, време везивања, третирање површине, стерилизација; методе брушења, млевења, величина честица материјала, облик честица материјала; екстракциони медијум, шема разблаживања, врста разблаживача</i>
Врста контакта	<i>директан- ћелије на материјалу, ћелије око материјала, површина материјала у односу на V медијума; индиректан- екстракциони медијум, дилуциона шема, дилуционо средство; баријера- тип баријере, дебљина баријере, однос материјала и баријере</i>	Материјал - ткиво интеракција	<i>пут администрације- орално, површински, имплантација, интрамуслуларно, интравенозно и др; врста ткива- мукоза, мишић, везивно ткиво, кост, крв, орган и др; присуство капсуле- да ли је материјал постављен у други материјал за имплементацију или није</i>
Услови гајења ћелија	<i>средина- концентрација CO₂, температура, број ћелија по cm² супстрата, преинкубација супстрата, врста ћелијских посуда</i>	Фактори животиња	<i>врста/подврста животиње, животна доб експерименталне животиње- ембрион, новорођенче, период интензивног раста и развоја, одрасла јединка; пол и репродуктивни статус- мушки, женски, стерилност; исхрана експерименталне животиње- додаток специјалних суплемената; специјални фактори- генетски статус; присуство или одсуство појединих обољења</i>
Време контакта	<i>време у односу на степен деобе ћелија</i>	Време контакта	<i>животни век експерименталне животиње, време коришћења материјала</i>
Ћелијска врста	<i>ћелијска линија- изворно ткиво, шема пропагације, медијум и суплементи, супстрат; примарне ћелије- изворно ткиво, врста, метода дисагрегације, метода изолације, број пасажа, медијум и суплемент, супстрат; мултипле ћелије- слојеви, 3D култура</i>	Процена	<i>дугорочно или краткорочно преживљавање, промена телесне тежине, макроскопске промене, хистолошке промене, промене ћелијске функције, ослобађање компоненти материјала - локално или системски</i>

1.5. Клинички тестови

Клинички тестови представљају златни стандард за утврђивање било које перформансе материјала, укључујући и њихов биолошки одговор. Постоји неколико начина на основу којих клиничке студије могу бити дизајниране.

Најједностаније и најефикасније су ретроспективне клиничке студије које подразумевају прикупљање података из анамнезе пацијента након одређеног третмана, како би се извршила валоризација ефеката материјала. Ретроспективне студије су ефикасне и јефтине, обзиром да не захтевају директан преглед пацијента. Ове студије главном не поседују контролу података прикупљених од предходних клиничара, па и поред ограничења и предострожности у прикупљању и коришћењу таквих података, постоји ризик од пристрасности у селекцији података, њиховом неадекватном интерпретирању и погрешном тумачењу (Mjör, 2007; Wayne, 2007).

Другу групу чине студије пресека. Студије пресека региструју одређену појаву у групи пацијената у датом временском тренутку. Овај тип студија јасно дефинише критеријуме укључивања и искључивања пацијената у студију, као и процес прикупљања специфичних података на стандардизован начин. Са друге стране, ове студије не могу контролисати варијабле које нису регистроване у тренутку терапије, а могу значајно да утичу на исход резултата (Mjör, 2007; Wayne, 2007).

Прогресивне или лонгитудиналне студије предствалају најјачи клинички инструмент за утврђивање биолошког одговора неког материјала. Ове студије другачије се и називају контролисаним клиничким студијама (енгл. *Controlled clinical trials*- CCTs) или рандомизованим контролисаним студијама. Ове студије користе специфичне процедуре да би обезбедиле слепо посматрање, рандомизацију и плацебо групу, како би обухватиле варијабле које доводе до погрешне интерпретације резултата. Најбоље дизајниране студије подразумевају двоструко слепо процедуру- ни пацијент, ни лекар не знају који третман се додељује пацијенту, што није увек и могуће реализовати. Контролисани клиничке студије су скупе и захтевају време и посвећеност истраживача укључених у студију (Cochrane Collaboration Website).

1.6. Стандардизација тестова биокомпатибилности

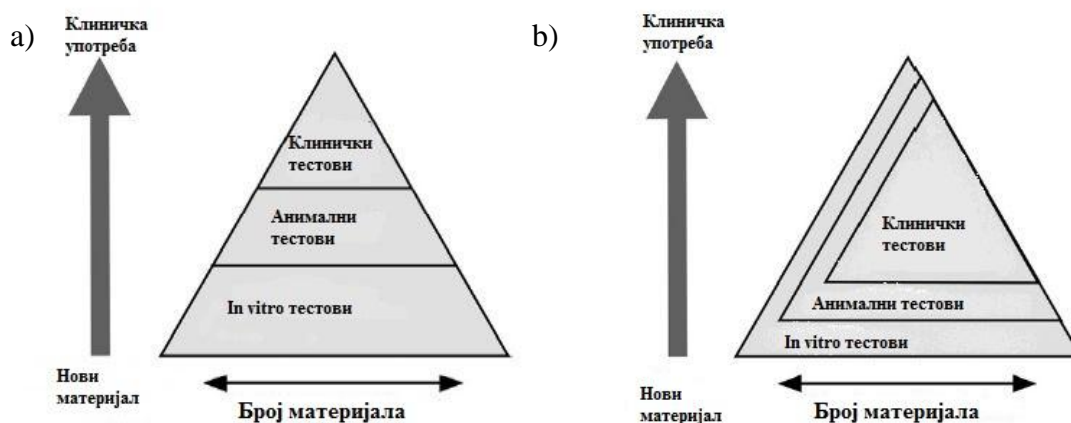
Класична парадигма примене *in vitro* - *in vivo* - клиничких тестова у циљу испитивања биокомпатибилности материјала није увек успешна због немогућности *in vitro* и *in vivo* тестова да увек опонашају клиничке услове. Стога се препоручују нове стратегије које омогућавају да се уз помоћ *in vitro* и *in vivo* тестова упоређују слични материјали на тржишту и убрза њихова клиничка употреба (Слика 1). Да би се нови материјал појавио на тржишту, неопходно је спровести тестове утврђене стандардима који дефинишу безбедност, материјал - ткиво интеракцију и време контакта.

Интернационална организација за стандардизацију (енгл. *International organization for standardization*- ISO) извршила је поделу медицинских средстава на основу времена контакта на три следеће групе (ISO 10993-1):

- 1) органичено време контакта (до 24 сата),
- 2) пролонгирано време контакта (до 30 дана),
- 3) перманентно време контакта (дуже од 30 дана).

Сходно овој подели, медицинска средства са перманентним временом контакта захтевају и најригорознија тестирања. Препоручени стандарди обезбеђују униформност метода, адекватност контролних група у току тестирања, смањење ризика од истраживачке пристрасности и бољу интерпретацију добијених података. Интернационална организација за стандардизацију ISO 10993 у деловима од 1 до 20 прописује услове испитивања и начине евалуације биокомпатибилности медицинских средстава кроз дефинисање: захтева за добробит животиња; тестова гено, канцero и репродуктивне токсичности; тестова за интеракцију са крвљу и *in vitro* цитотоксичности; тестова за одређивање локалних ефеката након имплементације; одабира референтних материјала; начина идентификације и квантификације деградационих производа; тестова за одређивање реакције одложене хиперосетљивости и иритације; тестова за одређивање системске цитотоксичности;

начина припреме узорака и референтних материјала; начина идентификације и квантификације потенцијално штетних деградационих производа полимерних медицинских средстава, керамичких материјала, метала и легура; начина дизајнирање студија токсикокинетице деградационих растворљивих производа; дозвољених граница растворљивих супстанци; хемијску, физичко-хемијску, морфолошку и топографску карактеризацију материјала итд. (ISO 10993-1).



Слика 1. а) Класична пирамида испитивања биокомпатибилности новог материјала, само материјал који испуне захтеве првог нивоа се тестирају даље;

б) Алтернативна пирамида испитивања биокомпатибилности новог материјала, комбинација сва три нивоа тестова без јасних граница, континуирана улога *in vitro* и тестова на анималним моделима (Wataha, 2012).

1.7. Хемијске карактеристике материјала на бази калцијум-силиката

Први биоактивни материјал из области ендодонтске терапије на бази калцијум-силиката, представљен од стране *Abedi* и *Ingle* (*Abedi & Ingle 1995*), и *Torabinejad* и сар. (*Torabinejad et al. 1995*), назван је минерални триоксидни агрегат (енгл. *Mineral trioxide aggregate* - МТА). МТА је изведен из Портланд цемента (PC) деведестих година прошлог века на Лома Линда Универзитету и иницијално је био препоручен као материјал избора за ретроградне кавитете.

Читава фамилија цемената на бази калцијум-силиката назива се другачије и хидраулични силикатни цементи (енгл. *Hydraulic silicate cement- HSC*), обзиром да се реакција везивања ових материјала заснива на процесима хидратације, односно ови цементи се везују и стабилни су у присуству воде (*Fridland & Rosado, 2005*). Оваква класификација довољна је да би се направила разлика од других силикатних цемената чија се везивање заснива на ацидно - базној реакцији.

МТА представља мешавину 75% рафинираног PC, 20% бизмут-оксида и 5% калцијумсулфат-дихидрата са траговима SiO_2 , CaO , MgO , K_2SO_4 и Na_2SO_4 (*Camilleri et al., 2005; Dammaschke et al., 2005; Sarkar et al., 2005*). Главне компоненте PC су дикалцијум-силикат, трикалцијум-силикат, трикалцијум-алуминат и тетракалцијум-алуминоферит (*Camilleri et al., 2005; Dammaschke et al., 2005; Sarkar et al., 2005*).

Трикалцијум-силикат $(\text{CaO})_3 \cdot \text{SiO}_2$, скраћено C_3S , представља главну компоненту PC одговорну за формирање калцијумсилика-хидрата (CSH) који обезбеђује рану чврстоћу материјала (*Greenberg & Chang, 1965*). Познато је више полимера трикалцијум-силиката: T1, T2, T3 (триклинични); M1, M2, M3 (моноклинични) и R (ромбоидни), у зависности од присуства нечистоћа (*de Noirfontaine, 2003*). Симетрија кристала трикалцијум-силиката расте са порастом температуре, а његова структура је стабилна на температури између 1250 до 1800⁰C. Трикалцијум-силикат са нечистоћама у литератури је познат као алит (*Brouwers & van Eijk, 2003*).

Дикалцијум-силикат $(\text{CaO})_2 \cdot \text{SiO}_2$, скраћено C_2S , знатно спорије подлеже процесу хидратације и стога је одговоран за касну чврстоћу материјала. Присутан је

у виду пет полимера: α , α'_H , α'_L , β и γ (Odler, 2000). Катјони, као што су Al^{3+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , K^+ и ањони SO_4^{2-} и PO_4^{3-} , који могу да се нађу у његовом саставу, стабилизију његову структуру на високим температурама. Дикалцијум-силикат који има нечистоћа у свом саставу познат је под називом белит. Зависност количине присутних нечистоћа и реактивности појединих форми дикалцијум силиката није утврђена (Brouwers & van Eijk, 2003).

Трикалцијум-алуминат $(CaO)_3 \cdot Al_2O_3$, скраћено C_2A , најреактивнија је компонента РС, обично присутна у кубичастој форми. Структура трикалцијум-алумината израђена је од шест прстенова тератедра AlO_4 и јона Ca^{2+} (Odler, 2000). Трикалцијум-алуминат има мали утицај на чврстоћу материјала иако снажно реагује са водом.

Калцијум-алуминоферит $(CaO)_4 \cdot Al_2O_3 \cdot Fe_2O_3$, скраћено C_4AF , је компонента која умерено реагује са водом, а та реактивност расте са порастом садржаја алуминијума (Brouwers & van Eijk, 2003). Припада групи солидних раствора C_2A - C_2F . Структура C_2A стабилна је само под високим притиском (Brouwers & van Eijk, 2003). Калцијум-алуминоферит образује групу солидних раствора формуле $C_2(Al_xF_{1-x})_2O_5$, где се вредности x крећу од 0 до 0,7 (Taylor, 1990). Калцијум-алуминоферит је једина снажно обојена компонента овог четворокомпонентног система, у литератури познат и као милерит (енгл. *brownmillerite*).

Калцијумсулфат-дихидрат $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ (гипс), важна је детерминанта времена везивања МТА, као и тетракалцијум-алуминоферит, али у мањем обиму (Dammaschke et al., 2005). МТА производи поседују приближно половину садржаја гипса у односу на РС, као и мању количину једињења алуминијума, што дефинише њихово дуже радно време. Овим је поред пролонгирања времена везивања, повећана и пластичност материјала (Soroka, 1979; Bensted & Barnes, 2002).

И поред сличног хемијског састава, МТА и РС нису исти материјали. МТА производи поседују мању средњу величину честица, мање потенцијално токсичних тешких метала и дуже радно време (Komabayashi & Spangberg, 2008). РС има ограничену употребу у стоматолошкој пракси због високог садржаја тешких метала (Bramante et al., 2008), недостатка адекватног радиоконтрастног средства (Bortoluzzi

et al., 2009; Vivan et al., 2009), релативно велике експанзије (Islam et al., 2006), дистрибуције честица различите величине (Dammaschke et al., 2005) и релативно високе растворљивости (Islam et al., 2006). Модификације који су примењиване у процесима дизајнирања МТА, односиле су се на величину честица праха, време везивања, растворљивост, порозност и токсичност (смањењем садржаја тешких метала). Са изузетком Bi_2O_3 , који је специфичан додаток МТА производа, РС и МТА садрже 50-75 мас% CaO (кречњак), док је садржај SiO_2 15-25 мас%, односно Al_2O_3 2-5 мас%. Присуство MgO , Fe_2O_3 и других тешких метала у траговима уобичајене су нечистоће у РС (Bramante et al., 2008).

Први МТА материјал који се појавио на тржишту описан је као фини хидрофилни прах састављен претежно од јона калцијума и фосфора, са додатком бизмут-оксида који обезбеђује радио контрастност већу од дентина. Међутим, касније истраживања су потврдила да је количина фосфора у МТА производима веома мала, готово немерљива (Dammaschke et al., 2005). До 2002. године, била је доступна само једна форма МТА материјала која се састојала од сивог праха (енгл. *grey*, GMТА), да би потом била представљена и бела форма МТА (енгл. *white*, WMТА) у облику првог комерцијалног препарата ProRoot МТА (Dentsply Endodontics, Tulsa, OK, USA), а све у циљу испуњавања естетских захтева (Dammaschke et al., 2005; De Vasconcelos et al., 2009).

Анализе су потврдиле да постоји велика разлика у саставу GMТА и WMТА, пре свега у концентрацијама Al_2O_3 , MgO и FeO (Camilleri et al., 2005, Belio-Reyes et al., 2009). Доказано је да WMТА садржи 54,9% мање Al_2O_3 , 56,5% мање MgO и 90,8% мање Fe_2O_3 , што доводи до закључка да је смањење Fe_2O_3 највероватније узрок за промену боје праха (Asgary et al., 2005). WMТА такође поседује мању величину честица од GMТА (Camilleri, 2007), што дефинише већу специфичну површину, повећава запремину влажења и степен хидратације (Soroка, 1979). На основу истраживања Lee и сар. (Lee et al., 2004), закључео је да величина честица GMТА праха варира од 1 to 10 μm , док Camilleri (Camilleri, 2007) наводи да је WMТА прах изграђен од честица мањих од 1 μm , што је значајно обзиром да величина честица и њихова структура могу да имају утицај на физичка и биолошка својства материјала.

1.8. Хемијске и технолошке модификације материјала на бази калцијум-силиката

Ендодонтско лечење инфицираних зуба са незавршеним растом корена представља прави изазов за стоматолога услед суочавања са бројним тешкоћама. Канали корена зуба са незавршеним растом корена су широки и обично у облику левка, што значи да често шири у апикалној у односу на коронарну трећину због чега је веома тешко уклонити сво некротично ткиво од дентина, а затим и постићи адекватну obturацију (Andreasen et al., 2007). Широки апикални отвор и одсуство апексне констрикције услед употребе материјала за дефинитивну obturацију може да изазове трауму периапикалног ткива, што надаље угрожава повољан исход лечења (Торе, 2008). Посебан проблем представљају и танки дентински зидови који су подложни фрактурама током самог ендодонтског третмана или након дефинитивне obturације (Garcia-Godoy & Murray, 2012).

Током протеклих деценија, најчешће коришћен материјал у терапији зуба са незавршеним растом корена био је калцијум-хидроксид због стимулације стварања дентину сличног ткива, јаког антибактеријског ефекта и његове способности да раствори некротично ткиво пулпе (Georgopoulou et al., 1993; Turkun & Cengiz, 1997). Међутим, недавни докази износе низ недостатка калцијум-хидроксида у смислу негативног утицаја на механичка својства дентина, смањујући њихову отпорност на фрактуру, формирање некротичног слоја у контакту са виталним ткивом пулпе, смањење волумена пулпе и промене у фибробластима који су били у контакту са овим материјалом (Andreasen et al., 2002; Yoldas et al., 2004; Petrovic et al., 2008).

Материјали на бази калцијум-силиката, намењени за obturацију канала корена зуба (МТА чеп) постепено замењује калцијум-хидроксид захваљујући низу предности: задовољавајућој биокompatбилности, немутагености, добром прилагођавању за дентинске зидове, ниском степену микроцурења и биолошкој активности без штетних ефеката на отпорност дентинских зидова (Torabinejad et al., 1995; Bates et al., 1996; Murray et al., 2003; Moore et al., 2011; Cetenović et al., 2013).

Међутим, постоји неколико проблема повезаних са хемијским карактеристикама материјала на бази калцијум-силиката који ограничавају њихову клиничку употребу, као што су отежана манипулација изазвана њиховом сувом конзистенцијом, дуго време везивања, присуство токсичних компоненти (минималне количине арсена у неким препаратима) и могуће пребојавање зуба (Parirokh & Torabinejad, 2010). Стога је развој нетоксичних, биолошки активних материјала за потенцијалну употребу у ендодонтској терапији са побољшаним хемијско-физичким својствима предмет многих истраживања.

Материјал на бази калцијум-силиката назван Биоагрегат (*Bioaggregate*, Innovative BioCeramix, Ванкувер, Канада), модификован у смислу одсуства алуминијума и бизмута као елемената који могу потенцијално да компромитују биокомпатибилност (Park et al., 2010; Saghiri et al., 2013). Састоји од калцијум-силикатних оксида и калцијум-силиката, са додатком хидроксиапатита, калцијумфосфат-силиката, калцита, и тантал-оксид као радио контрастног средства. У поређењу са РС и МТА, ВА у свом саставу нема калцијум-алуминат, односно садржи знатно више фосфата, који се код ових материјала налазе готово у траговима (Park et al., 2010; Saghiri et al., 2013). Биоагрегат практично садржи све компоненте WMTA, уз одсуство алуминијума, и присуство другог оксида као радио контраста, као и фосфатних конституената попут хидроксиапатита (Park et al., 2010; Saghiri et al., 2013).

Као брзовезујући материјал на бази калцијум-силиката и супституент дентина, представљен је Биодентин (*Biodentine*, Septodont, St Maure des Foss'es, Француска). Калцијум-карбонат је инкорпориран у састав овог материјала како би се скратило време везивања, повећао садржај калцијума и унапредила његова биокомпатибилност. Поред доминантно присутаног трикалцијум-силиката, садржи и дикалцијум-силикат, калцијум-карбонат, калцијум-оксид и цирконијум-оксид као радио контрастно средство. Течност са којом се прах меша садржи калцијум-хлорид и хидросолубилни полимер на бази поликарбоксилата који је одговоран за конзистентнију смеше (Burgess et al., 2009). Такође, време везивања је редуковано и због присуства калцијум-хлорида као течне компоненте материјала (Burgess et al., 2009).

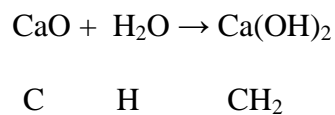
Наномедицина је дисциплина која у себе укључује нанотехнологије у циљу проучавања материјала изграђених од честица нано величина (око 100 nm) и предностима њихове примене у клиничкој пракси (Jokanovic, 2012; Markovic et al., 2016). У последњих неколико година, наноматеријали привлаче велику пажњу истраживача због својих јединствених физичко-хемијских особина и биолошких својстава (Torabinejad et al., 1995; Pairokh & Torabinejad, 2010). Важан аспект и велики изазов нанотехнологије је синтеза нетоксичних наноматеријала који најбоље опонашају услове живог система (Jokanovic, 2012).

Применом нанотехнологије, односно специфичних метода, могуће је превазићи поменуте недостатке у току синтезе материјала на бази калцијумсиликата, пре свега у смислу скраћивања времена везивања појединих фаза кроз њихову убрзану хидратацију (Jokanovic et al., 2014). Коришћењем савремених технологија и развојем нових материјала могуће је унапредити биолошка својства материјала, односно утицати на стимулацију процеса апексификације током ендодонског третмана зуба са незавршеним растом корена.

1.9. Процес хидратације материјала на бази калцијум-силиката

Реакција везивања материјала на бази калцијум-силиката изузетно је компликован процес који зависи од пропорција присутних фаза, њихове чистоће и температуре смеше (Табела 2). Поред тога, бројни реакциони производи који се формирају кинетиком различитих процеса, могу да се нађу под утицајем различитих физичких баријера за дифузију, створених на површини честица. Симултано се одвијају и процеси растварања, рекристализације и интеракције производа.

Након излагања води, калцијум-оксид реагује готово тренутно:



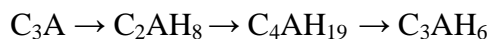
Табела 2. Заступљеност фаза у нехидратисаном праху GMТА (Darvell & Wu)

Фаза	Хемијска формула	Хидратација Степен, Т	Пропорција/ маса%
Трикалцијум- силикат	$3\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2, \text{C}_3\text{S}$	Брза, ~500	$51,9 \pm 1,5$
Дикалцијум- силикат	$2\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2, \text{C}_2\text{S}$	Спора, ~250	$23,2 \pm 1,6$
Трикалцијум- алуминат	$3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3, \text{C}_3\text{A}$	Тренутна, ~850	$3,8 \pm 0,5$
Тетракалцијум- алуминоферит	$4\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3,$ C_3AF	Веома брза, ~420	0
Калцијумсулфат- дихидрат	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		$1,3 \pm 0,3$
Клцилит, бизмут- оксид, оксиди алканих метала	$\text{CaCO}_3, \text{Bi}_2\text{O}_3,$ CaO, MgO		$19,8 \pm 0,4$ (Bi_2O_3)
Сулфати алкалних метала	$\text{K}_2\text{SO}_4, \text{Na}_2\text{SO}_4$		

У случају WMТА, C_2S фаза је мање заступљена, C_3A је занемарљиво мало заступљена, C_3AF је одсутна,

T- темпеартура хидратације (J g^{-1})

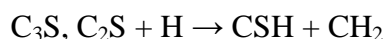
Ова реакција позната је као гашење креча и представља снажну егзотермну реакцију. Трикалцијум-алуминат такође брзо реагује образујући низ хидрата који представљају дифузионе баријере:



Међутим, ако је у саставу материјала на бази калцијумсиликата присутан сулфат ($\dot{\text{S}}$), конкурентске реакције доминирају, спречавајући друге хемијске реакције да се одвијају све док комплетан сулфат не изреагује:



Поменуте реакције су одговорне за рано везивање материјала. Дифузија воде кроз настале баријере (гел) и експанзија гела су кинетички лимитиране реакције. Наглим пуцањем гела, одвијају се једноставне реакције хидратације које напредују знатно брже. У међувремену, најважнији конституент праха C_3S реагује са водом, што представља спорији, али главни механизам очвршавања материјала, коју прати реакција са C_2S :



Калцијумсилика-хидрат (CSH) није још увек добро карактеризовано једињење, односно може да варира у свом саставу, док је углавном у аморфном облику. Порекло калцијум-хидоксида (CH_2), који настаје у процесу хидратације материјала на бази калцијум-силиката, и даље је предмет расправе; док поједини аутори сматрају да се CH_2 добија из дикалцијум и трикалцијум-силиката након мешања праха и течности (Camilleri et al., 2005), други су мишљења да је CH_2 продукт хидратације трикалцијум-алумината (Dammachke et al., 2005).

Даља прогресија реакција односи се на присуство калцијум-хидоксида у вишку, које је реактиван и дифундује кроз матрикс (Aligizaki, 2006). Очекивано је да ће доћи и до реакције са CO_2 чија је концентрација у физиолошким течностима знатна. Исто тако, физиолошки присутни фосфати на месту апликације материјала утичу на формирање једињења калцијум-фосфата, односно хидроксиапатита (Tau et al., 2007; Vozeman et al., 2006). Ове реакције могу да утичу на тврдоћу и чврстоћу материјала (Watts et al., 2007), као и на способност рубног заптивања (Martin, 2007), обзиром да се образовање преципитата очекује на местима дифузије јона калцијума, односно на комплетној површини материјала.

Материјала на бази калцијум-силиката могу да садрже и значајне количине гвожђа (2-5% по маси, Fe_2O_3 , F) у форми C_4AF , које може да учествује у реакцији везивања материјала производећи фазе као што су FH_3 . Обзиром да гвожђе представља замену за алуминијум у појединим МТА препаратима, постоје и минималне разлике у реакцијама везивања између WMТА и GMТА. Раније се

сматрало да механизам везивања материјала на бази калцијум-силиката може да буде измењен и у присуству V_2O_5 , али за то не постоје јасни докази (Camilleri, 2007). Закључак је да додаток V_2O_5 , као рендгенконтрастног средства, не игра битну улогу у процесу хидратације већ се само понаша као невезани филер (Camilleri, 2008).

Различити продукти хидратације стварају се током реакције везивања материјала на бази калцијум-силиката: калцијумсилика-хидрат у виду порозног колоидног гела или игличастих кристала (тоберморит, Слика 2. а), ромбоидни кристали портландита (калцијум-хидроксид, Слика 2. б), кристали еtringита (хексакалцијум-алуминотетрасульфат-хидрат, Слика 2. с), и калцијумоносулфо-алуминат или калцијумонокарбо-алуминат (Soroka, 1979; Bensted & Barnes, 2002, Lee et al., 2004; Gandolfi et al., 2010). Порозни CSH очвршћава постепеним формирањем солидне мреже у времену од 1 до 6 h.



Слика 2. а) Изглед кристала тоберморита (преузето:

<https://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/MineralData?mineral=Tobermorite>)

Комплетна реакција везивања захтева време од неколико дана како би се остварили процеси хидратације, односно процеси растварања и преципитације нехидратисаних C_2S и C_3S фаза и формирање дисиликат и трисиликат-хидрата и калцијум-хидроксида (Gandolfi et al., 2010). У овој фази, CSH има слојевиту структуру, са слојевима који расту радијално у виду игличасте форме, са ромбоидним кристалима калцијум-хидроксида који се налазе између хидратисаних компоненти цемента (Gandolfi et al., 2010).



Слика 2. b) Изглед кристала портландита (преузето:

<https://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/MineralData?mineral=Portlandite>)

Неупотребљен калцијум-хидроксид остаје као посебана кристална фаза у везаном CSH (C:S однос у CSH је мањи од 2:1, обично варира од 0,8 до 2,1). Како однос C:S расте, расте и степен кристалитета портландита (Lee et al., 2004). Генерално, процес везивања материјала на бази калцијум-силиката подразумева формирање хидратисаног калцијум-алумината, већег или мањег степена кристалитета, и сулфат-алумината у аморфном хидратисаном калцијум-силикатном

матриксу, са присутним калцијум-хидроксилом у виду дисперзија кристала (Soroка, 1979; Bensted & Barnes, 2002, Lee et al., 2004).



Слика 2. c) Изглед кристала еtringита (преузето:
<https://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/MineralData?mineral=Ettringite>)

1.10. рН и кинетика ослобађања јона из материјала на бази калцијум-силиката

Иницијално, МТА остварује алакалне рН вредности (око 10,2), односно три сата након мешања њихова алкалност расте на 12,5 (Torabinejad et al., 1995). Постоје докази да WMTA испољава значајно већу алкалност од GMТА након једног сата од почетка мешања материјала (Chng et al., 2005; Islam et al., 2006). Поред рН вредности у различитим временским периодима, WMTA и GMТА показују значајно веће рН вредности у односу на РС, непосредно након мешања, док се исте разлике не региструју након 30 min (Islam et al., 2006). МТА препарати одржавају рН вредности високим у току дужег временског периода, што има везе са константним ослобађањем јона калцијума (Fridland & Rosado, 2005).

Као најважнији катјони ослобађени из везаних узорака GMТА издвајају се (делови по милиону): Ca= 176.7±3.3, Si= 13.4±0.6; Bi= 6.1±0.5; Fe= 2.5±0.4; Al= 2.3±0.2, and Mg= 1.0±0.1 (Sarkar et al., 2005). Већи однос течност-прах увећава порозност и растворљивост МТА, те употреба веће количине течности у току мешања материјала повећава степен ослобађања јона калцијума (Fridland & Rosado, 2003). Константно ослобађање јона калцијума из материјала на бази калцијум-силиката документовано је у бројним студијама до сада (Fridland & Rosado, 2003; Sarkar et al., 2005; Antunes et al., 2006; Ozdemir et al., 2008; Natale et al., 2015). Такође, додавање калцијум-хлорида компоненти праха (WMTA), резултира значајно већом концентрацијом ослобођених јона калцијума (Antunes et al., 2006).

Постоје наводи да клинички услови утичу на степен ослобађања појединих јона из материјала на бази калцијум-силиката (Gandolfi et al., 2014; Natale et al., 2015). У једној скоријој студији приказано је значајно мање отпуштање јона калцијума из Dycal-а у киселој средини (рН= 5,5), у односу на МТА Angelus (око 18 %) и Биодентин (око 27 %). Ослобађање јона калцијума било је константно ниже у киселој средини за све испитиване материјале, и значајно више у неутралној средини у случају узорака Биодентина (Natale et al., 2015). Слични резултати презентовани су и у студији Gandolfi и сарадника (Gandolfi et al., 2014). Отпуштање јона калцијума

након три сата било је највише у случају материјала МТА Plus који је био замешан са дестилованом водом (43 ppm), односно гелом (119 ppm), и најниже за Dycal (25 ppm). У поменутој студији нису уочене значајне разлике између испитиваних материјала, иако је слобађање јона калцијума опадало у току времена (Gandolfi et al., 2014).

1.11. Биокомпатибилност материјала на бази калцијум-силиката

Коришћењем различитих ћелијских линија и тестова, највећи број студија су показале да материјали на бази калцијум-силиката остварују најмањи цитотоксични ефекат у поређењу са другим материјалима. У једној од првих студија, *Torabinejad* и сар. су агар методом (енгл. *agar overlay*), на култури фибробласта миша L-929, доказали да свеже замешан и везани МТА (24 h) испољавају мањи цитотоксични ефекат у поређењу са Super EBA и IRM, а већи у односу на амалгам (*Torabinejad et al.*, 1995).

Испитивање биокомпатибилности материјала на бази калцијум-силиката у *in vitro* условима најчешће је процењивано индиректним путем, помоћу теста митохондријалне дехидрогеназне активности (МТТ тест), као што је и препорука одговарајућег ISO стандарда (ISO 10993-1). Цитотоксичност GMТА, амалгама, ZOE, мерена је коришћењем поменутог теста у односу на културу ћелија хуманих фибробласта изолованих из периодонталног лигамената после 24-часовног излагања ћелијске културе различитим концентрацијама свежих раствора материјала и екстрактима везаних узорка (*Keiser et al.*, 2000). Свеже замешан МТА, и у највишим тестираним концентрацијама, испољио је најмањи степен цитотоксичности у поређењу са Super EBA и амалгамом (*Keiser et al.*, 2000). Још један извештај говори у прилог биокомпатибилности GMТА, односно негира се негативан утицај овог материјала на митохондријалну активност хуманих фибробласта пореклом из пародонталног лигаментa (*Lin et al.*, 2004). Слично наведеном, ни директном проценом, путем мерења количине ослобођене лактат дехидрогеназе, није потврђена цитотоксичност МТА на нивоу ћелијске културе мишијих кортикалних неурона, за разлику од узорка амалгама, Super EBA и Diaket-a (*Asrari & Lobner*, 2003).

Поједини аутори су се бавили и испитивањим цитотоксичности измењених формулација калцијум-силикатних система, направљене у циљу скраћивања времена везивања и повећања вискозности материјала, као њихових лоших карактеристика. Додавањем Na_2HPO_4 , Ding и сар. су постигли значајно скраћење времена везивања МТА, не нарушавајући привобитну биокомпатибилност материјала. Степен преживљавање ћелија износио је више од 90% у односу на контролу, а SEM анализа је указала на добру адхезију ћелија (Ding et al., 2006). Такође, негативне ефекте на биокомпатибилност свеже замешаних и везаних GMТА и WMТА није испољило ни додавање 5% раствора CaCl_2 и 2% раствора лидокаина. Супротно томе, додавање 3% NaOCl гела резултирало је порастом цитотоксичности свеже замешаног МТА (Jafarnia et al., 2009).

SEM анализом утврђено је да фибробласти пореклом из периодонталног лигамената испољавају нормалну морфологију и раст на површини 24-часовних везаних узорака МТА (Balto, 2003). Међутим, у случају свеже замешаних GMТА узорака, ћелије су биле округле, мање густине, са уочљивим површинским оштећењима и недостатком у површинској адхезивности (Balto, 2003). Уколико се квалитет и квантитет ћелијске адхезије користе као критеријуми за процену токсичности материјала, презентовани резултати упућују на то да су везани узорци GMТА мање цитотоксични од свежих (Balto, 2003). У сличној студији која је пратила ефекте пролиферације и адхезије ћелија на површинама материјала за оптурацију канала корена зуба, примећено је присуство PDL фибробласта на узорцима GMТА, као и њихово одуство на узорцима гутаперке (Fayad et al., 2004). Слично, група аутора је дошла до закључка да PDL фибробласти показују већи степен пролиферацији на површини WMТА узорака анализирајући ћелијску метаболичку активност (Bonson et al., 2004). Спроведене анализе у истој студији указују да WMТА индукује остеогени фенотип, односно активност алкалне фосфатазе, као и производњу остеонодогена, остеоонектина и остеоопонтина (Bonson et al., 2004).

Ефекти WMТА на вијабилност и степен пролиферације ћелија пулпе процењивани су коришћењем култура мишићних MDPC-23 ћелија (одонтобластима сличних ћелија) и недиференцираних OD-21 пулпних ћелија. Након 24-часовне

експозиције доказано је да WMTA индукује синтезу ДНК, односно испољава позитиван ефекат на ћелијску пролиферацију (Moghaddame-Jafari et al., 2005). Овај налаз подржала је и студија *Takita* и сарадника (Takita et al., 2006).

Упоређујући зависност цитотоксичност материјала од времена контакта и дужине екстракције, *De Deus* и сар. не запажају разлике у токсичним ефектима ProRoot МТА, МТА Angelus и РС. Након 24-часовног контакта сви материјали су показали сличан токсични ефекат на култури хуманих ендотелијалних ћелија ECV-304, који је постепено опадао након 48 h и 72 h, практично омогућавајући ћелијским културама да се обнове (*De Deus et al.*, 2005). Истим тестом, *Huang* и сар. су процењивали цитотоксичне ефекте екстраката ProRoot МТА и силера на бази калцијум-хидроксида и еугенола користећи ћелијске културе хуманог остеосаркома (*Huang et al.*, 2003). Најнижи цитотоксични одговор опет је уочен код узорака МТА, са јасним порастом након 48-часовне експозиције. У складу са овим резултатима, били су закључци *Koulaouzidou* и сар. (*Koulaouzidou et al.*, 2005), који су потврдили да дуже време контакта екстраката материјала МТА са културом ћелија фибробласта L-929, ВНК21/С13 и РС-С2А испољава негативне ефекте на њихово преживљавање.

О утицају дужине контакта екстраката материјала и ћелијских култура говорили су и *Yoshino* и сар., подржавајући наводе претходних студија (*Yoshino et al.*, 2013). Сличне резултате запазили су *Camilleri* и сар. поредећи токсичне ефекте ProRoot WMTA и ProRoot GMTA; и WPC и GPC (*Camilleri et al.*, 2005). МТТ тестом је утврђено да екстракти ниједног везаног узорка (1, 3, 7, 14 и 28 дана) не испољавају цитотоксичне ефекте, односно уочена је појачана метаболичка активност ћелијске културе након 24-часовне експозиције, осим у случају ProRoot GMTA и Proto В (WPC Bi_2O_3).

Хистолошка евалуација ткивне реакције на присуство материјала на бази калцијум-силиката процењивана је најчешће поткожном и/или интракоштаном имплементацијом. Поткожна имплементација ProRoot МТА показала је да овај материјал иницијално испољава интензивну запаљенску реакцију са знацима некрозе и дистрофичним калцификацијама, која се у функцији времена благо смиривала (*Moretton et al.*, 2000; *Yaltirik et al.*, 2004). Поједине студије су доказале формирање

калцификованих структура као одговор на присуство МТА узорака *Von Kossa*-овом техником (Holland et al., 1999; Holland et al., 2001; Holland et al., 2002). *Von Kossa*-ове позитивне структуре уочене око узорака GMТА (Holland et al., 1999; Yaltirik et al., 2004) и WMТА (Holland et al., 2002) већ после недељу дана, и са порастом времена посматрања прогресивно су се увећавале (Holland et al., 1999; Holland et al., 2002). Међутим, занимљиво је да поједини аутори наводе одсуство калцификованих структура након поткожне имплементације узорака МТА и поред коришћења *Von Kossa*-ове технике, што би значило да ови материјали не поседују остеоиндуктивни потенцијал (Kao et al., 2006; Sumer et al., 2006; Shahi et al., 2006; Vosoughhosseini et al., 2008; Prescott et al., 2008).

Сличан одговор поткожног ткива уочен је поређењем узорака МТА са РС и калцијум-хидроксидом (Holland et al., 2001). Није потврђено ни постојање значајних разлика у запаљенском одговору између МТА и амалгама (Sumer et al., 2006), у супротности са другом студијом која је доказала мањи степен запаљенске реакције узорака GMТА у односу на амалгам (Shahi et al., 2006). Конфликтни резултати доступни су и у вези са поткожном реакцијом између WMТА и GMТА (Shahi et al., 2006; Vosoughhosseini et al., 2008). У једној студији, након три дана, WMТА је изазвао знатно мањи степен запаљења у поређењу са GMТА; насупротив томе, после недељу дана, GMТА узорци су показивали знатно мањи степен запаљења у односу на WMТА (Shahi et al., 2006). Супротно наведеном, група истраживача није доказала постојање разлика у запаљенском одговору између GMТА и WMТА (Vosoughhosseini et al., 2008). Ови контрадикторни резултати могу бити приписани коришћењу пре свега различитих критеријума за хистолошку анализу, а потом и разликама у хемијском саставу испитиваних материјала.

Недавна истраживања показала су сличан запаљенски одговор поткожног ткива, од благих до умерених реакција, на присуство узорака РС и WMТА (Hwang et al., 2009). Ткивна некроза и више гигантских ћелија могло се уочити поређењем узорака МТА и силера на бази калцијум-силиката (Laliz et al., 2009). Још једна студија бавила се уоређивањем запаљенског одговора поткожног ткива између МТА и различитих силера (Sealapex и Endo СРМ силер). Резултати су показали да осим у раним

интервалима, постоји значајна разлика између МТА и Endo СРМ силера, који су били биокомпатибилнији од Sealapex-а (Gomes-Filho et al., 2009). Поменуће студије показале су да поткожни одговор на присуство узорака МТА варира у опсегу од умереног до интензиваног запаљенског одговора, са уочљивим знацима некрозе и појавом дистрофичних калцификација (Hwang et al., 2009; Laliz et al., 2009; Gomes-Filho et al., 2009), због разлика у примењеним критеријумима за хистопатолошку анализу, хемијском саставу, припреми материјала итд.

У једној од првих студија која се бавила испитивањем *in vivo* биокомпатибилности материјала на бази калцијум-силиката, доказано је да GMТА индукује слаб запаљенски одговор коштаног ткива у поређењу са ZOE (Torabinejad et al., 1995). Реакције на интракоштане имплантате МТА су биле слабијег интензитета у односу на поткожну имплементацију са јасно уочљивом остеогенезом по њиховој имплементацији (Moretton et al., 2000, Nascimento et al., 2007; Pinheiro et al., 2010), као и инфламацијом која је слабила по свом интензитету у току 12 недеља (Sousa et al., 2004). Слични запаљенски одговор након имплементације GMТА и РС приказан је и у резултатима *Saidon* и сар, с тим да је директна апозиција коштаног ткива уочена на површини узорака оба материјала (Saidon et al., 2003). Не осврћући се пак на природу везе новоформираног коштаног ткива и имплантираног материјала (Angelus Grey МТА), *Silva* и сар. детектују већу депозицију остеоидног ткива у телу коштаных дефеката, као и ишчезавање фибробластних пролиферација на њиховим ивицама, и смиривање запаљенске реакције у функцији времена (Silva et al., 2015). Међутим, постоје и наводи који нису потврдили постојање разлика у запаљенском одговору коштаног ткива између GMТА, WMТА, амалгама, пасти на бази калцијум-хидроксида и епоксида (Cintra et al., 2006; Assmann et al., 2015).

Када је реч о испитивању природе везе новоформираног коштаног ткива и имплементираног материјала (ProRoot МТА), *Torabinejad* и сар. су дошли до закључка да у 90% случајева није успостављена директна веза (Torabinejad et al., 1995). Аутори су ове резултате добили пласирањем тефлонских тубица испуњених испитиваним материјалом у коштане дефекте мандибуле замораца. Исти аутори су запазили директну везу материјала и новоформираног коштаног ткива у 45,45%

случајева, пласирајући исти материјал на идентичан начин у тибију замораца (Torabinejad et al., 1998). Коришћењу тefлонских тубица, у обе наведене студије прибегло се у циљу превенције разношења материјала из експерименталне регије.

Упоредјујући ефекате ProRoot МТА и РС на идентичном експерименталном моделу као и предходни аутори, *Saidon* и сар. су запазили и екстензивну и умерену везу са новоформираним коштаном ткивом у случају оба испитивана материјала. У већем проценту директан контакт је уочен код узорака ProRoot МТА након 14 дана (81,5%), односно код узорака РС након 84 дана (76,9%). Супротно наведеном, били су резултати *Gomes-Filho* и сар, који су на исти начин испитивали ефекте Angelus Grey МТА. Ови аутори закључују да након два месеца у 80% случајева није остварен директан контакт материјала са новоформираном коштаном ткивом (*Gomes-Filho et al.*, 2011).

Слични наводи односили су се и на ефекте свеже замешаних узорака Angelus Grey МТА који су директно пласирани у коштане дефекте (*Moretton et al.*, 2000). Хистопатолошки препарати парижеталне кости пацова, добијени након 15 и 30 дана посматрања указивали су на присуство искључиво индиректног контакта, док је директан контакт са новоформираном коштаном ткивом успостављен код 11,2% узорака након 60 дана (*Moretton et al.*, 2000). Наводи *Rahimi* и сар. подржавају поменуте резултате када је реч о узорцима свеже замешаног ProRoot МТА након 7 дана, односно 28 дана од имплементације, док је директна веза уочена код свих узорака након 56 дана (*Rahimi et al.*, 2012).

1.12. Биоактивност материјала на бази калцијум-силиката

Процес зарастања рана представља програмирану реакцију ткива живог система и обухвата комплексне ћелијске и биохемијске процесе који могу да доведу до репарације или регенерације (*Clark*, 1996; *Мајно & Joris*, 2004; *Kumar et al.*, 2009) Репарација је процес замене оштећеног дела ткива ожиљачним и обично води губитку његове биолошке функције. С друге стране регенерација подразумева замену оштећеног ткива истоветним ћелијама чиме биолошка функција није нарушена

(Gerstenfeld et al., 2003; Martin & Parkhurst, 2004; Majno & Joris, 2004; Kumar et al., 2009). И један и други процес контролирани су интеракцијама на новоу ћелија-ћелија, ћелија-међућелијска течност и експресијом фактора раста/citoкина, односно биомолекула који стимулишу ћелијски раст, пролиферацију, диференцијацију и метаболичку активност (Werner & Gross, 2003; Gurtner et al., 2008). Повреде пулног ткива, без обзира на етиологију праћене су запаљенском реакцијом и представљају постнаталне ране (Longaker et al., 1994; Bullard et al., 2003). Постнаталне ране не зарастају без формирања ожиљачног ткива у некој мери, односно не регенеришу се у потпуности, па тако ни ране пулног ткива (Longaker et al., 1994; Bullard et al., 2003).

Директно прекривање пулпе подразумева примену материјала у покушају да се сачува њен виталитет и индукује формирање новог дентинског мостића или дентину-сличног ткива, који надаље штити пулпо-дентински комплекс (American Association of Endodontists, 2003). Дуже од педесет година, пасте на бази калцијум-хидроксида користе се као „златни стандард“ у ендодонтској терапији са широким пољем индикација (Horsted-Bindslev & Lovshall, 2002).

Ослобађање калцијума сматрано је раније једино важним за биоактивност (Maeno et al., 2005; Takita et al., 2006; Gandolfi et al., 2013), али данас је предочено да формирање калцијум-фосфата (наноапатита) може да представља пресудан сигнал у индукцији експресије појединих гена и формирању минерализованог ткива, односно дентинског мостића (Shen et al., 2010). Како крв, плазма, екстраћелијска и тубуларна течност представљају непресушни биолошки извор фосфатних јона, те се отпуштање Ca^{2+} , SiO_4^{4-} , OH^- из материјала на бази калцијум-силиката на контакту са пулпним ткивом, сматра се окидачем за преципитацију калцијум-фосфата (апатита) на њиховој површини (Shen et al., 2010).

МТА и други материјали на бази калцијум-силиката показали су позитивне ефекте у смислу стимулације пролиферације матичних и стромалних ћелија пореклом из зубне пулпе у *in vitro* условима (Tecler et al., 2008; Paranjpe et al., 2010). Доказано је да МТА индукује експресију Runx2 гена, остеокалцина, алкалне фосфатазе и дентин сијалопротеина, као важних одонтобластних гена, односно гена одговорних за диференцијацију матичних ћелија зубне пулпе (Paranjpe et al., 2010).

Биоактивност МТА у истој студији потврђена је и кроз повећање у секрецији ангиогених фактора, као што је васкуларни ендотелијални фактор раста, веома значајан у процесу зарастања и регенерације (Paranjpe et al., 2010).

Истраживања показују да материјали на бази калцијум-силиката у *in vivo* условима на анималним моделима индукују стварање репараторног калцификованог ткива након директног прекривања (Pitt Ford et al., 1996; Damanaske et al., 2010), као и на хуманим зубима (Nair et al., 2008; Bogen et al., 2008; Accorinte et al., 2009). Поређењем ефеката GMТА са калцијум-хидроксидом као материјалима за директно прекривање зубне пулпе на анималном моделу мајмуна, доказно да GMТА узрокује блажи степен запаљења пулног ткива након пет месеци и формирање дебљег дентинског мостића, континуиране грађе (Pitt Ford et al., 1996). Слична студија потврдила је позитивне ефекте GMТА, док је само трећина узорака третираних калцијум-хидроксидом испољила формирање дентинског мостића са интензивним знацима запаљенског процеса (Faraco & Holland, 2001). Није уочена значајна разлика у ефектима WMТА и GMТА, односно сви узорци WMТА и већина узорака GMТА показали су комплетно формирање калцификованог мостића након две недеље са благом запаљенском реакцијом пулног ткива у непосредној околини испитиваног материјала (Parirokh et al., 2005). Блага запаљенска реакција пулног ткива као одговор на употребу материјала на бази калцијум-силиката регистрована је и у другим студијама (Andelin et al., 2003; Menezes et al., 2004).

На моделу 11 хуманих максиларних умњака доказано је да калцијум-хидроксид узрокује стварање дентинског моста дебљине 0,15 mm са знацима некрозе након 6 месеци, док је након истог периода посматрања дебљина дентинског мостића у случају узорака GMТА била 0,43 mm, без знакова запаљења (Aeinehchi et al., 2002). Друга студија која је обухватила већи број хуманих зуба (n= 48), није доказала присуство клинички нити радиолошки значајних разлика између WMТА и калцијум-хидоксида, као материјала који су коришћени за директно прекривање пулпе (Iwamoto et al., 2006). Међутим, обе клиничке студије упућују да се материјали на бази калцијум-силиката могу користити као замена за традиционалну терапију директног прекривања некаријесно експониране пулпе.

Слични резултати били су евидентирани и у студијама које су испитивале биоактивност хемијски модификованих материјала на бази калцијум-силиката као материјала за директно прекривање пулпе зуба (Yan et al., 2010; Tran et al., 2012; Shayegan et al., 2012; Nowicka et al., 2013; De Rossi et al., 2014). Доказано је да апликација Биодентина на експонирану пулпу мишјих зуба индукује диференцијацију одонтобласта и формирање дентину сличног ткива након 14 дана (Tran et al., 2012). Након 30 дана нису биле уочљиве хистопатолошке разлике у односу на узорке МТА (Tran et al., 2012). На моделу млечних зуба бодљикавог прасета доказано је да примена Биодентина као материјала за директно прекривање или апмпутацију пулпе, резултира формирањем комплетног дентинског мостића без знакова запаљења пулног ткива и без значајне разлике у односу на МТА након 90 дана (Shayegan et al., 2012). Формирање дебљег дентинског мостића по коришћењу Биодентина у односу на МТА приказано је у резултатима *De Rossi* и сар. на зубима паса (De Rossi et al., 2014).

Студије на хуманим зубима су доказале да не постоји значајна разлика у испољеним ефектима између Биодентина и МТА када се ови материјали користе за директно прекривање јатрогено експониране пулпе (Nowicka et al., 2013). Поред наведеног, *in vitro* студије су показале и да Биоагрегат има сличну способност да индукује диференцијацију хуманих матичних ћелија зубне пулпе у одонтобластима сличне ћелије, као и МТА (Yan et al., 2010; Yuan et al., 2010; Chang et al., 2014; Jung et al., 2015). Међутим, новији резултати упућују да је експресија гена који се доводе у везу са диференцијацијом хуманих матичних ћелија пореклом из зубне пулпе већа у узорцима Биоагрегата у односу на МТА (Zhang et al., 2013).

2. Циљеви истраживања

2. Циљеви истраживања

Основни циљ истраживања био је да се испитају биокompatibilност и биолошка својства новосинтетисаних наноматеријала на бази активних калцијум-силикатних система. У складу са основним циљем дефинисани су следећи задаци:

1. Извршити синтезу и карактеризацију наноматеријала за потенцијалну употребу у ендодонтској терапији младих сталних зуба,
2. Извршити анализу рН вредности и кинетике отпуштања јона (ICP-OES) из испитиваних материјала,
3. Испитати цитотоксичност наноматеријала на бази калцијум-силиката у *in vitro* условима применом директног, индиректног теста и теста пролиферације,
4. Испитати цитотоксичност наноматеријала на бази калцијум-силиката у *in vitro* условима применом директне методе,
5. На анималним моделу интрамишићним и интракоштаним имплантационим тестом испитати биокompatibilност наноматеријала на бази калцијум-силиката у *in vivo* условима,
6. Испитати биокompatibilност наноматеријала у *in vitro* условима након директног контакта са пулпним ткивом.

У оквиру анализе научне проблематике постављене су следеће хипотезе:

Експериментални наноматеријали на бази активних силикатних система поседују биокompatibilност и биоактивна својства која су компарабилна са материјалима сличног хемијског састава.

Новосинтетисани наноматеријали могу се безбедно и успешно применити у ендодонтској терапији младих сталних зуба.

3. Материјали и Методе

3. Материјали и методе

3.1. Синтеза и карактеризација испитиваних материјала

3.1.1. Синтеза испитиваних материјала

Испитивани материјали су синтетисани нанотехнологијом, односно иновативном комбинацијом хидротермалне сол-гел методе и методе самосагоревајућих таласа на Институту за нуклеарне науке- Винча, у лабораторији за радијациону физику и хемију.

Хидротермална сол-гел метода погодна је за добијање метал-оксидних стакала и керамике поступком хидролизе хемијских прекурсора у облику сола, а након тога формирањем гела који даљим сушењем (испаривањем) и пиролизом образује аморфни оксид, чији даљи третман условљава кристализацију. Основни сегменти сол-гел процеса су: парцијална хидролиза алкоксида метала која доводи до формирања реактивног мономера; поликондензација добијених мономера у облик колоидних олигомера (сол) и додатна хидролиза, како би се омогућила полимеризација и попречно повезивање (енгл. *cross-linking*), које води стварању тродимензионалне мреже (гел). Како процеси полимеризације и попречно повезивања напредују, вискозност сола постепено расте све до сол-гел тачке прелаза, где вискозност нагло расте и долази до стварања желатина.

У циљу добијања испитиваних материјала, прво су синтетисане њихове појединачне компоненте: калцијум-силикатне фазе $2\beta\text{-CaSiO}_4$ ($\beta\text{-C}_2\text{S}$) и Ca_3SiO_5 (C_3S), калцијум-карбонат (CaCO_3), као и моноклинични бизмут-оксид (Bi_2O_3), односно баријум-сулфат (BaSO_4), који су употребљени као рендген контрастна средства.

Калцијум-силикат је синтетисан коришћењем калцијумхлорид-пентахидрата ($\text{CaCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Merk, Немачка) и силика сола, добијеног помоћу хидротермалног поступка. У циљу постизања активне силикатне фазе, стехиометријске количине $\text{CaCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (35,59 g) и силика-сола (15 g 30% раствора) су коришћене у односу $\text{C}_3\text{S}:\text{C}_2\text{S}= 2:1$. Потом је количина од 4,55 g алуминијум-ацетата ($\text{Al}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_3$) додана мешавини да би се обезбедило настајање трикалцијум-алумината

($\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$), односно активне C_3A фазе у малим количинама. У мешавину је затим додано 71,3 g амонијум-нитрата (NH_4NO_3) као оксидационог агенса и 53,51 g лимунске киселине ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), која је служила као гориво у реакцији сагоревања. Након сушења на температури од 80°C ради добијања гела, сви узорци су излагани температури од 150°C како би се уклонио вишак воде. Током испаравања воде, гел је постајао све вискознији док на крају није постао веома вискозан. Пораст температуре до око 180°C узроковао је дехидратацију гела. Гел се постепено претварао у пену, да би на крају дошло до снажне само-распростируће реакције сагоревања уз ослобађање велике количине гасова. Након такве високо-температурне само-распростируће реакције, при којој је дошло до великог пораста температуре (реда стотина $^\circ\text{C}$), узорци су брзо хлађени помоћу бакарних плоча да би се кристализација калцијум-силикатних фаза свела на минимум и да би се обезбедила њихова висока реактивност.

Калцијумхлорид-тетрахидрат ($\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, *Sigma Aldriht*, САД) коришћен је као прекурсор у синтези калцијум-карбоната. Количина од 5 mmol $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворена је у 50 mmol етилен-гликола ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$, *Sigma Aldriht*) при дејству ултразвука на 40°C (*Elmasonic S3OH*). Потом је 10 mmol натријум-бикарбоната (NaHCO_3 , *Sigma Aldriht*) дисперговано у 50 ml етилен-гликола, кап по кап, током 30 min, уз механичко мешање. Добијена дисперзија је загревана 30 min на 40°C . Калцијум-карбонат је потом издвојен из мутног раствора центрифугирањем (9000 обртаја/минути, 30 min), па испран неколико пута у мешавини воде и етанола (1:4) и коначно само у води. У току ове реакције 0,5% сулфонил-додецил сулфат ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) је употребљен као антиагломерационо средство. Добијене наночестице су потом излагане дејству ултразвука 30 min, уз снажно механичко мешање током 5 h. Добијени прах је након сушења на 120°C током 5 h загреван на 500°C у времену од 1 h како би се добила калцијум-карбонатна фаза.

Моноклинични Bi_2O_3 је добијен термичким обрадом бизмут-нитрата ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, *Kemika*, Хрватска) на температури од 450°C током 20 h. Ова процедура је извршена у циљу постизања стабилне тетрагоналне Bi_2O_3 фазе, уз што је могуће веће засићење кисеоником. У току синтезе материјала, BaSO_4 је коришћен као готови производ (BaSO_4 , *Sigma Aldriht*, САД).

Коначно, мешањем CaCO_3 и V_2O_5 са калцијум-силикатном фазом у односу 2:2:1 добијен је материјал- минерални полиоксидни карбонатни агрегат, односно ALBO-MPCA₁. Мешањем CaCO_3 и BaSO_4 са калцијум-силикатном фазом у истом односу добијен је материјал- минерални полиоксидни карбонатни агрегат, односно ALBO-MPCA₂. Заменом калцијум-силикатне фазе (из друге смеше) Портланд цементом, који представља мешавину калцијум-силиката, алуминијум-ферита и калцијум-ферита, добијен је материјал- минерални полиоксидни карбонатни агрегат, односно GREY-MPCA.

Тако припремљене мешавине навлажене су водом у односу вода-прах 1:2 (m/m) и компримоване клипом од нерђајућег челика, уз минимални притисак неопходан за њено обликовање у дату ваљкасту форму. Смеше су остављене да се везују у полиетиленским бочицама у периоду 7 дана на температури од 37⁰С.

Као контролони материјал у експерименту је коришћен минерални триоксидни агрегат (MTA^+ , *Cerkamed*). Произвођач у безбедносном листу наводи да MTA^+ хемијски представља мешавину калцијум-хидроксида, оксида силицијума, гвожђа, алуминијума, натријума, калијума, бизмута и калцијум-фосфата. Припрема се мешањем MTA^+ праха и течности у односу: 0,14 g параха са 1-2 капљице течности (или дестиловане воде).

3.1.2. Карактеризација испитиваних материјала

Испитивање карактеристика појединих фаза и структура добијених материјала, укључујући и контролни материјал коришћен у експериментима, реализовано је применом: Фуријеове трансформационе инфрацрвене спектроскопије (енгл. *Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR, *Nicollet 380 FTIR*, *Thermo Electron Corporation*, *Valtham*, МА, САД) у пригушеној тоталној рефлексiji (енгл. *Attenuated total reflection*, ATR); методом рендгенске дифракције (енгл. *X-ray diffraction*, XRD, *Philips PW 1050*, Ајдховен, Холандија) и скенирајућом електронском микроскопијом (енгл. *Scanning electron microscopy*, SEM, *JSM-5300*, *Jeol*, Јапан) у комбинацији са енергетско дисперзивном спектроскопијом (енгл. *Energy disperse spectroscopy*, EDS, *JSM-5300*, *Jeol*, Јапан).

Структура синтетисаних материјала испитана је уз помоћ Фуријеове трансформационе инфрацрвене спектроскопије у пригушеној тоталној рефлексији која представља најчешће коришћену инструменталну методу за одређивање функционалних група присутних на површини активних угљева. FTIR спектар је сниман у спектралном опсегу од 4000-400 cm^{-1} .

Метода рендгенске дифракције представља аналитичку методу која је коришћена за одређивање хемијског састава и анализу кристалитета испитиваних материјала пре и након хидратације. Подаци су анализирани у опсегу 2θ од 9 до 67° са кораком скенирања од 5° и временом експозиције од 2 sec. по кораку. Величина кристалита је израчуната помоћу Шерерове једначине:

$$d = \frac{K\lambda}{B\cos\theta}$$

где је: d - просечан пречник кристалита (nm), K - фактор облика, B - ширина дифракције на половини њене максималне висине, λ - таласна дужина коришћених рентгенских зрака, θ - Bragg-ов угао дифракције.

Скенирајућа електронска микроскопија коришћена је да би се испитала морфологија и микроструктура свих узорка. Пре анализе, узорци су сушени на 110°C , а затим је на површину узорака напарен танак слој злата. Припремљени узорци су пренешени у комору инструмента и посматрани при напону од 30 kV. Енергетско дисперзивном анализом извршена је хемијска карактеризација испитиваних материјала. Сама техника заснива се на интеракцији ексцитираних X-зрака и испитиваног узорка, односно чињеници да сваки елемент има јединствену атомску структуру која омогућава јединствен скуп пикова при емисији X-зрака.

3.2. Анализа рН вредности испитиваних материјала

Анализа рН вредности испитиваних материјала реализована је на Хемијском факултету, Универзитета у Београду.

Одређиване су рН вредности свежих суспензија (50 mg/mL) и екстраката 24-часовно везаних узорака испитиваних материјала. Свеже замешани материјали су пласирани у пластичне модле пречника 5 mm и дубине 5 mm, да би након потпуног везивања били потопљени у 20 mL раствора дејонизоване воде. Мерења рН вредности суспензија испитиваних материјала (50 mg/ml) спроведено је након 1 min, 15 min, 1 h, 3 h и 24 h, односно екстраката везаних материјала након 24 h, 7 и 21 дана, коришћењем рН-метра (*pH-vision Microcomputer 6071, JENCO Electronics Ltd., Linkou Shiang*, Тајван) у комбинацији са 1131 НИ електродом (*Hanna Instruments WTW GmbH, Woonsockets*, САД). Калибрација рН-метра извршена је помоћу раствора калијумхидроген-фосфата (рН=4.01) и фосфатног пуфера (рН=7.00) (*Carlo Erba Reagents SpA, Rodano*, Италија). Испитивани раствори су промућкани 30 min на вибратору, па потом центрифугирани 15 min на 4000 обртаја/минути. Мерења рН вредности за сваки узорак су поновљена три пута.

3.3. Анализа кинетике ослобађања јона из испитиваних материјала (ICP-OES)

Испитивање јонског састава екстраката испитиваних материјала реализовано је на Хемијском факултету, Универзитета у Београду.

Свеже припремљени материјали су пласирани у пластичне модле пречника 5 mm и дубине 5 mm, након чега су инкубирани 24 h на 37°C до потпуног везивања. Узорци су потом потопљени у 20 mL раствора дејонизоване воде. Испитивање јонског састава екстраката везаних материјала обављено је помоћу индуктивно спрегнуте плазма - оптичке емисионе спектрометрије (ICP-OES). Коришћен је спектометар (*Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP, Thermo Fisher Scientific*, Кембриџ, Велика Британија) који је оспособљен са RACID86 детектором (енгл. *Charge injector device detector*), концентричним PTFE небулизатором,

кварцном лампом и алумина ињектором. ICP-OES мерења за сваки узорак су поновљена три пута.

Квантификација јонског састава испитиваних раствора извршена је на адекватној таласној дужини светлосне емисије (Ca= 315.887 nm, Si= 212.412 nm, Fe= 259.837 nm, Mg= 285.213 nm, Al= 394.401 nm, P= 178.766 nm, Bi= 223.061 nm, Ba= 455.403 nm и Cu= 324.754 nm).

Као контролна коришћен је раствор дејонизоване воде.

3.4. Испитивање цитотоксичности наноматеријала на бази калцијум-силиката у *in vitro* условима применом индиректног теста

Испитивање цитотоксичности материјала применом индиректног теста реализовано је на Војномедицинској академији у Београду. Испитивање је спроведено у складу са препорукама међународног ISO стандарда (ISO 10993-5:2009, Part 5: *Test for cytotoxicity: in vitro method*).

3.4.1. Испитивани материјали

Испитивани материјали били су наноматеријали на бази калцијум-силиката: ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂ и GRAY-MPCA. Као контролни материјал коришћен је минерални триоксидни агрегат (MTA⁺, *Cerkamed*). Тестирана је цитотоксичност свежих раствора материјала, као и цитотоксичност екстраката везаних материјала.

3.4.2. Припрема свежих раствора материјала

Свежи раствори материјала припремани су растварањем праха у RPMI медијуму (*Sigma*, Минхен, Немачка) у затвореним плочама за култивисање у атмосфери са 5% CO₂ на 37⁰C током 24 h. Цитотоксичност свежих раствора материјала тестирана је у четири опадајуће концентрације: 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL и 12,5 mg/mL (1:1, 1:2, 1:4, 1:8). Пре испитивања цитотоксичности, свежи раствори материјала су центрифугирани 15 min на 3000 обртаја/минути и стерилисани

филтрирањем кроз 0,22 μm филтере (*MILLEX GP Filter Unit, Corrihwahill, Cork*, Ирска).

3.4.3. Припрема екстракта везаних материјала

Испитивани материјали замешани су са дестилованом водом у односу 2:1 (m/m). Паковање праха (0,14 g) контроног материјала (MTA⁺, *Cerkamed*) замешано је са 2 капљице MTA⁺ течности, према упутству произвођача. Свеже припремљени материјали су пласирани у пластичне модле пречника 5 mm и дубине 5 mm. Укупна запремина и површина ваљака износила је $V = 98,125 \text{ mm}^3$, односно $P = 109,9 \text{ mm}^2$, а просечна маса $m = 246,6 \text{ g}$. За сваки испитивани материјал направљено је по 4 узорача, након чега су узорци инкубирани 24 h на 37⁰C до потпуног везивања материјала. Узорци материјала су потом стерилисани UV светлошћу током 120 min са свих страна, а затим постављени у плоче за култивисање са 24 бунара. Однос масе узорка према запремини медијума износио је 100 mg/mL, а однос површине узорка и запремине медијума био је приближно 43,96 mm²/mL. Узорци су затим инкубирани у затвореним плочама за култивисање у атмосфери са 5% CO₂ на 37⁰C током 21 дана. Тестирана је цитотоксичност неразблажених (100%) и разблажених (50%) раствора материјала после 24 h, 7 и 21 дана екстракције. Пре тестирања екстракти су центрифугирани 15 min на 3000 обртаја/минути и стерилисани филтрирањем кроз 0,22 μm филтере (*MILLEX GP Filter Unit, Corrihwahill*).

3.4.4. Ђелијска култура

У испитивањима индиректне цитотоксичности коришћене су културе мишјих фибробласта L929. Ђелије су гајене у хранљивом медијуму RPMI (*Sigma*, Минхен, Немачка). Ђелијске културе су инкубирани при температури од 37⁰C, у атмосфери ваздуха са 5% CO₂ (*MRC Scientific instruments, Holon*, Израел) до формирања једнослојне културе, што је потврђено светлосним микроскопом (*Boeko*, Немачка). Ђелије су потом испране физиолошким раствором, одвојене од подлоге 0,25% трипсином, центрифугирани и ресуспендовани у хранљивом медијуму.

Вијабилност ћелија је проверена бојењем 0,4% трипан плавим раствором, након чега је одређен укупан број ћелија помоћу хемоцитометра (Bright-Line Hemacytometer; Hausser Scientific, Horsham, PA, САД). Број ћелија засејаних у микротитар плоче са 24 и 96 базена износио је $0,5 \times 10^4$ и 1×10^4 , ретроспективно.

3.4.5. Тест цитотоксичности

МТТ (3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолиум-бромид) тест заснива се на редукацији тетразолијумске соли МТТ дехидрогеназама ћелијских митохондрија. Реакција подразумева цепања тетразолијумског прстена и појаву формазана, који поседује карактеристичну црвено-љубичасту боју. МТТ се могу да редукују само активне митохондрије живих ћелија, те је овај колориметријски тест погодан за мерење њихове метаболичке активности.

Након 24 h од засејавања, из бунара плоча за култивисање ћелија су аспирирањем уклоњени медијуми и додани свежи раствори материјала укупне запремине од 100 μL ; 100 μL екстракта везаних материјала и 100 μL свежег медијума (50%); односно 200 μL екстракта везаних материјала (100%). Плоче са 24 и 96 бунара су након тога инкубирани 24 h при температури од 37°C , у атмосфери ваздуха са 5% CO_2 . Потом је у базене микротитарских плоча додано по 10 μL МТТ раствора, концентрације 5 mg/ml у фосфатном пуферу. Плоче са 24 и 96 бунара су затим инкубирани под истим условима у трајању од 4 h, након чега је у базене додано 100 μL 10% натријумдодецил-сулфата (SDS) у 0,01 M HCl. Након 24 h, оптичка густина (OD) добијених производа квантификована је спектрофотометријски на ELISA читачу (DV990/BV6, Рим, Италија) на таласној дужини од 570 nm. Процент метаболичке активности (% M) у односу на контролне ћелије израчунат је на основу формуле:

$$\% M = \frac{\text{OD ћелија култивисаних са узорцима} - \text{OD узорка без ћелија}}{\text{OD ћелија култивисаних без узорака} - \text{OD контролног медијума}} \times 100$$

3.5. Испитивање цитотоксичности наноматеријала на бази калцијум-силиката у *in vitro* условима применом директног теста

Испитивање цитотоксичности материјала применом директног теста реализовано је на Војномедицинској академији у Београду. Испитивање је спроведено у складу са препорукама међународног ISO стандарда (ISO 10993-5:2009, Part 5: *Test for cytotoxicity: in vitro method*).

3.5.1. Ћелијска култура

У испитивањима директне цитотоксичности коришћене су културе мишијих фибробласта L929. Ћелије су гајене у хранљивом медијуму RPMI (*Sigma*). Ћелијске културе су инкубирани при температури од 37⁰С, у атмосфери ваздуха са 5% CO₂ (*MRC Scientific instruments, Holon, Израел*) до формирања једнослојне културе, што је потврђено светлосним микроскопом (*Boeko, Немачка*). Ћелије су потом испране физиолошким раствором, одвојене од подлоге 0,25% трипсином, центрифугиране и ресуспендоване у хранљивом медијуму. Вијабилност ћелија је проверена бојењем 0,4% трипан плавим раствором, након чега је одређен укупан број ћелија помоћу хемцитометра (*Bright-Line Hemacytometer; Hausser Scientific, Horsham, PA, САД*). Број ћелија код испитивања директне цитотоксичности износио је 1×10^4 по базену (микротитар са 96 базена).

3.5.2. Тест цитотоксичности

Ћелијска вијабилност може се проценити на основу активности цитосолног ензима лактат дехидрогеназе (LDH), који се ослобађа из цитосола у медијум након губитка интегритета ћелијске мембране. Активност LDH у медијуму за култивацију директно је пропорционална броју ћелија са оштећеном мембраном у култури и зато се може сматрати мером цитотоксичности агенса, који је иста оштећења и узроковао.

LDH тест се заснива на две оксидоредукционе реакције. Прва оксидоредукциона реакција подразумева оксидацију лактата у пируват, при чему

се NAD^+ редукује у $\text{NADH} + \text{H}^+$. У другој оксидоредукционој реакцији фензин метосулфат посредује у реоксидацији $\text{NADH} + \text{H}^+$ у NAD^+ , при чему долази до редукације тетразолијум-хлорида у формазан, једињење карактеристичне црвено-љубичасте боје.

За одређивање директне цитотоксичности, у микроплоче са 96 базена наношен је оптималан број ћелија мишијих фибробласта L929 суспендованих у хранљивом медијуму. У овако припремљене плоче директно је додано по 100 μL екстракта везаних материјала (неразблажених и 50% разблажених екстраката након 24 h, 7 дана и 21 дана). Плоче са ћелијама су даље инкубиране 24 h, у инкубатору на 37°C у средини обогаченој са 5% CO_2 . Након периода инкубације, додано је 10 μL LDH супстрата на 100 μL супернатанта. Нетретиране ћелије коришћене су као негативна контрола, док су позитивну контролу чиниле 100% мртве ћелије. Третиране ћелије лизирани су нејонским детерџентом Triton X-100 (3%), који условљава максимално ослобађање цитосолне LDH услед потпуног нарушавања интегритета ћелијске мембране. Количина ослобођене утврђена је помоћу комерцијалног ADVIA 1800 система (*ADVIA 1800, Clinical Chemistry System, Siemens*).

Резултати су представљени у апсолутним вредностима LDH (IU/L), као и у процентима цитотоксичности у односу на ћелије лизирани коришћењем Triton X-100, коришћењем следеће формуле:

$$\% C = \frac{E - S}{M - S} \times 100$$

где је: C - цитотоксичност, E - апсорбанца третираних ћелија, S - апсорбанца контролних (нетретираних) ћелија, M - апсорбанца ћелија третираних Triton X-100.

3.6. Испитивање цитотоксичности наноматеријала на бази калцијум-силиката у *in vitro* условима применом теста пролиферације

Испитивање цитотоксичности материјала применом теста пролиферације реализовано је на Војномедицинској академији у Београду. Испитивање је спроведено у складу са препорукама међународног ISO стандарда (ISO 10993-5:2009, Part 5: *Test for cytotoxicity: in vitro method*).

3.6.1. Ћелијска култура

У испитивањима цитотоксичности коришћене су културе мишјих фибробласта L929. Ћелије су гајене у хранљивом медијуму RPMI (*Sigma*). Ћелијске културе су инкубирание при температури од 37°C, у атмосфери ваздуха са 5% CO₂ (MRC Scientific instruments, Holon, Израел) до формирања једнослојне културе, што је потврђено светлосним микроскопом (Воeko, Немачка). Ћелије су потом испране физиолошким раствором, одвојене од подлоге 0,25% трипсином, центрифугиране и ресуспендоване у хранљивом медијуму. Вијабилност ћелија је проверена бојењем 0,4% трипан плавим раствором, након чега је одређен укупан број ћелија помоћу хемоцитометра (Bright-Line Hemacytometer; Hausser Scientific, Horsham, PA, САД). Број ћелија засејаних у микротитар плоче са 96 базена износио је 1×10^4 .

3.6.2. Тест цитотоксичности

Степен пролиферације ћелија, односно синтезе ДНК, процењена је на основу обележавања ћелија радиоактивним изотопом ³H-тимидином. Након засејавања ћелија L929 фибробласта у 100 µl у хранљивог медијума RPMI (*Sigma*), плоче са 96 базена су инкубирание 24 h на 37°C, у атмосфери ваздуха са 5% CO₂. Након 24 h инкубације, медијум је замењен са 20 µl медијума који је садржао 0,25 µCi ³H-тимидина (*Amershan Pharmacia Biotech do Brazil Ltda.*, Сао Пауло, Бразил). Додатних 50 µL неразблажених и 50% разблажених екстраката материјала (након 24 h, 7 дана и 21 дана) и 50 µL свежег медијума постављено је у сваки базенчић, а

плоче су затим инкубирани на 37⁰С, у атмосфери ваздуха са 5% CO₂. Инкорпорирање изотопа у ДНК мерена је након 24 h инкубације, тако што су ћелије скупљене на дискове од филтер-папира, узорци осушени преко ноћи на 40⁰С, пренети у судове са по 5 mL сцинтилационе течности и анализирани на сцинтилационом бета бројачу (*LKB-1219 Rackbeta*, Финска). Радиоактивност узорака је изражена као DPM (енгл. *desintegration per minute*, дезинтеграција по минути) која је пропорционална количини ³Н-тимидина уграђеног у ДНК ћелија у култури. Степен пролиферације ћелија израчунат је на основу формуле:

$$\% P = \frac{DPM \text{ узорак}}{DPM \text{ контролни медијум}} \times 100$$

3.7. Испитивање цитотоксичности наноматеријала на бази калцијум-силиката у *in vitro* условима применом директне методе

Испитивање цитотоксичности материјала применом директне методе реализовано је на Стоматолошком факултету у Београду. Испитивање је спроведено у складу са препорукама међународног ISO стандарда (ISO 10993-5:2009, Part 5: *Test for cytotoxicity: in vitro method*).

3.7.1. Ћелијска култура

У испитивањима цитотоксичности применом директне методе коришћене су културе матичних ћелија изолованих из ткива апикалне папиле зуба са незавршеним растом корена (енгл. *Stem cells from the apical papilla - SCAP*). Методом проточне цитометрије, односно експресијом маркера: CD 34, CD 73, CD 90 као позитивних и CD 45, CD 105 као негативних, потврђена је матичност ћелија. Ћелије су гајене у хранљивом медијуму (DMEM/F12) обогаћеног 10% раствором феталног говеђег серума, пеницилина (100 IU/ml) и стрептомицина (100 µg/mL). Инкубација ћелијских култура спроведена је на 37⁰С, у атмосфери ваздуха са 5% CO₂ до формирања монослојне конфлуентне културе, што је потврђено светлосним микроскопом (*Boeco*, Немачка). Укупан број ћелија засејан

по бунару микротар плоче био је 2×10^4 (*Bright-Line Hemacytometer; Hausser Scientific, Horsham, PA, САД*).

3.7.2. Припрема узорака свежих материјала

Испитивани материјали замешани су са дестилованом водом у односу 2:1 (m/m). Као контроли материјал у овом делу истраживања коришћени су минерални триоксидни агрегат (MTA⁺, *Cerkamed*), као и паста на бази калцијум-хидоксида (*UltraCal XS, Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, САД*). Свеже припремљени материјали су пласирани у пластичне модле пречника 6 mm и дубине 2 mm, а након 15 min од њихове припреме су коришћени у експерименту.

3.7.3. Тест цитотоксичности

У испитивању цитотоксичности применом директне методе коришћено је бојење неутрално црвеном (енгл. *Neutral red, NR*), које се заснива на инкорпорацији ове боје у виталним ћелијама, односно њиховим лизозомима.

За сваки испитивани материјал направљено је по четири узорака, а по један узорак је пласиран директно на средину дна бунара микротитар плоче са 24 места. Потом је у бунаре додано 0,3 mL хранљивог медијум DMEM који је био обогаћен 10% раствором феталног говеђег серума, пеницилина (100 IU/ml) и стрептомицина (100 µg/mL), а затим су засејане ћелије. Време експозиције износило је 48 h и 7 дана у инкубатору на 37⁰C у средини обогаћеној са 5% CO₂. Као негативна контрола коришћена је ћелијска култура са хранљивом подлогом без материјала. Након периода инкубације, у бунаре је додано 1 mL NR раствора. Након инкубације од 2 h, уклоњен је NR раствор, ћелије су испране у PBS, а потом је додано 1,5 mL NR растварача. Након прикупљања узорака, исти су центрифугирани 20 min на 250 rpm, а количина везане боје у 100 µL супернатанта квантификована је спектрофотометријски (OD) на ELISA читачу (*Labsystems Multiskan PLUS*, Финска) на таласној дужини од 450 nm. Истовремено је вршена квалитативна анализа ћелијских култура инвертним микроскопом (*Boeco model BIB-100, Boeckel GmbH, Хамбург, Немачка*) у смислу: промена у генералној

морфологији ћелија, вакуолизацији, одлепљивању, ћелијској лизи. Релативна вијалбилност ћелија израчуната је на основу формуле:

$$\% V = \frac{OD \text{ узорак}}{OD \text{ контролни медијум}} \times 100$$

3.8. Испитивање биокомпатибилности наноматеријала на бази калцијум-силиката у *in vivo* условима – интрамишићни тест

3.8.1. Субјекти

Експеримент је одобрен од стране Етичког одбора за рад са експерименталним животињама Стоматолошког факултета у Београду (бр. 36/7 од 20.02.2013. године) и спроведен је у сагласности са принципима Водича Националног института за здравље, бригу и коришћење лабораторијских животиња, као и према међународним стандардима ISO 10993-2: 2006 *Animal welfare requirements*. Анимални модел у овом експерименталном делу истраживања били су заморци, и то осамнаест животиња оба пола (9 мушког и 9 женског), старости око четири месеца и телесне тежине око 1,5 kg. Животиње су биле одгајене у професионалној одгајивачници Института за вирусологију, вакцине и серуме - Торлак, Београд, Србија. Животње су биле смештене у простору за експерименталне животиње Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду, свака у посебном кавезу, у контролисаној средини са контролисаном исхраном и дневном професионалном негом.

3.8.2. Испитивани материјали

Испитивани материјали били су наноматеријали на бази калцијум-силиката: ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂ и GRAY-MPCA. Као контролни материјал коришћен је минерални триоксидни агрегат (MTA⁺, *Cerkamed*). Материјали су припремани према упутствима произвођача.

3.8.3. Анестезија

У циљу реализације експеримента, односно хируршке процедуре, спроведена је општа дисоцијативна анестезија. Премедикација је изведена интрамускуларном ињекцијом Ксилазина (2% *Xylazin*, *Cp pharma, Bergdorf*, Немачка), у дози 5 mg/kg телесне тежине. Средство које је коришћено као општи анестетик била је интрамускуларна ињекција у комбинацији Кетамина (*Ketamin 500 mg/mL, Laboratorio Sanderso SA*, Сантијаго, Чиле) у дози од 40 mg/kg телесне тежине и Ацепромазина (*Acepromazine 50 mL, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., St. Joseph, Mo 64506*, САД) у дози од 0,75 mg/kg телесне тежине. Дужина трајања опште дисоцијативне анестезије била је просечно око 60 min.

3.8.4. Рандомизација

Рандомизација испитиваних материјала извршена је тако што су материјали постављани ротационом техником у смеру казаљке на сату (Табела 3), по модификованом Латин блок дизајну (Wilk, 1955).

3.8.5. Хируршка процедура

Хируршка процедура је спроведена под асептичним условима и у складу са међународним стандардима (ISO 10993-6: 2007, Part 6: *Tests for local effects after implantation*).

Материјали су након мешања пласирани у стерилне тефлонске тубице дужине 10 mm, унутрашњег промера 1 mm, при чему је један крај тефлонске тубице остао празан. После увођења експерименталних животиња у општу анестезију, површина коже на леђима експерименталних животиња је била обријана и дезинфикована 10% раствором повидон јодида. Хируршким резом направљена је инцизија коже и поткожног ткива дужине 2,5 cm, а затим су оштром дисекцијом фасције *m. longissimus*-а формирана четири цепа лево и десно од кичменог стуба, у које су стерилним пинцетама пласиране тефлонске тубице (Слика 3). Празан крај тефлонских тубица (негативна контрола) био је увек окренут ка репу експерименталне животиње. По постављању тефлонских

тубица у мишићно ткиво оперативна регија је ушивена појединачним шавовима са ресорптивним концем (*Sof silkTM 4-0*, *Syneture^R*, Енглеска). Кожа је потом поново враћена на место како би прекрила експерименталну површину и ушивена сатурама хоризонталним мадрац шавом (*Sof silkTM 4-0*, *Syneture^R*, Енглеска).

Постоперативно животиње су примиле аналгетик (Буторфанол, Галеника А.Д., Београд, Србија) у дози од 0,5 mg/kg телесне тежине као субкутану ињекцију сваких осам сати (3 дана). Животиње су биле смештене у појединачним кавезима до краја експеримента. Период оцењивања трајао је 15, 30 и 60 дана.

Табела 3. Дистрибуција тестираних материјала према рандомизационој шеми (интрамишићни имплантат)

Животиња	I	II	III	IV
1	A	B	C	D
2	B	C	D	A
3	C	D	A	B
4	D	A	B	C
5	A	B	C	D
6	B	C	D	A
7	C	D	A	B
8	D	A	B	C
9	A	B	C	D
10	B	C	D	A
11	C	D	A	B
12	D	A	B	C
13	A	B	C	D
14	B	C	D	A
15	C	D	A	B
16	D	A	B	C
17	A	B	C	D
18	B	C	D	A

A – ALBO-MPCA₁, B – ALBO-MPCA₂,

C – GREY-MPCA, D – MTA⁺

3.8.6. Препарација ткива и хистолошко оцењивање

Експерименталне животиње су након 15, 30 и 60 дана жртвоване интракардијалном ињекцијом натријум пентобарбитола (*Pentobarbital sodium salt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Немачка*) у концентрацији 140 mg/kg, и то по шест насумично изабраних животиња. Узорци ткива су фиксирани у кружном ткивном процесору (*Leica TP 1020, Немачка*), калупљени у парафинске блокове, а затим су сечени серијски ткивни пресеци (са сваког узорка по осам) дебљине 5 μm . Препарати су бојени хематоксилин-еозин (HE) бојењем, и анализирани оптичком микроскопијом (*Olympus 5, MarTek, САД*), на увељачањима $\times 4$, $\times 16$, $\times 20$ и $\times 40$. Хистоморфометријски параметри су оцењивани на основу модификованих критеријума *Panzarini* и сарадника (*Panzarini et al., 2007*):

➤ **Интезитет запаљенске реакције**

Оцена 0 - одсуство ћелија запаљења, *Оцена 1* - мање од 25 ћелија запаљења (благо), *Оцена 2* - од 26-50 ћелија запаљења (умерено), *Оцена 3* - од 51 до 75 ћелија запаљења (интензивно), *Оцена 4* - више од 75 ћелија запаљења (формирање апсцеса);

➤ **Екстензија запаљенске реакције**

Оцена 0 - одсуство ћелија запаљења, *Оцена 1* - ћелије запаљења само уз новостворено калцификовано ткиво или материјал, *Оцена 2* - ћелије присутне дубље у ткиву, *Оцена 3* - ткиво у потпуности инфилтрирано ћелијама запаљења или некротично ткиво;

➤ **Генерално стање ткива**

Оцена 0 - нема запаљенске реакције, *Оцена 1* - присутна запаљенска реакција, *Оцена 2* - присуство апсцеса, *Оцена 3* - присуство некрозе;

➤ **Циновске ћелије**

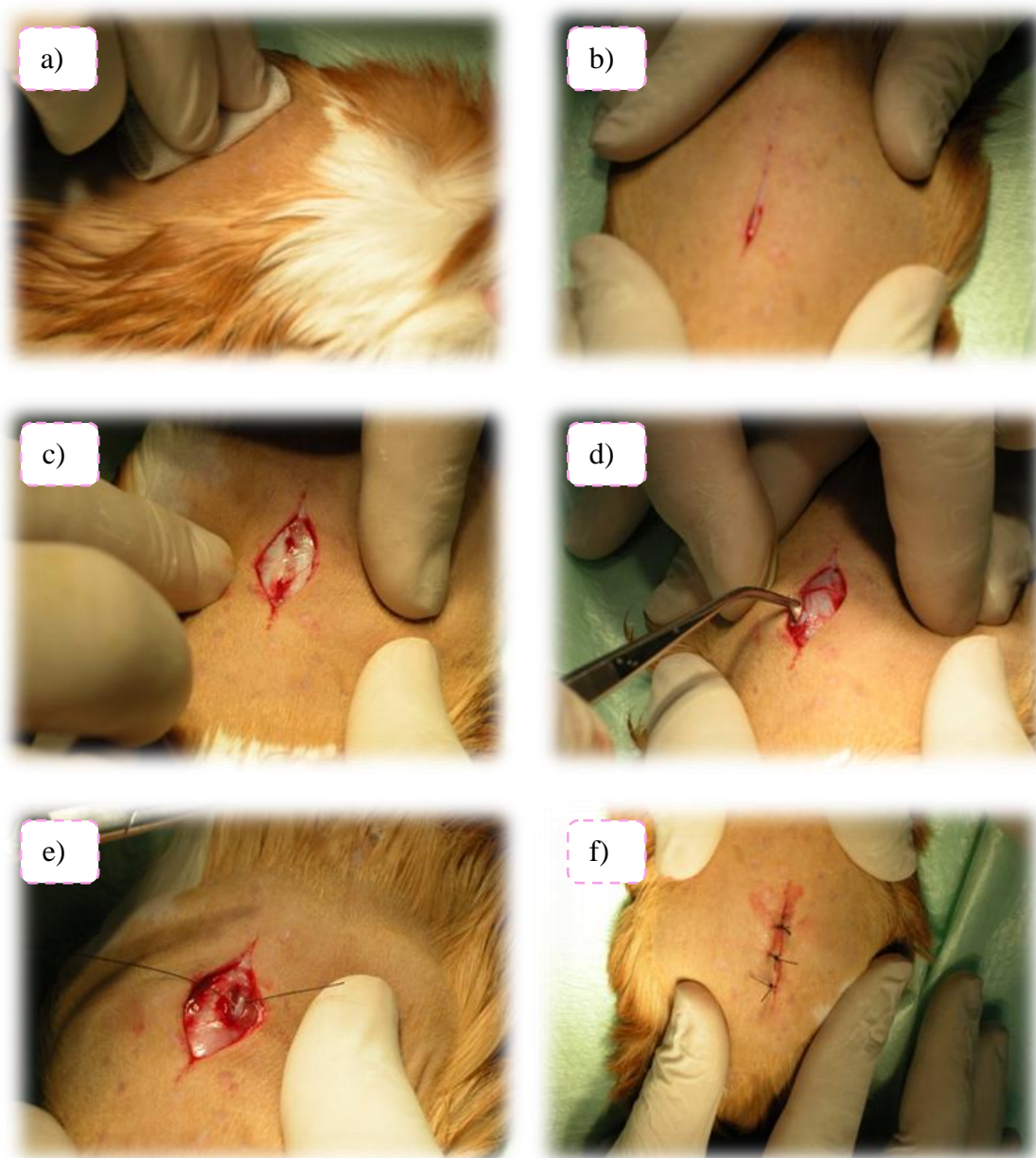
Оцена 0 - одсутне, *Оцена 1* - присутне;

➤ **Честице материјала**

Оцена 0 - одсутне, *Оцена 1* - присутне у малој количини, *Оцена 2* - присутне у умереној количини, *Оцена 3* - присутне у великој количини;

➤ **Микроорганизми**

Оцена 0 - одсутни и *оцена 1* - присутни.



Слика 3. Хируршка процедура интрамишићне имплементације испитиваних материјала: а) примпрема оперативног подручја, б) инцизија коже и поткожног ткива, с) дисекција фасције *m. longissimus*-а, д) постављање тefлонских тубица, е) ушивање регије мишића у коју је пласирана тefлонска тубица, ф) ушивање коже појединачним шавовима са ресорптивним концем.

3.9. Испитивање биокомпатибилности наноматеријала на бази калцијум-силиката у *in vivo* условима - интракоштана имплантација

3.9.1. Субјекти

Експеримент је одобрен од стране Етичког комитета за рад са експерименталним животињама Стоматолошког факултета у Београду (бр. 36/7 од 20.02.2013. године) и спроведен је у сагласности са принципима Водича Националног института за здравље, бригу и коришћење лабораторијских животиња, као и према међународним стандардима ISO 10993-2: 2006 *Animal welfare requirements*. Анимални модел у овом експерименталном делу истраживања били су новозеландски бели кунџи, и то дванаест животиња оба пола (шест мушког и шест женског), старости око четири месеца, телесне тежине око 3 kg. Животње су биле смештене у простору за експерименталне животиње Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду, свака у посебном кавезу, у контролисаној средини, са контролисаном исхраном и дневном професионалном негом.

3.9.2. Испитивани материјали

Испитивани материјали били су наноматеријали на бази калцијум-силиката: ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂ и GRAY-MPCA. Као контролни материјал је коришћен минерални триоксидни агрегат (MTA⁺, *Cerkamed*). Материјали су припремани према упутствима произвођача.

3.9.3. Анестезија

У циљу реализације експеримента, односно хируршке процедуре, спроведена је општа дисоцијативна анестезија. Премедикације је изведена интрамускуларном ињекцијом Ксилазина (2% *Xylazin*, *Cp pharma*, *Bergdorf*, Немачка), у дози 5 mg/kg телесне тежине. Средство које је коришћено као општи анестетик била је интрамускуларна ињекција у комбинацији Кетамина (*Ketamin* 500 mg/mL, *Laboratorio Sanderso SA*, Сантијаго, Чиле) у дози од 40 mg/kg телесне тежине и

Ацепромазина (*Acepromazine* 50 mL, *Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., St. Joseph, Mo 64506, САД*) у дози од 0,75 mg/kg телесне тежине. Дужина трајања анестезије била је просечно око 30 min.

3.9.4. Рандомизација

Рандомизациона шема подразумевала је употребу модификованог Латин блок дизајна (Табела 4), односно ротационо пласирање материјала у формиране коштане дефекте чиме се балансирано дистрибуира сваки материјал и у антериорну и у постериорну регију калварије (Wilk, 1955).

Табела 4. Дистрибуција тестираних материјала према рандомизационој шеми (интракоштани имплантат)

<i>Животиња</i>	I	II	III	IV
1	A	B	C	D
2	B	C	D	A
3	C	D	E	B
4	D	A	B	C
5	A	B	C	D
6	E	C	D	A
7	C	D	A	B
8	D	A	B	C
9	A	B	E	D
10	B	C	D	A
11	C	D	A	B
12	E	A	B	C

A – ALBO-MPCA₁, B – ALBO-MPCA₂,

C – GREY-MPCA, D – MTA⁺, E – празан простор

3.9.5. Хируршка процедура

Хируршка процедура је спроведена под асептичним условима и у складу са међународним стандардима (ISO 10993-6: 2007, Part 6: *Tests for local effects after implantation*).

Кожа главе кунића обријана је и дезинфикована раствором повидон јодида. Потом је изведена средишња инцизија која се протезала од паријеталне (*Os parietale-Sutura coronalis*) до чеоне кости (*Os frontale-Incisura supraorbitalis caudalis*). *Musculus frontoscutularis* и *musculus frontalis* препарисани су до периоста паријеталне и чеоне кости, а затим је перист пажљиво одигнут (Слика 4). Са обе стране калварије по два дефекта, величине 6,0 mm у пречнику и дебљине 2 mm, направљена су помоћу трепан борера (*AC Dental Implant system* 6,0 mm трепан борер, укупна дужина 32 mm, дужина сечивног дела 15,8 mm, унутрашњи дијаметар 6 mm, спољашњи дијаметар 6,95 mm, титанијум легура), под константним испирањем физиолошким раствором (*Natrii chloridi infundibile*, раствор за инфузију, Здравље А.Д., Лесковац, Србија).

Оштрим екскаватором уклоњено је коштано ткиво начињено препаратацијом трепан борером. Рандомизација тестираних материјала извршена је тако што су материјали постављани ротационом техником, у смери казаљке на сату, по модификованом Латин блок дизајну. Кожа је потом поново враћена на место како би прекрила експерименталну површину и ушивена сутурама хоризонталним мадрац шавом (*Sof silkTM 4-0, Syneture^R*, Енглеска).

Постоперативно животиње су примиле аналетике (Буторфанол, Галеника А.Д., Београд, Србија) у дози од 0,1 mg/kg телесне тежине као субкутану ињекцију сваких осам сати наредна три дана. Животиње су биле смештене у појединачним кавезима до краја експеримента.

3.9.6. Препарација ткива и хистолошко оцењивање

Експерименталне животиње су после периода оцењивања од 30 и 90 дана жртвоване интравенском ињекцијом натријум пентобарбитола (*Pentobarbital sodium salt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*, Немачка) у концентрацији 140 mg/kg, и то по шест насумично изабраних животиња.

Сви узорци су декалцинисани у раствору за декалцинацију: 8% HCl из 37% (v/v) концентрата и 10% HCOOH из 89% (v/v) концентрата у PBS-у током 24 h на 37°C. Након декалцинације узорци су фиксирани у кружном ткивном процесору (*Leica TP 1020*, Немачка), а потом калуљени у парафинске блокове. Из

парафинских калуца сечени су серијски ткивни пресеци (са сваког узорка по осам) дебљине 5 μm .

Препарати су стандардно бојени хематоксилин-еозин (HE) бојењем и специјалним *Masson-trichrom* бојењем. Микроскопски препарати су анализирани оптичком микроскопијом (*Olympus 5, MarTek*), на увељачањима x4, x16, x20 и x40. Истраживач који је хистолошки анализирао узорке није био упознат ком материјалу припада испитивани узорак. Поред хистоморфометријских параметра који су оцењивани на начин као што је описано у поглављу 3.8.6., истовремено су анализиране карактеристике новоформираног коштаног ткива на основу модификованих критеријума *Pinheiro* и сарадника (*Pinheiro et al., 2011*):

➤ **Новоформирано коштано ткиво - континуитет**

Оцена 0 - одсуство новоформираног калцификованог ткива,

Оцена 1 - минимална количина новоформираног калцификованог ткива,

Оцена 2 - минимални дисконтинуитети новоформираног калцификованог ткива,

Оцена 3 - континуирано новоформирано калцификовано ткиво;

➤ **Морфологија новоформираног коштаног ткива**

Оцена 0 - одсуство калцификованог ткива,

Оцена 1 - танак слој калцификованог ткива,

Оцена 2 - ирегуларно калцификовано ткиво,

Оцена 3 - калцификовано ткиво регуларне грађе

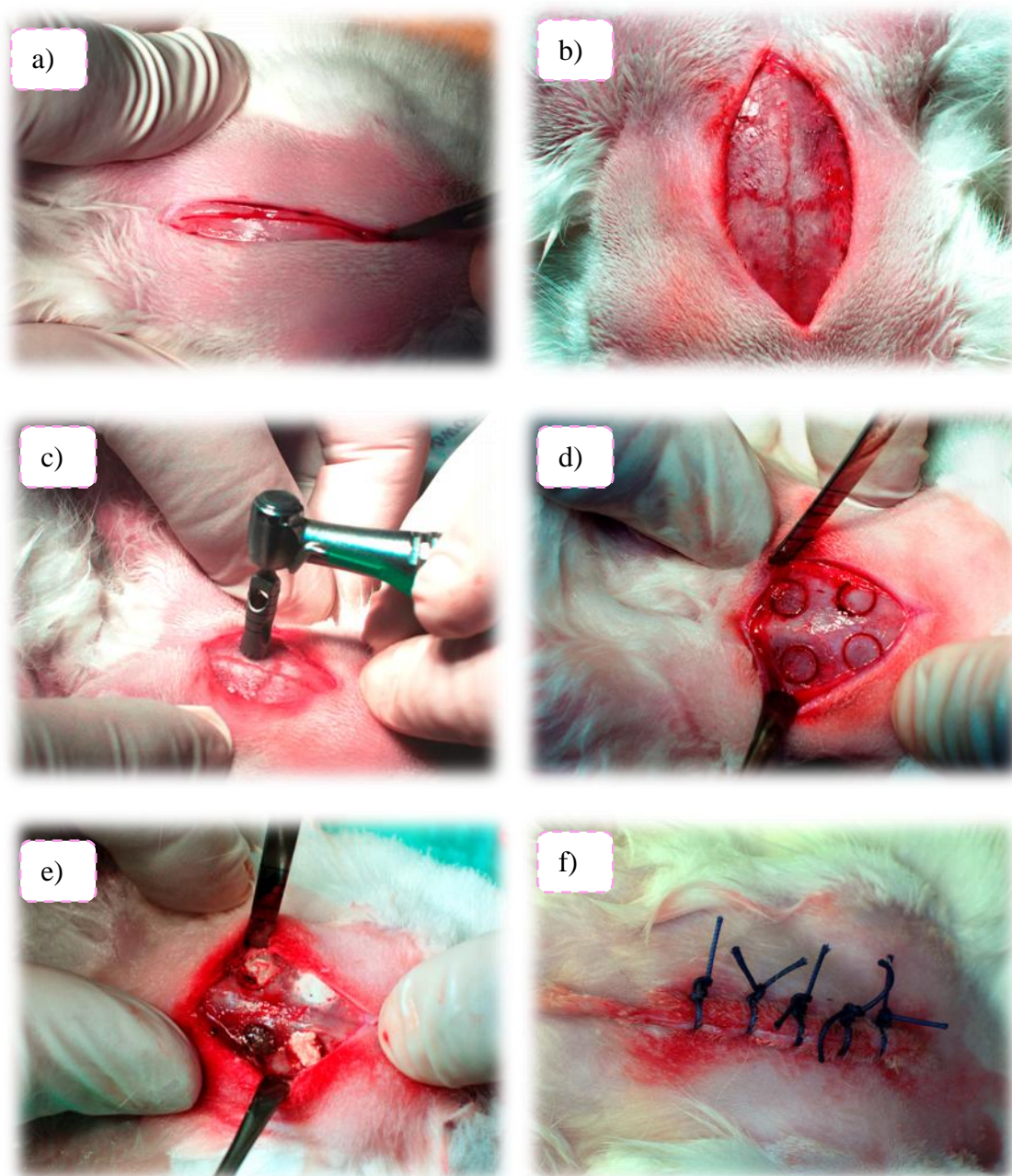
➤ **Природа везе материјала и новоформираног коштаног ткива**

Оцена 0 - одсуство новоформираног коштаног ткива,

Оцена 1 - индиректна веза (слаба веза - спорадично присутна острвца коштаног ткива или мање од 25% површине материјала прекривено новоформираним коштаним ткивом),

Оцена 2 - мешовита веза (умерена веза - бар 50% површине материјала прекривено новоформираним коштаним ткивом),

Оцена 3 - директна веза (екстезивна веза - комплетно прекривање односно премошћивање површине материјала новоформираним коштаним ткивом).



Слика 4. Хируршка процедура интракоштане имплементације испитиваних материјала: а) инцизија коже оперативног подручја, б) потпуна експонираност калварије експерименталне животиње, с) формирање дефеката трепан борером, д) изглед дефеката у коштаном ткиву, е) пласирање испитиваних материјала, ф) ушивање коже појединачним шавовима са ресорптивним концем.

3.10. Испитивање биокомпатибилности наноматеријала у *in vitro* условима након директног прекривања пулпе зуба

3.10.1. Тест процедура

Експеримент је одобрен од стране Етичког комитета Стоматолошког факултета у Београду (бр. 36/7 од 20.02.2013. године).

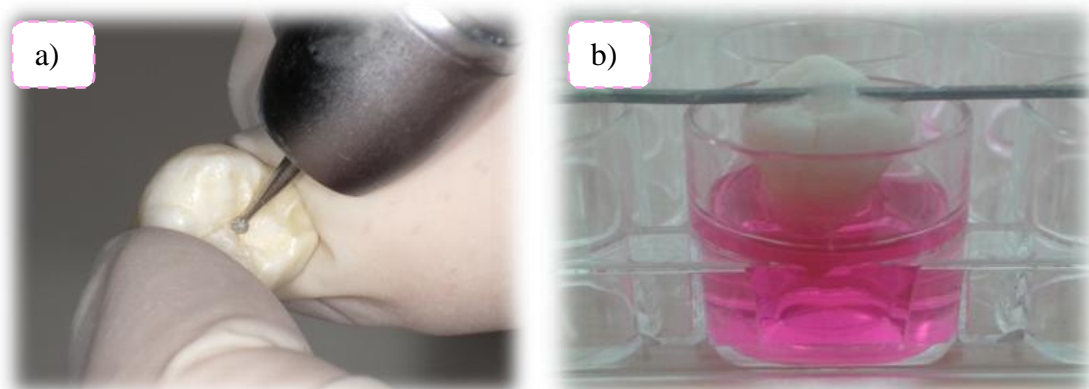
Двадесетчетири неимпактирана хумана премолара са незавршеним растом корена који су индиковани за екстракцију из ортодонтских разлога употребљена су у овој студији. Непосредно пре екстракције са зуба су уклоњене мекоткивне наслаге, а крунице зуба премазане 1% раствором NaOCl. Зуби су одмах након екстракције били транспортовани у лабораторију у MEM-у обogaћеног 300 UI/mL пеницилина, 300 µg/mL стрептомицина и 0,75 µg/mL амфотерицина В. У року од 30 min након екстракције дијамантским округлим сврдлом направљене су препарације у глеђи уз обилно хлађење и иригацију физиолошким раствором. Потом је стерилним карбидним округлим сврдлом извршена трепанација пулпе зуба. Прекривање експонираног пулпног ткива извршено је следећим испитиваним материјалима: ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂, GRAY-MPCA и контролним материјалом (MTA⁺, *Cerkamed*), по принципу случајног избора. Испитивани материјали припремљени су према упутствима произвођача.

По постављању материјала, кавитети су затварани глас-јономер цементом, а зуби култивисани у 12-mm посудама за гајење ћелија (*Falcon, Becton Dickinson*, САД), у MEM-у који је био обogaћен 10% раствором феталног говеђег серума, 300 UI/mL пеницилина, 300 µg/mL стрептомицина и 0,75 µg/mL амфотерицина В (Слика 5). Период инкубације трајао је 15 и 30 дана (n=3) на температури од 37⁰С и у атмосфери са 5% CO₂. Крунице зуба су фиксиране композитом за металну жицу која се ослањала на суседне коморе посуде тако да врх зуба не дохвати дно посуде. На тај начин је, преко апикалног отвора корена зуба, омогућена несметана дифузија медијума који се мењао сваког дана. Укупна запремина медијума по бунару износила је 4 mL.

3.10.2. Препарација ткива и хистолошко оцењивање

Сви узорци су декалцинисани у раствору за декалцинацију: 8% HCl из 37% (v/v) концентрата и 10% HCOOH из 89% (v/v) концентрата у PBS-у током 24 h на 37 °C. Након декалцинације узорци су фиксирани у кружном ткивном процесору (*Leica TP 1020*, Немачка), а потом калуљени у парафинске блокове. Из парафинских калуља сечени су серијски ткивни пресеци (са сваког узорка по осам) дебљине 5 μm .

Препарати су стандардно бојени хематоксилин-еозин (HE) бојењем. Микроскопски препарати су анализирани оптичком микроскопијом (*Olympus 5, MarTek*), на увељачањима x4, x16, x20 и x40. Истраживач који је хистолошки анализирао узорке није био упознат ком материјалу припада испитивани узорак. Оцењивање хистоморфометријских параметра извршено је на начин као што је описано у поглављу 3.8.6.



Слика 5. Директно прекривање пулпе хуманих екстрахованих зуба испитиваним материјалима: а) трепанација пулпе зуба, б) култивација зуба у 12-мм посудама за гајење ћелија у раствору MEM-а.

3.11. Статистичка анализа

За обраду добијених резултата коришћен је статистички пакет IBM SPSS (*IBM SPSS 20, IBM Corporation, New Orchard Road Armonk, Њујорк, САД*). Пре тестирања нумеричких варијабли испитиван је тип дистрибуције *One sample Kolmogorov-Smirnov* тестом.

Све нумеричке варијабле показале су нормалну дистрибуцију, па су за поређење резултата између група коришћене једнофакторска и двофакторска *ANOVA Repeated Measueres*. У случајевима када је *ANOVA* показала статистичку значајност, разлике међу групама су праћене *Tukey post hoc* тестом. Атрибутивне варијабле су анализирание *Kruskal-Wallis* тестом, а разлике између група су утврђиване *Dunn's post hoc* тестом. За најнижи степен значајности прихватане су вредности вероватноће $p < 0,05$.

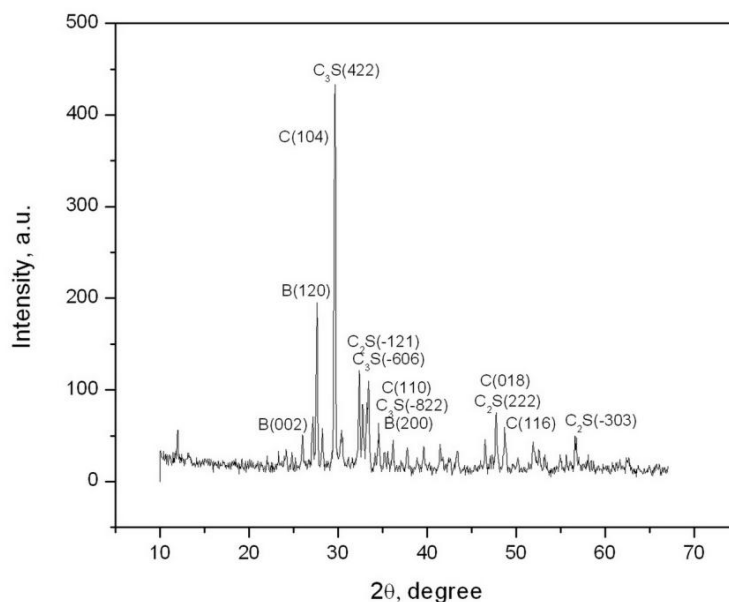
4. Резултати

4. Резултати

4.1. Резултати XRD анализе испитиваних материјала

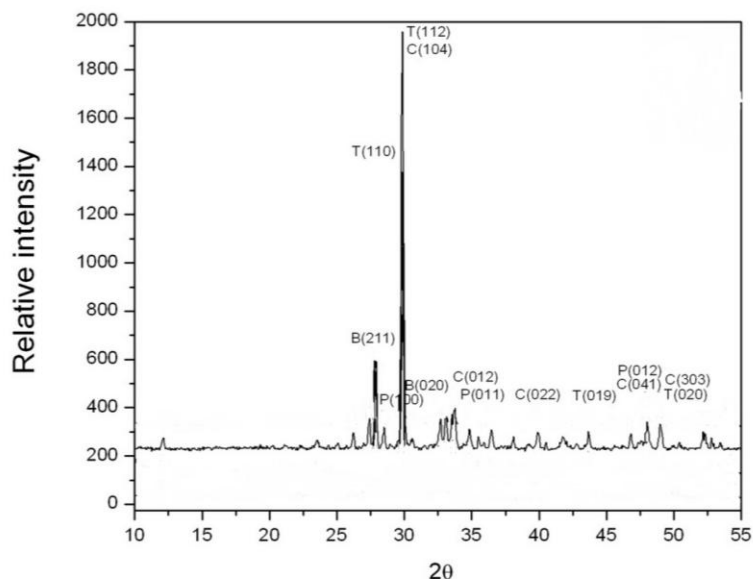
4.1.1. Резултати XRD анализе ALBO-MPCA₁ пре и након хидратације

Резултати XRD анализе ALBO-MPCA₁ пре хидратације приказани су на Слици 6: Врхови забележени на угловима 32.37°, 47.77° и 56.53°, односно на равнима (-121), (222) и (-303), одговарају β-C₂S фази. Равни (422), (-606) и (-822) које одговарају C₃S фази регистроване су на врховима углова 29.65°, 32.4° и 34.57°. Калцилит фаза идентификована је на врховима углава 29.49°, 34.88°, 47.63° и 48.69°, одговарајућих равни (104), (110), (018) и (116). Коначно, равни (002), (120) и (200) које одговарају моноклиничном бизмут-оксиду детектоване су на врховима углава 29.49°, 34.88°, и 48.69°.



Слика 6. XRD анализа ALBO-MPCA₁ пре хидратације

Резултати XRD анализе ALBO-MPCA₁ након хидратације (7 дана) приказани су на Слици 7: Карактеристична тоберморит фаза уочљива је на равнима (112), (110), (019) и (020), које одговарају врховима углова 29.75°, 30.01°, 43.69° и 48.8°. Портладит фаза је била такође присутна (равни (100), (011) и (012) на одговарајућим угловима 28.42°, 34.7° и 47.44°).



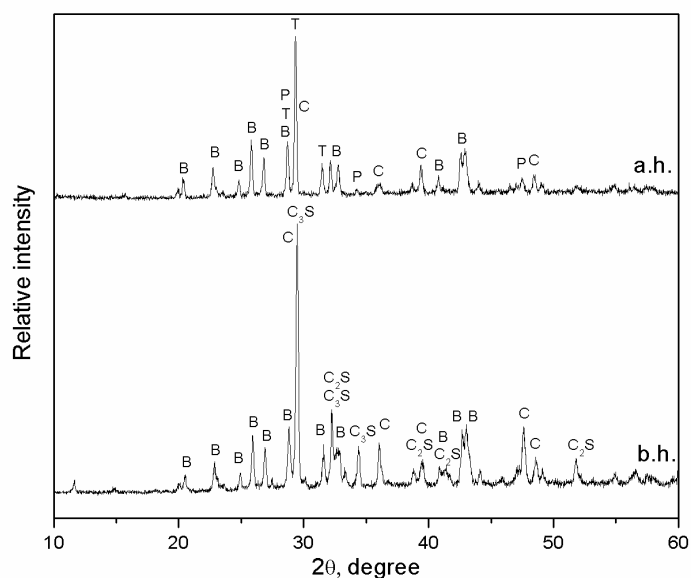
Слика 7. XRD анализа ALBO-MPCA₁ након хидратације

4.1.2. Резултати XRD анализе ALBO-MPCA₂ пре и након хидратације

Резултати XRD анализе ALBO-MPCA₂ пре хидратације приказани су на Слици 8: Врхови на уловима 32.2°, 32.7°, 39.4°, 40.9° и 51.8°, одговарајућих равни: (-121), (200), (023), (031) и (310) представљају β-C₂S фазу, док врхови на угловима 29.5°, 32.2°, 32.8° и 34.4°, одговарајућих равни: (422), (-606), (224) и (-822) указују на C₃S фазу. Калцилит фаза могла се уочити на врховима углова 29.4°, 36.0°, 39.4°, 47.6° и 48.6°, одговарајућих равни (104), (110), (113), (018) и (116); док врхови на уловима 20.5°, 22.9°, 25.0°, 25.9°, 26.8°, 28.8°, 31.6°, 32.9°, 40.7°, 42.7° и 43.0°, одговарајућих

равни (001), (111), (002), (210), (102), (211), (112), (020), (221), (401) и (122) припадају барит фази.

Резултати XRD анализе ALBO-MPCA₂ након хидратације (7 дана) приказани су на Слици 8: Поред присуства тоберморит фазе (раван (110) на углу 28.7°, раван (112) на углу 29.3° и раван (107) на углу 31.5°), јасно је била уочљива и портландит фаза (раван (100) на углу 28.7°, раван (011) на углу 34.2° и раван (012) на углу 47.1°).

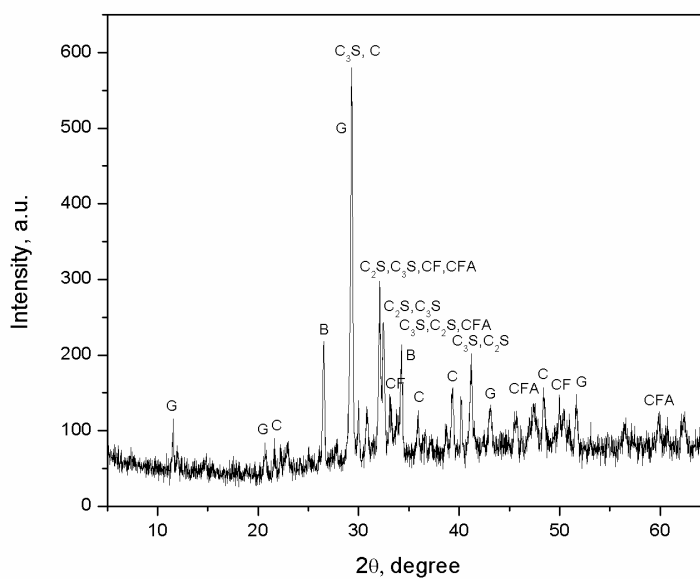


Слика 8. XRD анализа ALBO-MPCA₂ пре (b.h.) и након хидратације (a.h.)

4.1.3. Резултати XRD анализе GREY-MPCA пре и након хидратације

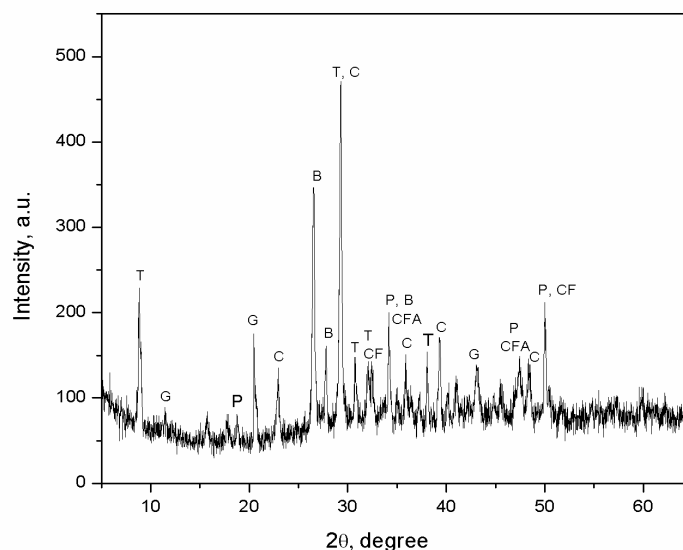
Резултати XRD анализе GREY-MPCA пре хидратације приказани су на Слици 9: Врхови на угловима 29.3°, 32.1°, 32.5°, 34.4° и 41.2°, одговарајућих равни: (422), (-606), (1200), (-822), (408) односе се на C₃S фазу, док су врхови на угловима 32.1°, 32.5°, 34.3° и 41.3°, одговарајућих равни: (-121), (200), (103) и (031), показали присуство β-C₂S фазе. Врхови на угловима 32.1°, 33.2° и 50.0°, одговарајућих равни (002), (141) и (080), додељени су дикалцијум-фериту (C₂F), док се врхови на

угловима 32.1° , 34.3° , 47.4° и 60.0° , са карактеристичним равнима (002), (141), (202) и (080), односе на милерит фазу (C_2FA). Врхови на угловима 11.6° , 20.7° , 29.2° , 43.1° , 49.0° и 51.7° , одговарајућих равни (020), (-141), (-123) и (260), указују на присуство кацијумсулфат-дихидрата. Калцилит фаза представљена је врховима на угловима 23.0° , 29.3° , 36.0° и 39.3° , одговарајућих равни (012), (104), (110) и (113), док врхови на угловима 26.6° , 27.9° и 34.3° са одговарајућим равнима (112), (120) и (200) говоре о присутној барит фази.



Слика 9. XRD анализа GREY-MPCA пре хидратације

Резултати XRD анализе GREY-MPCA након хидратације (7 дана) приказани су на Слици 10: Поред присуства тоберморит фазе (равни (002), (110), (112) и (107) са одговарајућим угловима 8.9° , 29.3° , 30.7° и 32.1°), детектована је портландит фаза (равни (001), (011), (012) и (119), одговарајућих углова 18.8° , 34.2° , 47.1° и 50.15°). Еtringит фаза детектована је врховима на угловима 33.1° и 39.9° , одговарајућих равни (304) и (226).



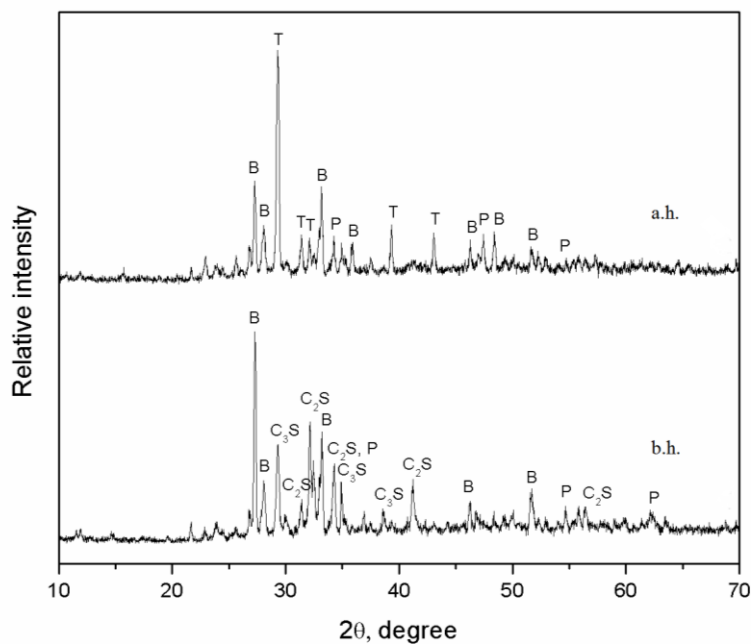
Слика 10. XRD анализа GREY-MPCA након хидратације

4.1.4. Резултати XRD анализе MTA^+ пре и након хидратације

Резултати XRD анализе MTA^+ пре хидратације приказани су на Слици 11: C_2S фаза идентификована је на врховима углава 31.40° , 32.16° , 32.46° , 41.16° и 56.48° , одговарајућих равни (013), (-121), (200), (103), (031) и (-303), док је C_3S фаза идентификована на врховима углава 29.39° , 34.84° и 38.58° , одговарајућих равни (422), (-822) и (026). Мала количина портландит фазе регистрована је на угловима 34.27° , 54.67° и 62.41° , одговарајућих равни (011), (111) и (201). Такође, уочене су карактеристичне равни моноклиничног бизмут-оксида: (120), (012), (200), (041) и (212) на угловима 27.28° , 28.04° , 33.22° , 46.24° и 51.69° .

Резултати XRD анализе MTA^+ након хидратације (7 дана) приказани су на Слици 11: Присуство тоберморит фазе идентификовано је на врховима углава 29.30° , 31.40° , 32.07° , 39.35° и 43.08° , одговарајућих равни (110), (107), (200), (0010) и (118). Портландит фаза је уочена на врховима истих углава као и код нехидратисаних узорака. Детектоване су и карактеристичне равни моноклиничног бизмут-оксида, са

три додатна врха на угловима: 34.94° на равни (-212) , 35.90° на равни (102) и 48.35° на равни (-104) .



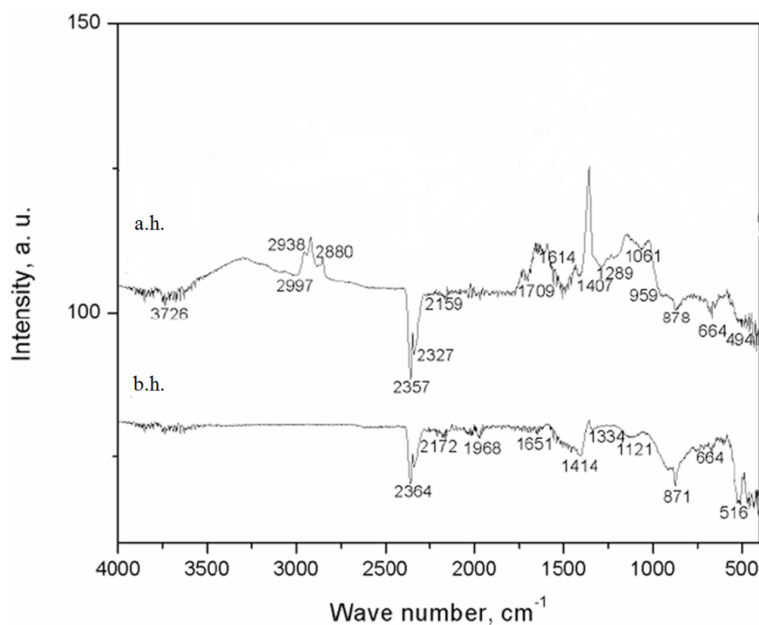
Слика 11. XRD анализа MTA^+ пре (b.h.) и након хидратације (a.h.)

4.2. Резултати FTIR анализе испитиваних материјала

4.2.1. Инфрацрвени спектар ALBO-MPCA_1 пре и након хидратације

Инфрацрвени спектар ALBO-MPCA_1 пре хидратације приказан је на Слици 12: Линија на 2172 cm^{-1} представља SiH истежући модус малих зрна која су постепено излагана процесима оксидације у току синтезе материјала. SiO_2 вибрационом модусу одговарала је линија на 1968 cm^{-1} . Линија на 1651 cm^{-1} може се приписати ослобађајућем модусу OH група, док широка линија са минимумом на 1414 cm^{-1} одговара делимично хидратисаним C_3S и C_2S фазама. Уочене линије на 1334 cm^{-1} и 871 cm^{-1} одговарају асиметричном истежању и савијању ван равни C-O групе, средњег

интензитета на 738 cm^{-1} . Линија на 1121 cm^{-1} додељена је вибрацијама C_2S фазе, док линија на 921 cm^{-1} представља индикатор слабе хидратације C_3S или C_2S фазе. Линија на 664 cm^{-1} односи се на симетричне вибрације Si-O-Si , а линија на 516 cm^{-1} одговара савијању ван равни SiO_4 .



Слика 12. Инфрацрвени спектар ALBO-MPCA_1 пре (b.h.) и након хидратације (a.h.)

Инфрацрвени спектар ALBO-MPCA_1 након хидратације приказан је на Слици 12: Линије на 2990 cm^{-1} , 2938 cm^{-1} , 2872 cm^{-1} и 3718 cm^{-1} указују на присуство тоберморит фазе. Уочене линије на 3726 cm^{-1} и 3718 cm^{-1} могу се приписати вибрацијама протона водоника везаних у молекулима воде и Ca-OH групама. Комбинација слабих линија на 1407 cm^{-1} и 1458 cm^{-1} са додатним линијама на 2990 cm^{-1} , 2938 cm^{-1} и 2872 cm^{-1} указује на вибрације карбонатних група у узорцима. Вибрације унутар решетке Si-O одговарају линијама на 966 cm^{-1} , док линија на 871 cm^{-1} представља вибрације ван равни C-O везе. Линија на 671 cm^{-1} односи се на савијајуће вибрације унутар силика ланца и $\nu_4\text{ SO}_4^{2-}$ савијајуће вибрације. Коначно, детектовна линија на 414 cm^{-1} представља деформације унутар SiO_4 тетраедра.

4.2.2. Инфрацрвени спектар ALBO-MPCA₂ пре и након хидратације

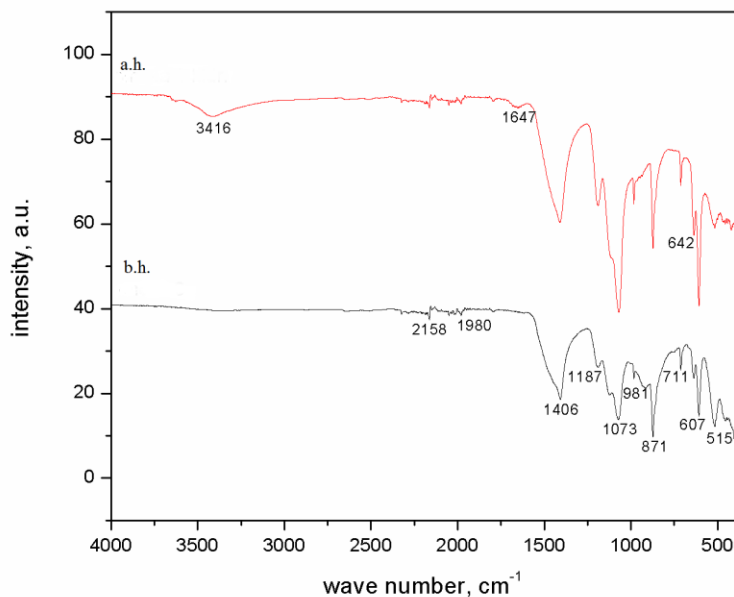
Инфрацрвени спектар ALBO-MPCA₂ пре хидратације приказан је на Слици 13: Линија на 2158 cm⁻¹ односи се на SiH истежући модус малих зрна, која су постепено излагана сагоревању току синтезе материјала. Уочена линија на 1980 cm⁻¹ одговара SiO₂ вибрационом модусу C₂S и C₃S фаза. Широки спектар асиметричних линија, са минимумом на 1406 cm⁻¹, може се приписати вибрацијама делимично хидратисаних C₃S и C₂S фаза, као и истежућим вибрацијама COO⁻ групе калцилит фазе. Вибрације C₂S фазе одговарају линији на 1187 cm⁻¹, док линије на 1073 cm⁻¹, 981 cm⁻¹ и 871 cm⁻¹ могу бити додељене асиметричном истезању и савијању ван равни C-O групе. Савијајуће вибрације ван равни SiO₄ уочене су на линијама 607 cm⁻¹ и 510 cm⁻¹.

Инфрацрвени спектар ALBO-MPCA₂ након хидратације приказан је на Слици 13: Линије на 3418 cm⁻¹ односе се на вибрације протона водоника у молекулима воде и Ca-OH групама, док линија на 2158 cm⁻¹ представља SiH истежући модус малих зрна која се постепено излажу процесу оксидације у синтези материјала. Уочене линије на 1980 cm⁻¹ одговарају SiO₂ вибрационом модусу C₂S и C₃S фаза. Присуство карбонатних група у узорцима потврђено је линијама на 1406 cm⁻¹, док линија на 1187 cm⁻¹ указује на вибрације неизреаговане C₂S фазе. Регистроване линије на 981 cm⁻¹ могу се односити на вибрације унутар решетке Si-O, док линија на 871 cm⁻¹ представља вибрације ван равни C-O групе. Савијајућим вибрацијама Si-O-Si унутар силика ланаца и SO₄²⁻ одговарале су линије на 711 cm⁻¹, док су симетричне вибрације Si-O-Si представљене линијама на 642 cm⁻¹ и 607 cm⁻¹. Коначно, линија на 515 cm⁻¹ припада деформацијама SiO₄ тетраедра унутар тоберморит фазе.

4.2.3. Инфрацрвени спектар GREY-MPCA пре и након хидратације

Инфрацрвени спектар GREY-MPCA пре хидратације приказан је на Слици 14: Линија на 2159 cm⁻¹ додељена је SiH истежућем модусу малих зрна која су постепено излагана процесу оксидације у току термалног поступка добијања Портланд цемента,

који је коришћен као извор калцијумсиликатних компоненти приликом синтезе GREY-MPCA.

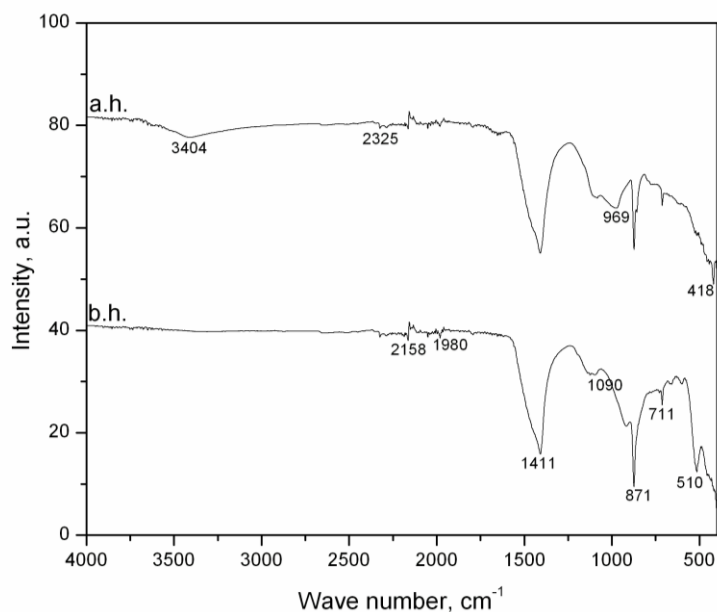


Слика 13. Инфрацрвени спектар ALBO-MPCA₂ пре (b.h.) и након хидратације (a.h.)

Уочена линија на 1980 cm^{-1} одговара SiO_2 вибрационом модусу C_2S и C_3S фаза. Широки спектар асиметричних линија са минимумом на 1414 cm^{-1} односи се на вибрације делимично хидратисаних C_3S и C_2S фаза. Регистроване линије на 1090 cm^{-1} и 871 cm^{-1} представљају асиметрична истезања и савијања ван равни C-O група, средњег интензитета на 738 cm^{-1} , док се линије на 510 cm^{-1} односе на савијајуће вибрације ван равни SiO_4 .

Инфрацрвени спектар GREY-MPCA након хидратације приказан је на Слици 14: Линије на 3404 cm^{-1} додељене су вибрације протона водоника везаних у молекулима воде и Ca-OH групама. Линија на 2158 cm^{-1} означава SiH истежући модус малих зрна, која су постепено излагана процесима оксидације у оквиру термалног поступка добијања Портланд цемента. Уочене линије на 1411 cm^{-1} сугеришу на присуство карбонатних група у узорцима. Истежуће вибрације Si-O тоберморит фаза припадају линијама на 969 cm^{-1} . Вибрације ван равни C-O

одговарају линијама на 871 cm^{-1} , док се линије на 711 cm^{-1} односе на Si-O-Si савијајуће вибрације у оквиру силика ланца и SO_4^{2-} савијајуће вибрације. Коначно, линија на 418 cm^{-1} припада деформацијама SiO_4 тетраедра унутар тоберморит фазе.

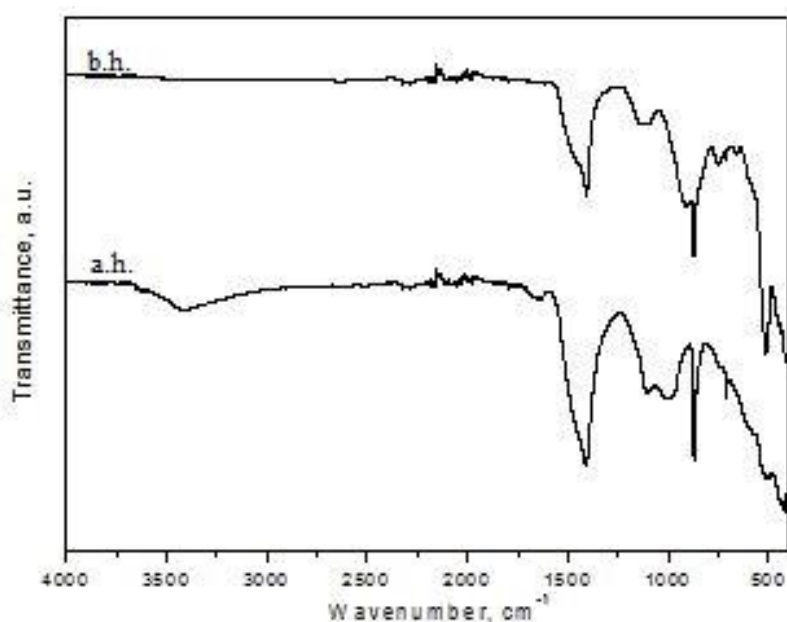


Слика 14. Инфрацрвени спектар GREY-MPCA пре (b.h.) и након хидратације (a.h.)

4.2.4. Инфрацрвени спектар MTA^+ пре и након хидратације

Инфрацрвени спектар пре хидратације приказан је на Слици 15: Асиметричном истезању и савијању ван равни C-O група одговарају линије на 1048 cm^{-1} , 923 cm^{-1} и 872 cm^{-1} , док линије на 714 cm^{-1} одговарају Si-O-Si истежућим вибрацијама унутар силика ланца и SO_4^{2-} истежућим вибрацијама. Савијајуће вибрације карбонатне групе унутар калцилит фазе уочене су на линијама на 748 cm^{-1} , док линија на 510 cm^{-1} представља савијајуће вибрације ван равни SiO_4 . Симетричним вибрацијама Si-O-Si одговарају линије на 658 cm^{-1} , док линије на 1131 cm^{-1} одговарају вибрацијама C_2S фазе.

Инфрацрвени спектар након хидратације приказан је на Слици 15: Линије на 3427 cm^{-1} представљају вибрације протона водоника везане у молекулима воде и Са-ОН групама. Si-O истежуће вибрације тоберморит фазе припадају линијама на 1048 cm^{-1} и 1109 cm^{-1} . Уочене линије на 996 cm^{-1} додељене су Si-O вибрацијама унутар решетке, а линија на 878 cm^{-1} вибрацијама ван равни C-O везе. Коначно, линија на 714 cm^{-1} односи се на Si-O-Si савијајуће вибрације унутар силика ланаца и SO_4^{2-} савијајуће вибрације.

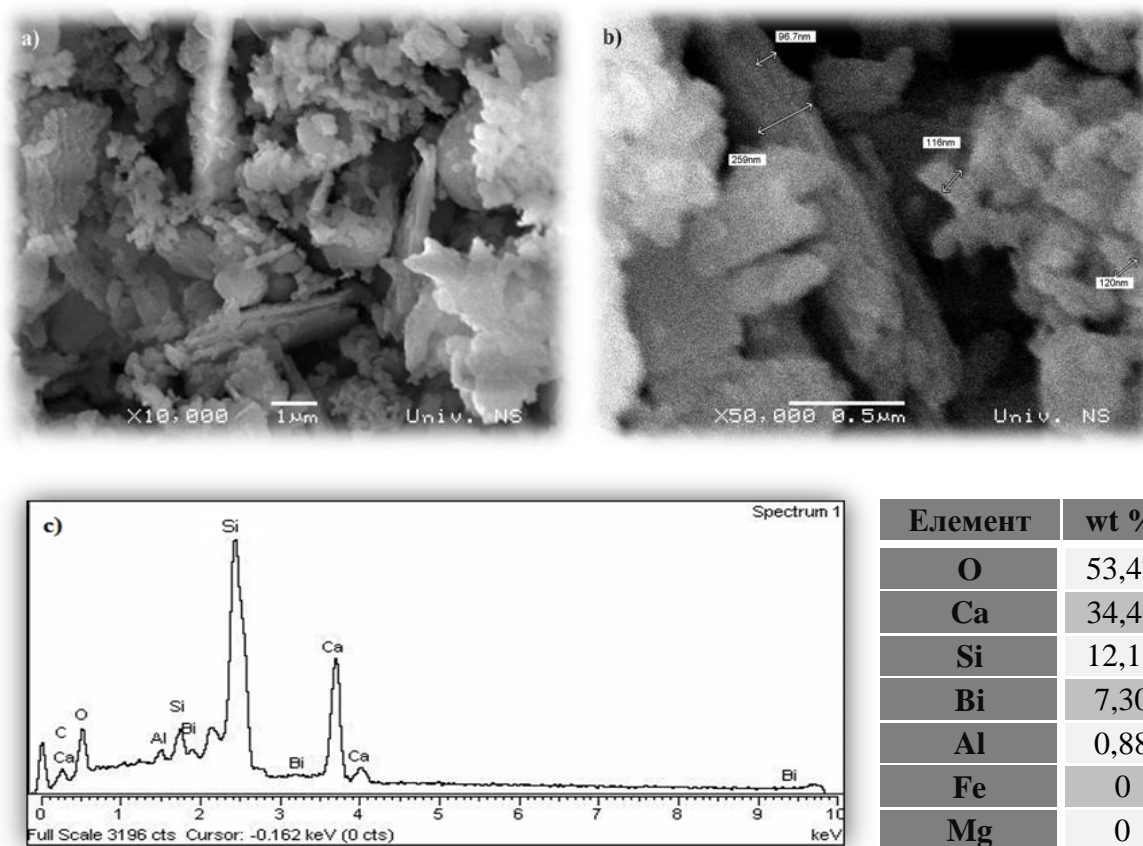


Слика 15. Инфрацрвени спектар МТА пре (b.h.) и након хидратације (a.h.)

4.3. Резултати SEM и EDS анализа испитиваних материјала

4.3.1. SEM и EDS анализа ALBO-MPCA₁

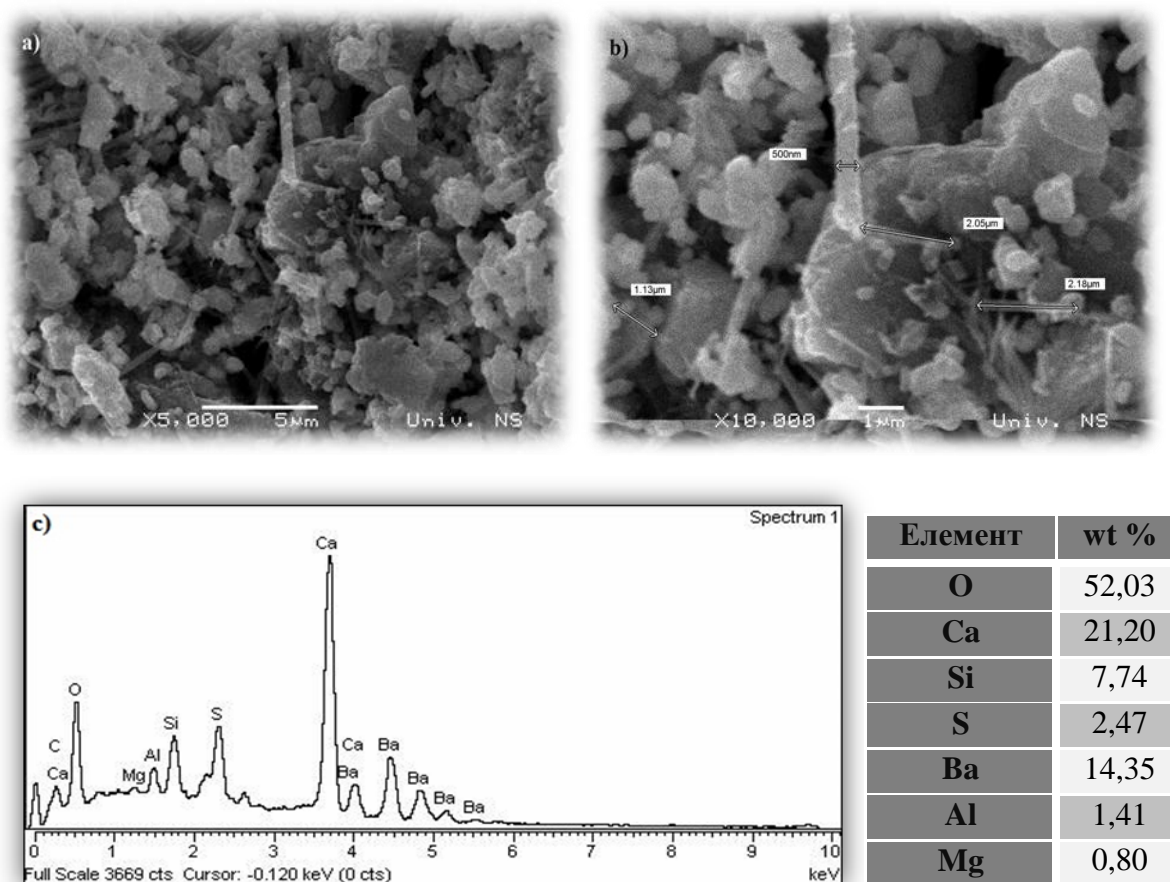
SEM микрографија и EDS анализа приказане су на Сликама 16 а), б) и с). Величина честица хидратисаног материјала ALBO-MPCA₁ варирала је између 90 и 260 nm. Честице су биле полигоналне, издужене у једном правцу, међусобно повезане у веће агрегате величине око 1 μm . Формирани агломерати варирали су у облику, од сферичног ка трноликом са преобладавајућом калцијум-силикатном фазом.



Слика 16. а) SEM хидратисаног узорка ALBO-MPCA₁, увећање 10000 \times , б) SEM хидратисаног узорка ALBO-MPCA₁, увећање 50000 \times , с) EDS спектар хидратисаног узорка ALBO-MPCA₁ са семиквантитативном анализом хемијског састава ALBO-MPCA₁ (wt%).

4.3.2. SEM и EDS анализа ALBO-MPC₂

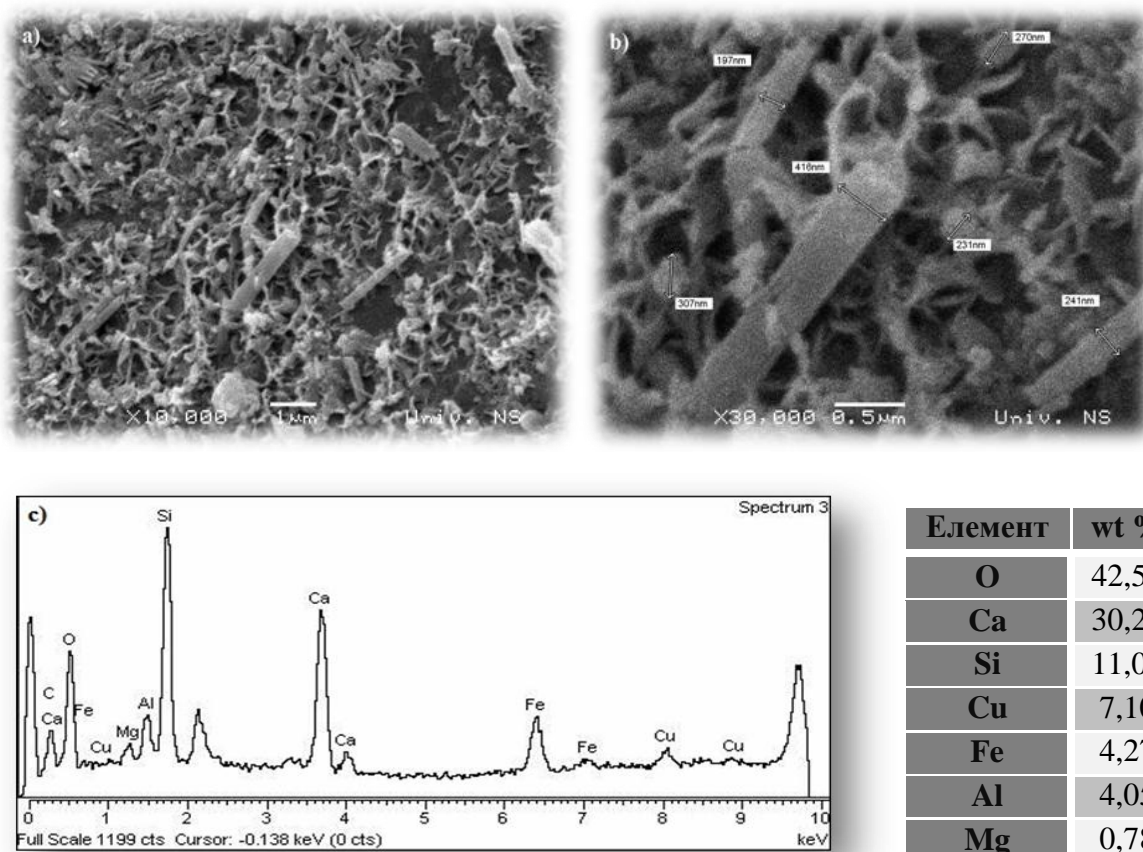
SEM микрографија и EDS анализа приказане су на Сликама 17 а), б) и с). Величина полигоналних честица хидратисаног материјала ALBO-MPC₂ варира је између 200 и 500 nm. Честице су међусобно биле повезане у веће агрегате величине око 1 μ m. Формирани агломерати варирали су у облику, од сферичног ка штапићастом са преобладавајућом калцијум-силикатном фазом.



Слика 17. а) SEM хидратисаног узорка ALBO-MPC₂, увећање 5000 \times , б) SEM хидратисаног узорка ALBO-MPC₂, увећање 10000 \times , с) EDS спектар хидратисаног узорка ALBO-MPC₂ са семиквантитативном анализом хемијског састава ALBO-MPC₂ (wt%).

4.3.3. SEM и EDS анализа GREY-MPCA

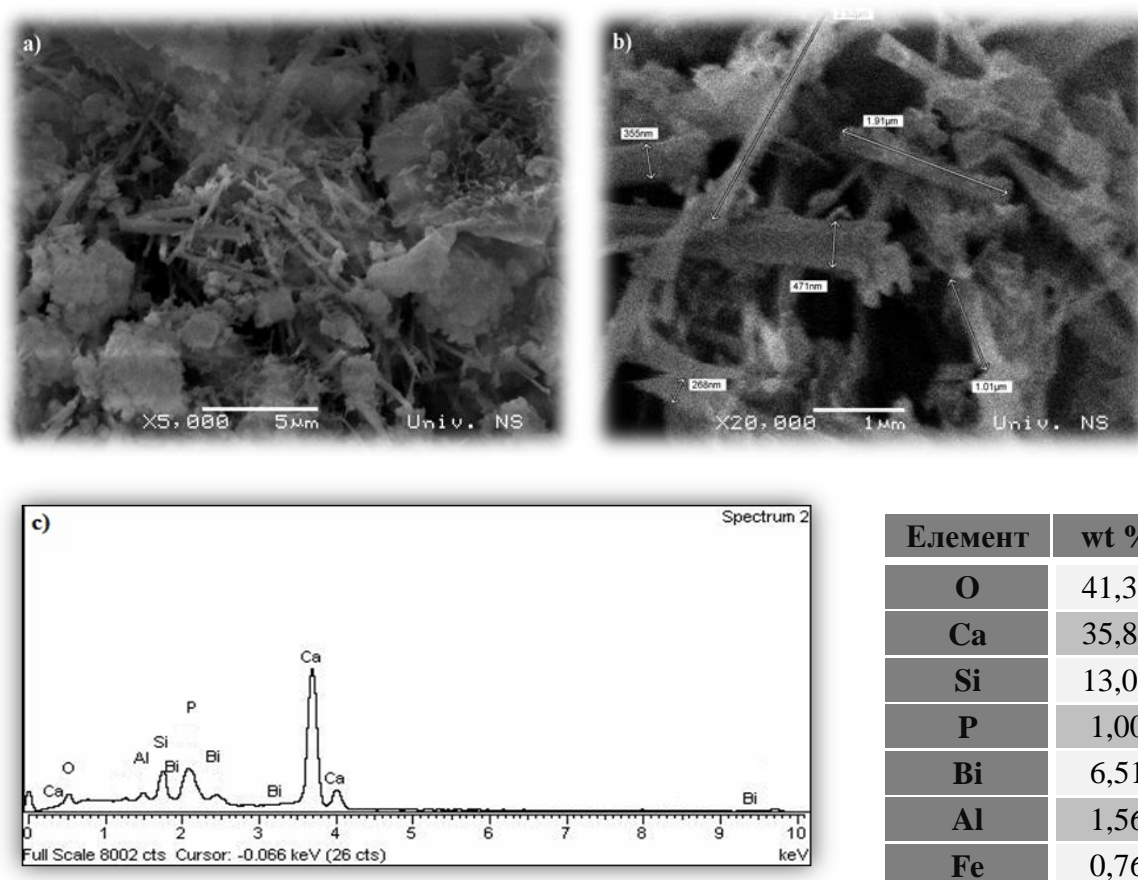
SEM микрографија и EDS анализа приказане су на Сликама 18 а), б) и с). Величина честица хидратисаног материјала GREY-MPCA варира је између 190 и 420 nm. Честице су биле трнолике и штапићасте организоване у веће агломерате величине око 0,5 μm са преобладавајућом калцијум-силикатном фазом.



Слика 18. а) SEM хидратисаног узорка GREY-MPCA, увећање 10000 \times , б) SEM хидратисаног узорка GREY-MPCA, увећање 30000 \times , с) EDS спектар хидратисаног узорка GREY-MPCA са семиквантитативном анализом хемијског састава GREY-MPCA (wt%).

4.3.4. SEM и EDS анализа MTA⁺

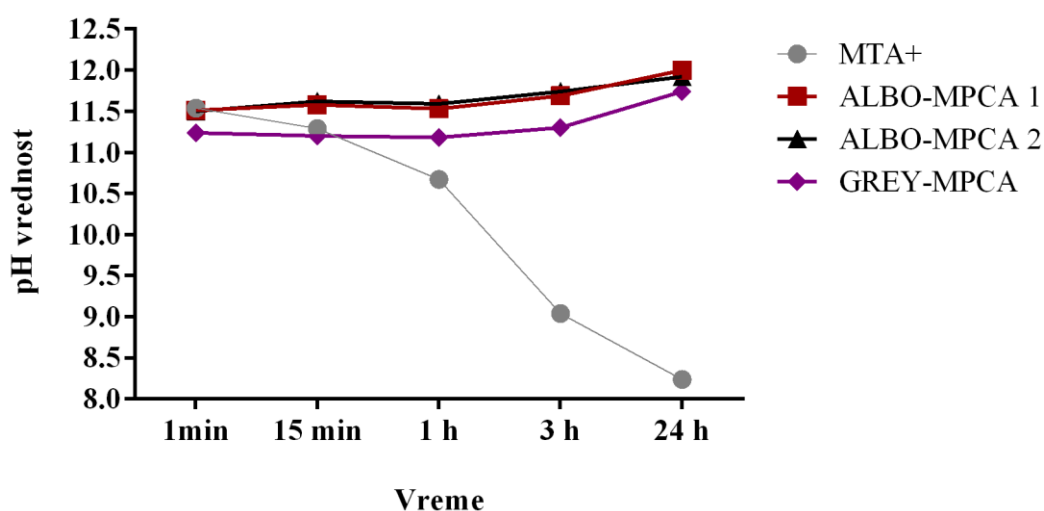
SEM микрографија и EDS анализа приказане су на Сликама 19 а), б) и с). Величина честица хидратисаног материјала MTA⁺ варира је између 260 и 470 nm. Честице су биле полигоналне, издужене у једном правцу, међусобно повезане у веће агрегате величине око 1 μm. Формирани агломерати варирали су у облику, од сферичног ка штапићастом са преобладајућом калцијум-силикатном фазом.



Слика 19. а) SEM хидратисаног узорка MTA⁺, увећање 5000×, б) SEM хидратисаног узорка MTA⁺, увећање 20000×, с) EDS спектар хидратисаног узорка MTA⁺ са семиквантитативном анализом хемијског састава MTA⁺ (wt%).

4.4. Резултати рН анализа и кинетике ослобађања јона

рН вредности свежих раствора материјала ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂ и GREY-MPCA биле су веће од 11,2 у свим временима посматрања. У случају материјала МТА⁺, рН вредности су биле ниже у односу на остале испитиване материјале, константно су опадале, али су биле алкалне. У случају МТА⁺ регистроване су статистички значајне разлике рН вредностима у између свих тестираних група (p<0,05) (Графикон 1, Табела 5).

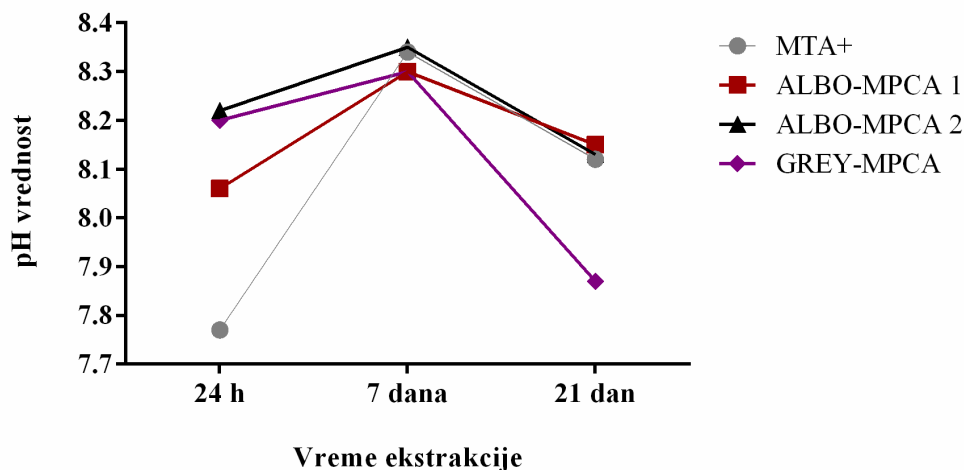


Графикон 1. рН вредности свежих раствора материјала у току 24 h

Табела 5. рН вредности свежих раствора материјала у току 24 h

Материјал/Време	1 min	15 min	1 h	3 h	24 h
ALBO-MPCA ₁	11.49±0.03 ^a	11.58±0.01	11.52±0.01 ^{b,*,†}	11.67±0.03 ^{*,†}	12.01±0.01 ^{a,b,*,†}
ALBO-MPCA ₂	11.55±0.07 ^c	11.66±0.06 ^{*,#}	11.80±0.29 ^{#,‡}	11.77±0.04 ^{#,‡}	11.91±0.01 ^{c,#}
GREY-MPCA	11.22±0.03 [#]	11.25±0.07	11.18±0.01 ^{†,‡,!}	11.25±0.07 ^{d,†,‡,!}	11.71±0.04 ^{d,†,‡,!}
MTA ⁺	11.54±0.01 ^{*,#}	11.30±0.01 ^{*,#}	10.68±0.01 ^{*,#!}	9.09±0.01 ^{*,#!}	8.26±0.03 ^{*,#;#!}

Симболи указују на статистички значајне разлике између различитих материјала у истом временском периоду (p<0,05). Мала слова указују на статистички значајне уочене у случају истог материјала у различитим временским периодима (p<0,05).



Графикон 2. рН вредности екстраката везаних материјала у току 21 дана

Највише рН вредности екстраката свих испитиваних материјала регистроване су након седам дана, потом су благо опадале, осим у случају материјала GREY-MPCA где је уочен значајан пад. У свим временским периодима посматрања рН вредности су биле благо алкалне (Графикон 2, Табела 6).

Након седам дана екстракције уочене су највише концентрације калцијума код свих испитиваних материјала ($ALBO-MPCA_1 > ALBO-MPCA_2 > GREY-MPCA > MTA^+$). Јони силицијума детектовани су једино у узорцима GREY-MPCA, а њихова концентрација се увећавала са временом екстракције материјала (Табела 7 а, б, с).

Табела 6. рН вредности екстраката везаних материјала у току 21 дана

Материјал & време	24 h	7-дан	21-дан
ALBO-MPCA ₁	8.04±0.03 ^{a,b,*,†,‡}	8.28±0.03 ^{a,c}	8.13±0.03 ^{b,c,*}
ALBO-MPCA ₂	8.21±0.01 ^{d,e,*,#}	8.34±0.01 ^{d,f}	8.13±0.01 ^{e,f,#}
GREY-MPCA	8.20±0.01 ^{g,h,†,‡}	8.30±0.01 ^{g,i}	7.87±0.02 ^{h,i,*,#}
MTA ⁺	7.76±0.01 ^{j,k,#,†,‡}	8.32±0.03 ^{j,l}	8.11±0.01 ^{k,l}

Симболи указују на статистички значајне разлике између различитих материјала у истом временском периоду ($p < 0,05$). Мала слова указују на статистички значајне разлике између различитих временских период истог материјала у ($p < 0,05$).

Табела 7а. Ослобађање јона (MV±SD) из испитиваних материјала у раствор дејонизоване воде након 24 h (µg/L)

Јон & материјал	MTA ⁺	ALBO-MPCA ₁	ALBO-MPCA ₂	GREY-MPCA
Si	-	-	-	206±13,20
Ca	17650±181	22390±443	22500±419	28780±88
P	-	-	-	-
Mg	24,21±0,10	33,36±0,94	28,19±0,21	115±0,60
Fe	-	-	-	-
Cu	-	-	-	0,95±0,41
Al	40,16±7,46	48,72±5,64	104±14,00	217,3±13,80
Ba	-	-	785,6±14,60	137±0,30
Bi	4,63±2,60	5,92±2,33	-	-

MV- средња вредност; SD- стандардна девијација

Количина ослобођеног алуминијума опадала је у функцији времена, односно није регистрована у случају материјала MTA⁺ након 21 дана; док је количина магнезијума (ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂, GREY-MPCA, MTA⁺) и бизмута (ALBO-MPCA₁, MTA⁺) била у порасту. Количина ослобођеног баријума била у порасту у току времена у случају материјала ALBO-MPCA₂, супротно уоченом за узорке GREY-MPCA (p<0,05). Концентрација бизмута била је већа у случају MTA⁺ у односу на ALBO-MPCA₁, док је концентрација магнезијума била највећа у случају GREY-MPCA, а најмања у случају MTA⁺ (Табела 7а, б, с). Отпуштање јона гвожђа није регистровано ни у једном узорку испитиваних материјала. Јони бакра били су детектовани једино у узорцима испитиваног материјала GREY-MPCA (<1 µg/L), односно фосфора (<0,3 µg/L) у узорцима материјала MTA⁺ (Табела 7а, б, с).

Статистички значајне разлике у ослобађању јона калцијума уочене су између свих материјала у истом времену посматрања, односно између различитих времена посматрања у истој групи испитиваног материјала (p<0,05). Исти тренд пратио је и ослобађање јона магнезијума. Значајна разлика једино није регистрована између узорка материјала ALBO-MPCA₁ и ALBO-MPCA₂ након седам дана (p>0,05).

Табела 7б. Ослобађање јона (MV±SD) из испитиваних материјала у раствор дејонизоване воде након 7 дана (µg/L)

Јон & материјал	MTA ⁺	ALBO-MPCA ₁	ALBO-MPCA ₂	GREY-MPCA
Si	-	-	-	3646±176
Ca	35580±515	33880±496	32630±420	32810±717
P	-	-	-	-
Mg	34,52±0,45	44,94±0,26	45,45±0,39	166,4±5,10
Fe	-	-	-	-
Cu	-	-	-	0,40±0,11
Al	105,30±3,50	91,52±1,89	48,97±0,63	225,1±7,10
Ba	-	-	1126±21	65,29±1,23
Bi	3,41±3,64	3,05±4,61	-	-

MV- средња вредност; SD- стандардна девијација

Табела 7с. Ослобађање јона (MV±SD) из испитиваних материјала у раствор дејонизоване воде након 21 дана (µg/L)

Јон & материјал	MTA ⁺	ALBO-MPCA ₁	ALBO-MPCA ₂	GREY-MPCA
Si	-	-	-	5048±42
Ca	17810±288	21810±350	19880±26	16860±103
P	0,27±1,25	-	-	-
Mg	54,73±0,88	79,37±1,73	110,9±0,7	385,1±2,00
Fe	-	-	-	-
Cu	-	-	-	0,45±0,73
Al	-	8,32±0,04	10,81±1,00	77,34±1,96
Ba	-	-	1449±46	26,80±0,40
Bi	17,68±4,61	12,11±2,29	-	-

MV- средња вредност; SD- стандардна девијација

Пораст у отпуштању јона бизмута значајно се разликовао између свих времена посматрања у случају материјала ALBO-MPCA₁ ($p < 0,05$), односно у групи MTA⁺ једино није био присутан између 24 h и седам дана ($p > 0,05$). Након 21 дана, значајна разлика у ослобађању јона бизмута била је уочљива између поменутих испитиваних материјала. Статистички значајан пад у ослобађању јона алуминијума био је очигледан у узорцима свих испитиваних материјала ($p < 0,05$), осим у случају материјала GREY-MPCA (24 h и седам дана) ($p > 0,05$).

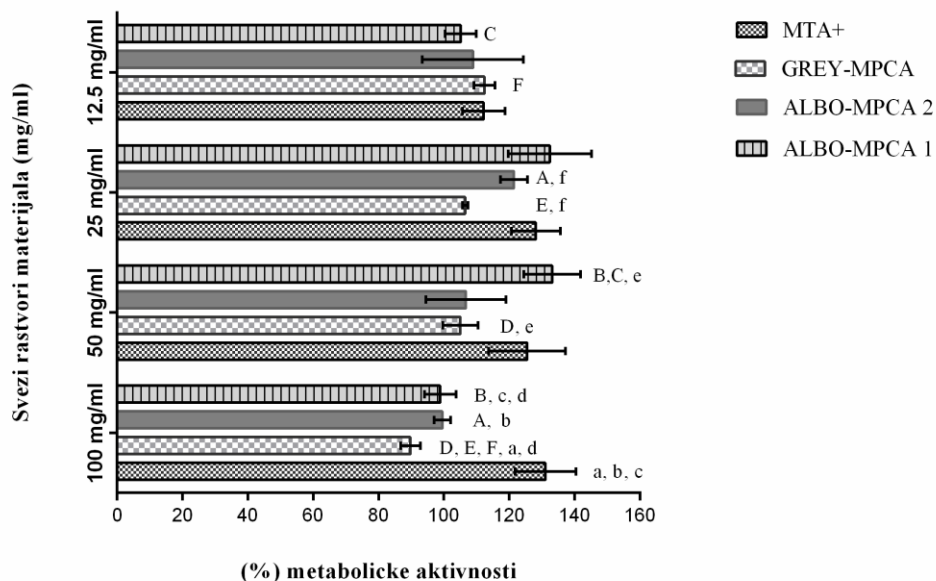
4.5. Резултати цитотоксичности свежих раствора испитиваних материјала (МТТ тест)

Процент метаболичке активности ћелија указује на зависност токсичности материјала GREY-MPCA од концентрације (Графикон 3, Табела 8). Статистички значајна разлика у проценту метаболичке активности ћелија у случају GREY-MPCA уочена је између концентрација 100 mg/ml и нижих тестираних концентрација, односно у случају ALBO-MPCA₁ између концентрација 100 mg/mL и 50 mg/mL; и између 50 mg/mL и 12,5 mg/mL ($p < 0,05$). Статистички значајна разлика у проценту метаболичке активности након излагања ћелија материјалу ALBO-MPCA₂ уочена је између концентрација 100 mg/mL и 25 mg/mL ($p < 0,05$). Процент метаболичке активности ћелија није указао на зависност токсичности материјала ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂ и MTA⁺ од њихове концентрације.

Контролни материјал MTA⁺ испољио је пораст метаболичке активности у односу на контролне ћелије у свим тестираним концентрацијама. Исти тренд одликовао је и друге испитиване материјале, изузев највише испитиване концентрације материјала (100 mg/mL). Најнижа метаболичка активност ћелија уочена је после излагања ћелија највећој тестираној концентрацији раствора GREY-MPCA.

Метаболичка активност ћелија у највишој тестираној концентрацији 100 mg/mL статистички се није разликовала између материјала ALBO-MPCA₁ и ALBO-MPCA₂, односно између материјала ALBO-MPCA₂ и GREY-MPCA ($p > 0,05$). Статистички

значајна разлика у метаболичкој активности ћелија регистрована је између материјала ALBO-MPCA₁ и GREY-MPCA (концентрација 50 mg/mL, p<0,05), односно између ALBO-MPCA₂ и GREY-MPCA (концентрација 25 mg/mL, p<0,05) У најнижој концентрацији, метаболичка активност ћелија у односу на све испитиване материјале је била слична; није регистрована статистички значајна разлика (p>0,05).



Графикон 3. (%) Метаболичке активности у односу на контролну културу ћелија. Мала слова означавају статистички значајне разлике између истих концентрација тестираних материјала. Велика слова указују на статистичке разлике између различитих концентрација раствора истог материјала.

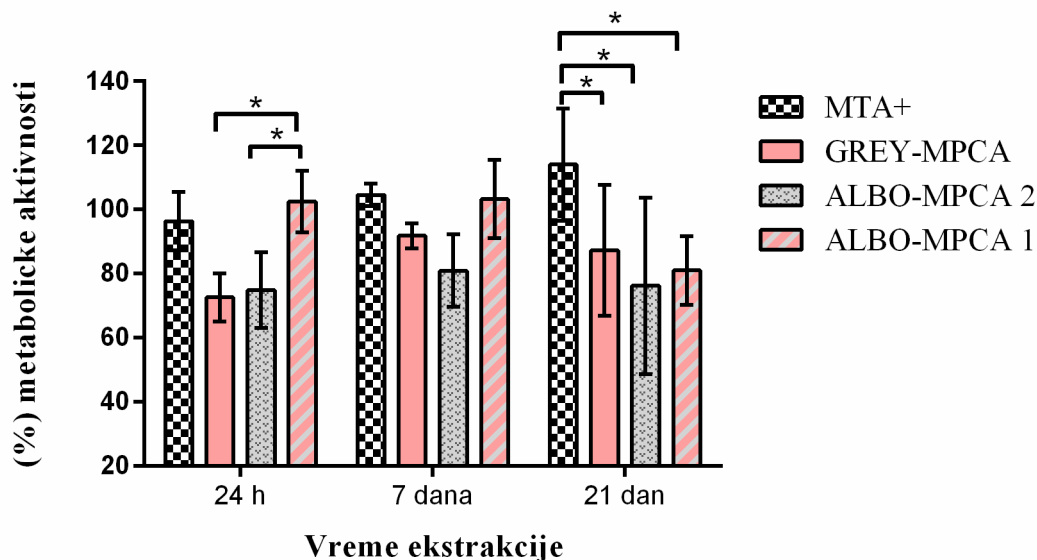
Табела 8. (%) Метаболичке активности ћелија (MV±SD) након излагања свежим растворима испитиваних материјала

Материјал & концентрација	12,5 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL
MTA ⁺	112,18±6,48	128,15±7,44	125,44±11,75	131,08±9,33
ALBO-MPCA ₁	105,13±4,76	132,41±12,76	133,15±8,70	98,89±4,89
ALBO-MPCA ₂	108,86±15,46	121,40±4,11	106,72±12,25	99,53±2,57
GREY-MPCA	112,40±3,19	106,52±0,88	105,04±5,40	89,75±3,02

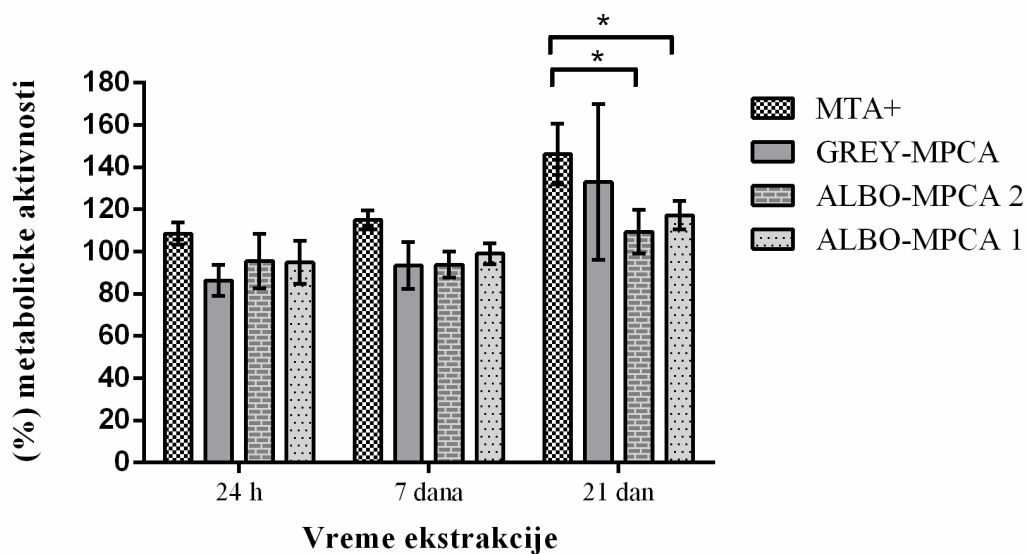
MV- средња вредност; SD- стандардна девијација

4.6. Резултати цитотоксичности екстраката испитиваних материјала (МТТ тест)

Метаболичка активност ћелија била је у порасту у односу на време екстракције у случају разблажених, као и неразблажених раствора свих испитиваних материјала, осим у случају екстраката материјала ALBO-MPCA₂, ALBO-MPCA₁ и GREY-MPCA након 21 дана (Графикон 4 и 5, Табела 9). Статистички значајне разлике у проценту метаболичке активности ћелија, између различитих времена екстракције неразблажених раствора истог материјала, нису регистроване ($p > 0,05$). Када је реч о 50% разблаженим растворима, статистичка значајна разлика у метаболичкој активности ћелија уочене су у односу на најдуже време екстракције у случају материјала MTA⁺ и GREY-MPCA ($p < 0,05$). Статистички значајне разлике између разблажених и неразблажених раствора уочене су код екстраката свих испитиваних материјала након 21 дана ($p < 0,05$).



Графикон 4. (%) Метаболичке активности у односу на контролну културу ћелија по излагању 100% екстрактима испитиваних материјала. Звездицама су означене статистички значајне разлике између различитих материјала у истог групи.



Графикон 5. (%) Метаболичке активности у односу на контролну културу ћелија након излагања 50% екстрактима испитиваних материјала. Звездицама су означене статистички значајне разлике између испитиваних материјала у оквиру истих група.

Табела 9. (%) Метаболичке активности ћелија (MV±SD) након експозиције 100% и 50% екстрактима испитиваних материјала

Материјал & време	24 h		7-дан		21-дан	
	100%	50%	100%	50%	100%	50%
MTA ⁺	96,38±9,17	108,55±5,19	104,60±3,56	115,02±4,45	114,04±17,44	146,24±14,30
ALBO-MPCA ₁	102,45±9,57	94,88±10,17	103,28±12,23	99,05±4,85	81,00±10,77	117,30±6,79
ALBO-MPCA ₂	74,89±11,73	95,59±12,97	80,99±11,26	93,84±6,09	76,25±27,48	109,45±10,43
GREY-MPCA	72,62±7,52	86,35±7,41	91,80±3,81	93,42±11,02	87,27±20,46	132,99±36,95

MV- средња вредност; SD- стандардна девијација

4.7. Резултати цитотоксичности екстраката испитиваних материјала (LDT тест)

Процент цитотоксичности се смањивао са порастом времена екстракције материјала осим у случају 50% екстраката материјала ALBO-MPCA₂ и GREY-MPCA, али та разлика није била већа од 6%. Значајне разлике у проценту цитотоксичности између

Табела 10. Вредности ослобођене лактат дехидрогеназе - LDH (IU/L) након експозиције ћелијске културе 100% и 50% екстрактима испитиваних материјала (MV±SD)

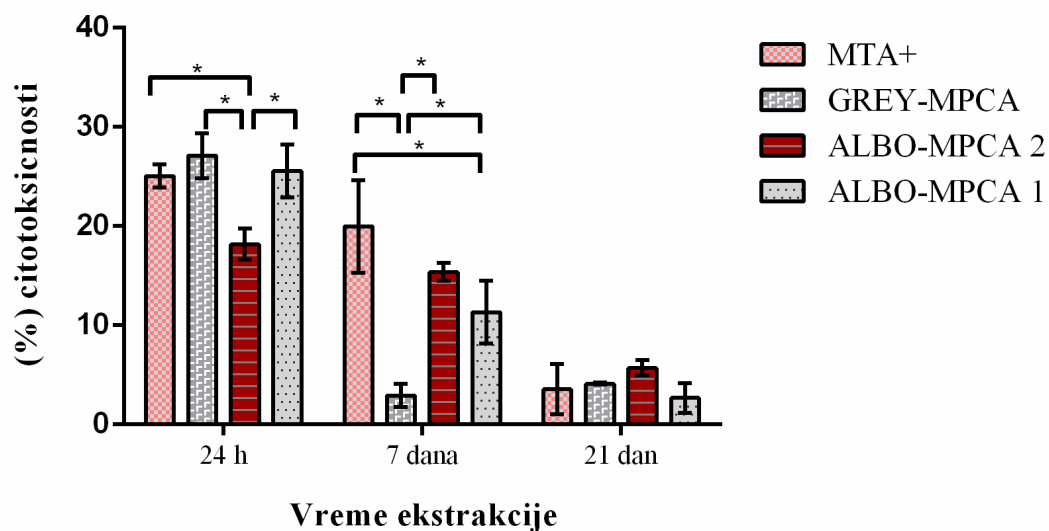
Материјал & време	24 h		7-дан		21-дан	
	100%	50%	100%	50%	100%	50%
MTA ⁺	62,33±1,53	43,67±1,53	55,67±6,11	41,00±1,73	28,50±9,19	32,67±2,31
ALBO-MPCA ₁	63,00±3,46	38,67±3,21	44,33±4,16	36,33±3,06	26,00±2,00	24,33±3,21
ALBO-MPCA ₂	53,33±2,08	35,00±5,57	49,67±1,15	34,67±1,53	22,00±1,41	15,67±2,31
GREY-MPCA	65,00±3,00	40,33±6,11	33,33±1,53	28,00±1,00	35,00±0,10	26,67±5,51

MV- средња вредност; SD- стандардна девијација

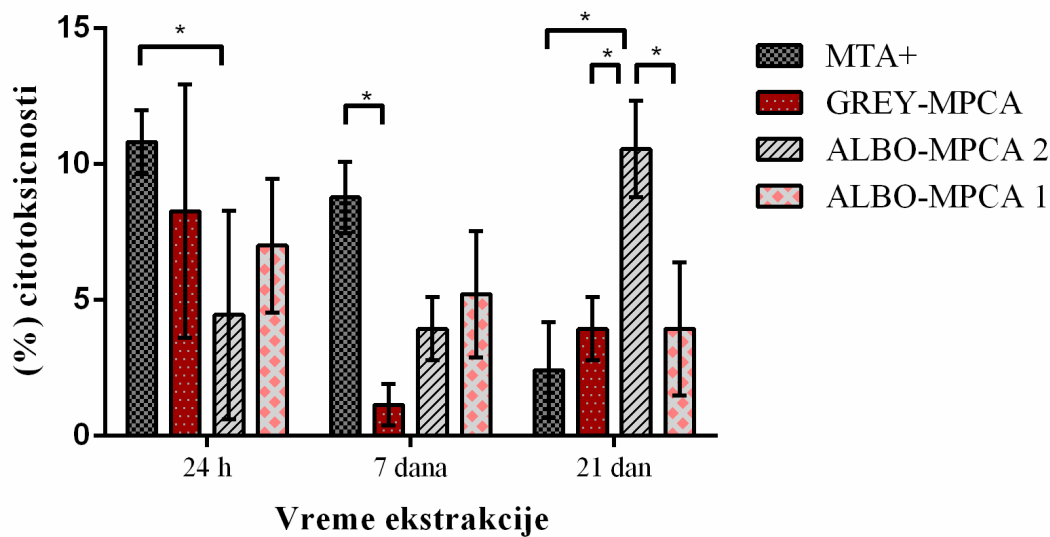
разблажених и неразблажених раствора уочене су након 24-часовне екстракције код свих испитиваних материјала, односно у случају MTA⁺, ALBO-MPCA₁ и ALBO-MPCA₂ након 7-дневне екстракције (Графикон 6 и 7, Табела 10 и 11).

Статистички значајне разлике у проценту цитотоксичности између материјала MTA⁺ и ALBO-MPCA₁ уочене су у односу на сва три времена екстракције неразблажених раствора ($p < 0,05$), а у односу на материјал ALBO-MPCA₂, статистички значајне разлике су уочене у односу на најдуже време екстракције неразблажених раствора ($p < 0,05$). У случају испитиваног материјала GREY-MPCA, статистички значајна разлика у проценту цитотоксичности у односу на MTA⁺, уочена је између 24-часовних и 7-дневних, односно 24-часовних и 21-дневних екстраката неразблажених раствора ($p < 0,05$).

Статистички значајне разлике у проценту цитотоксичности у случају 24-часовних и 7-дневних екстраката материјала МТА⁺ и ALBO-MPCA₂ уочене су у односу на најдуже време екстракције разблажених раствора ($p < 0,05$). Када је реч о материјалу GREY-MPCA, статистички значајна разлика у проценту цитотоксичности уочена је између 24-часовних и 7-дневних екстраката разблажених раствора ($p < 0,05$). Нису уочене статистички значајне разлике у цитотоксичном ефекту разблажених раствора материјала ALBO-MPCA₁ у односу на време екстракције ($p > 0,05$).



Графикон 6. (%) Цитотоксичности након излагања ћелијске културе 100% екстрактима испитиваних материјала. Звездицама су означене статистички значајне разлике између испитиваних материјала у оквиру истих група.



Графикон 7. (%) Цитотоксичности након излагања ћелијске културе 50% екстрактима испитиваних материјала. Звездицама су означене статистички значајне разлике између испитиваних материјала у оквиру истих група.

Табела 11. (%) Цитотоксичности (MV±SD) након експозиције ћелијске културе 100% и 50% екстрактима испитиваних материјала

Материјал & време	24 h		7-дан		21-дан	
	100%	50%	100%	50%	100%	50%
MTA ⁺	25,06±1,17	10,81±1,17	19,97±4,66	8,78±1,32	3,56±2,54	2,41±1,76
ALBO-MPCA ₁	25,57±2,65	7,00±2,45	15,39±0,88	5,22±2,33	2,67±1,53	3,94±2,45
ALBO-MPCA ₂	18,19±1,59	4,45±3,84	11,32±3,19	3,94±1,17	5,73±0,76	10,56±1,76
GREY-MPCA	27,10±2,29	8,27±4,66	2,93±1,17	1,15±0,76	4,20±0,00	3,94±1,16

MV- средња вредност; SD- стандардна девијација

4.8. Резултати цитотоксичности екстраката испитиваних материјала (тест пролиферације)

Процент пролиферације ћелија смањивао се са порастом времена екстракције материјала, односно био је константан у случају неразблажених екстраката материјала GREY-MPCA и 50% разблажених екстраката материјала MTA⁺ и ALBO-MPCA₂ након седам дана. Пораст у степену пролиферације ћелијске културе уочен је у случају неразблажених екстраката материјала ALBO-MPCA₁ и ALBO-MPCA₂ након седам дана.

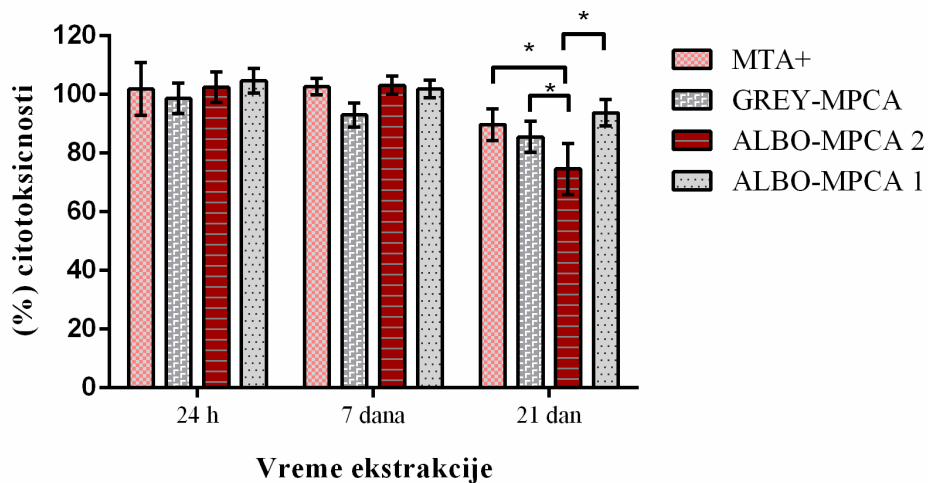
Табела 12. (%) Пролиферације (MV±SD) након експозиције ћелијске културе 100% и 50% екстрактима испитиваних материјала

Материјал & време	24 h		7-дан		21-дан	
	100%	50%	100%	50%	100%	50%
MTA ⁺	107,42±5,75	101,87±8,98	98,72±11,67	102,68±2,77	86,49±6,52	89,72±5,44
ALBO-MPCA ₁	103,89±4,63	104,69±4,21	109,06±7,38	101,88±3,03	89,86±3,29	93,78±4,45
ALBO-MPCA ₂	92,71±6,64	102,57±5,18	111,34±12,18	103,16±3,11	87,40±14,39	74,62±8,73
GREY-MPCA	89,41±4,04	98,63±5,20	89,39±7,35	93,01±4,15	83,83±3,79	85,56±5,28

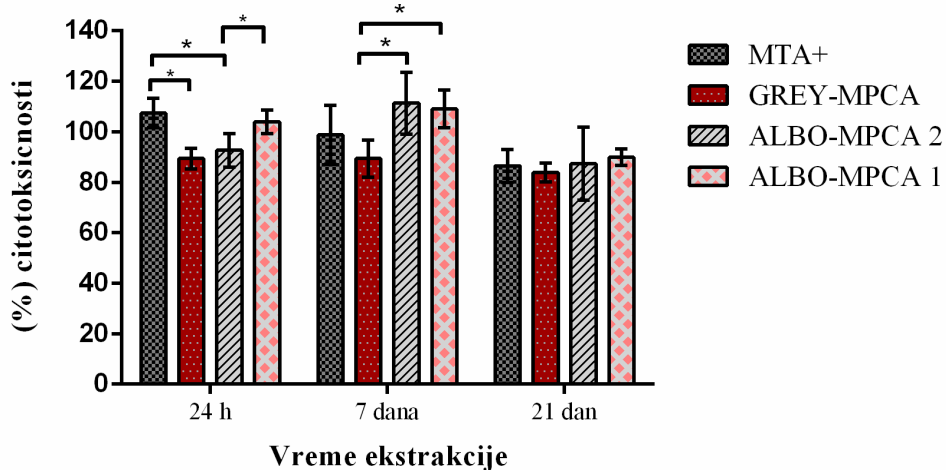
MV- средња вредност; SD- стандардна девијација

Статистички значајне разлике у проценту пролиферације ћелија након излагања екстрактима неразблажених раствора материјала уочене су у случају MTA⁺ између група 24 h и 21-дан, односно у случају ALBO-MPCA₁ и ALBO-MPCA₂, између група 24 h и 21-дан, и група 7-дан и 21-дан (p<0,05). Када је реч о проценту пролиферације ћелија након излагања екстрактима 50% разблажених раствора материјала, статистички значајне разлике уочене су у случају GREY-MPCA и ALBO-MPCA₁ између група 24 h и 21-дан, односно у случају MTA⁺ и ALBO-MPCA₂, између група 24 h и 21-дан, и 7-дан и 21-дан (p<0,05). Нису регистроване статистички значајне разлике у степену пролиферације ћелија између неразблажених и 50% разблажених

раствора екстраката истих материјала независно од времена посматрања ($p > 0,05$) (Графикон 8 и 9, Табела 12).



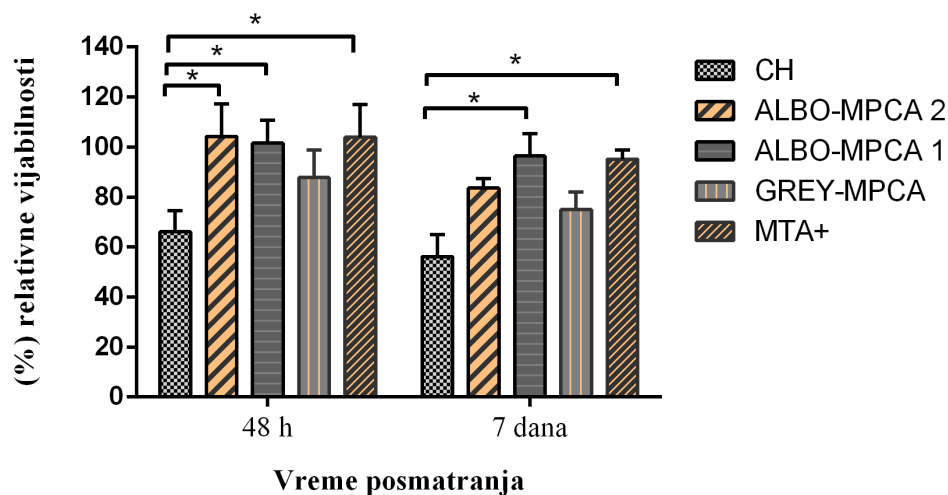
Графикон 8. (%) Пролиферације након излагања ћелијске културе 50% екстрактима испитиваних материјала. Звездицама су означене статистички значајне разлике између испитиваних материјала у оквиру истих група.



Графикон 9. (%) Пролиферације након излагања ћелијске културе 100% екстрактима испитиваних материјала. Звездицама су означене статистички значајне разлике између испитиваних материјала у оквиру истих група.

4.9. Резултати цитотоксичности свеже замешаних испитиваних материјала (директна метода)

Процент релативне вијабилности ћелија смањивао се са порастом времена, односно био је нижи од 70% једино у случају материјала СН у оба времена посматрања. Статистички значајне разлике у проценту релативне вијабилности ћелија нису уочене између GREY-MPCA и СН у оба времена посматрања ($p > 0,05$; Графикон 10, Табела 13). Излед SCAP ћелијских култура у директном контакту са испитиваним материјалима приказан је на Сликама 20-27.

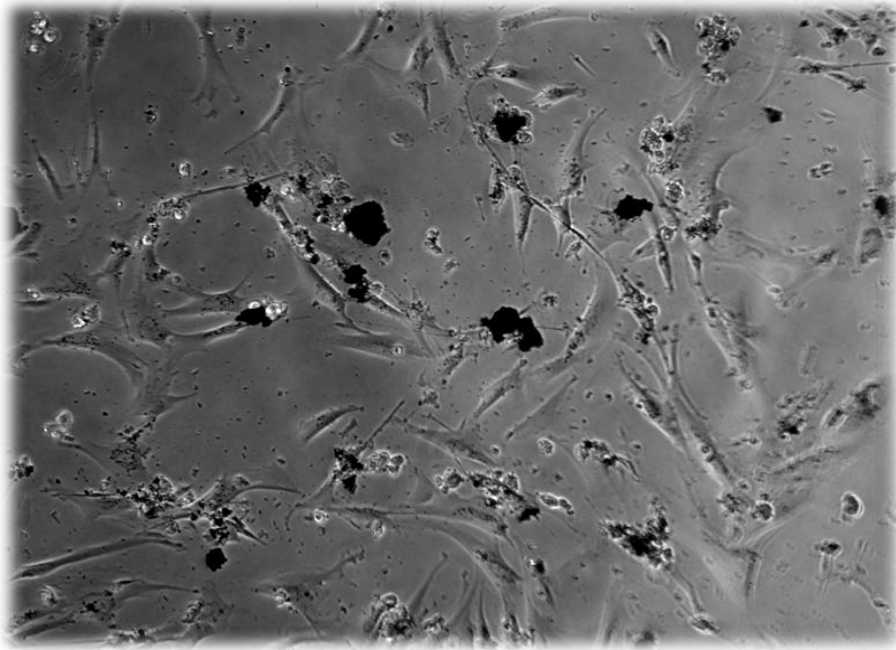


Графикон 10. (%) Релативне вијабилности ћелија након излагања свеже замешаним испитиваним материјалима. Звездицама су означене статистички значајне разлике.

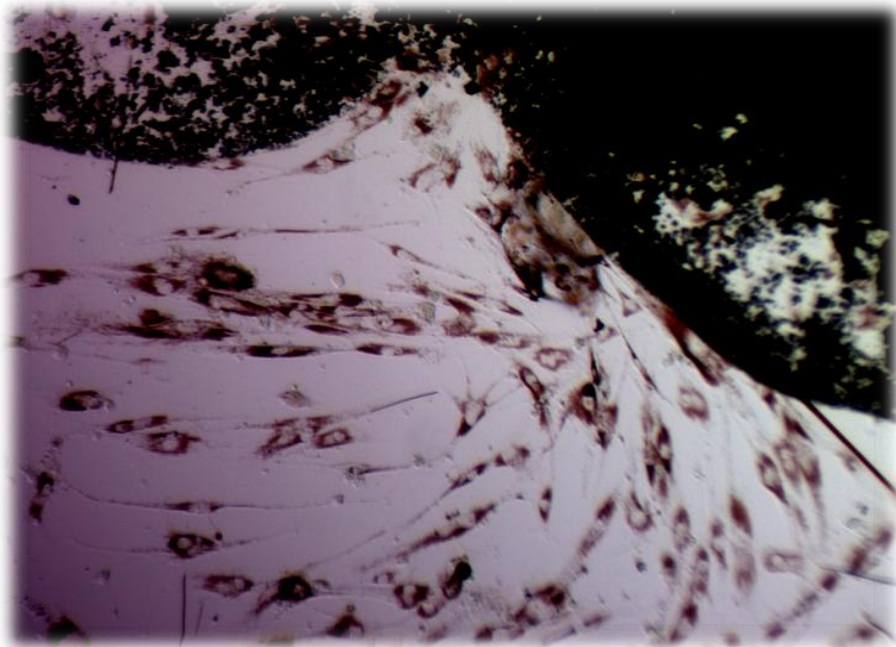
Табела 13. (%) Релативне вијабилности ћелија ($MV \pm SD$) након излагања ћелијске културе свеже замешаним испитиваним материјалима

Материјал & време	48 h	7-дан
ALBO-MPCA ₁	101,55±9,27	96,37±9,01
ALBO-MPCA ₂	104,26±13,09	83,56±3,87
GREY-MPCA	87,75±10,96	75,01±7,07
MTA ⁺	104,05±13,08	95,09±3,68
CH	66,04±8,54	56,16±8,72

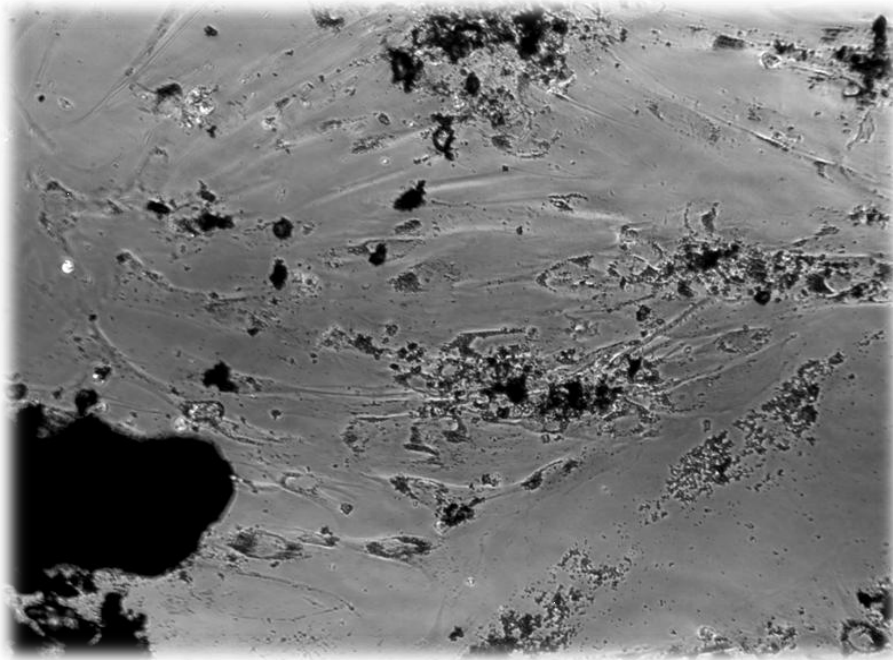
MV- средња вредност; SD- стандардна девијација



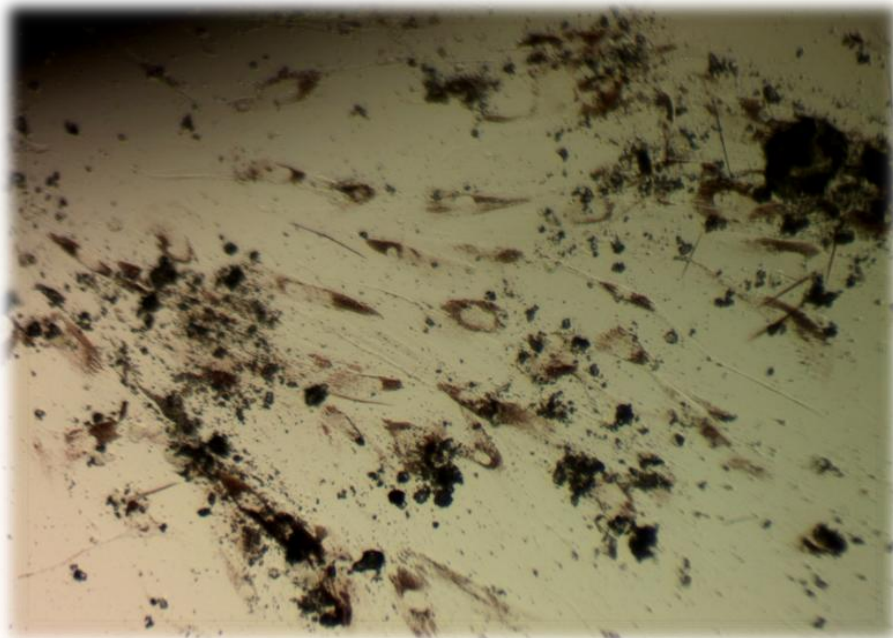
Слика 20. SCAP ћелијска култура, материјал ALBO-MPCSA₁ након 7 дана (инвертни микроскоп, ×10)



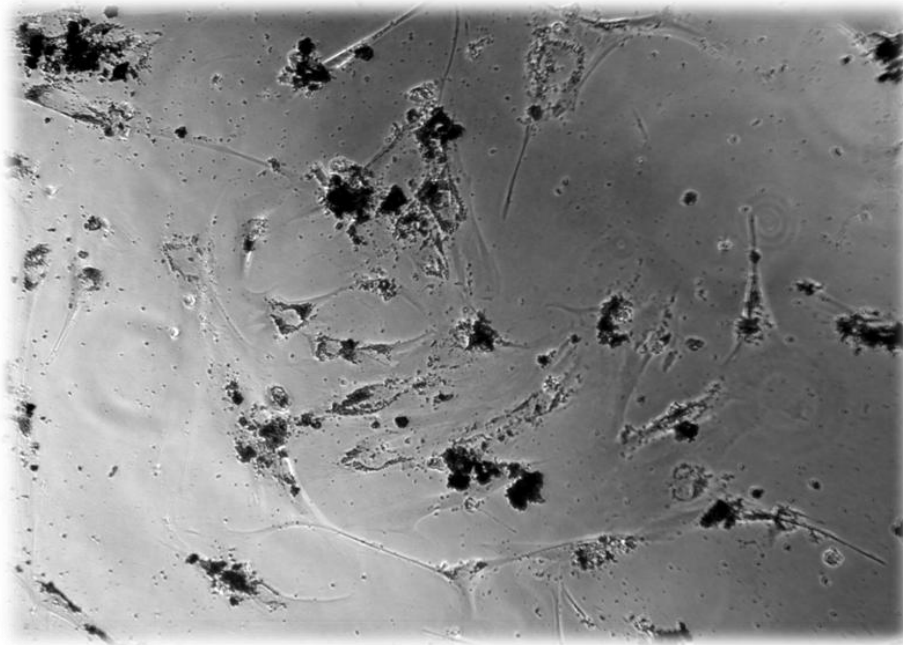
Слика 21. SCAP ћелијска култура, материјал ALBO-MPCSA₁ након 7 дана (NR, ×10)



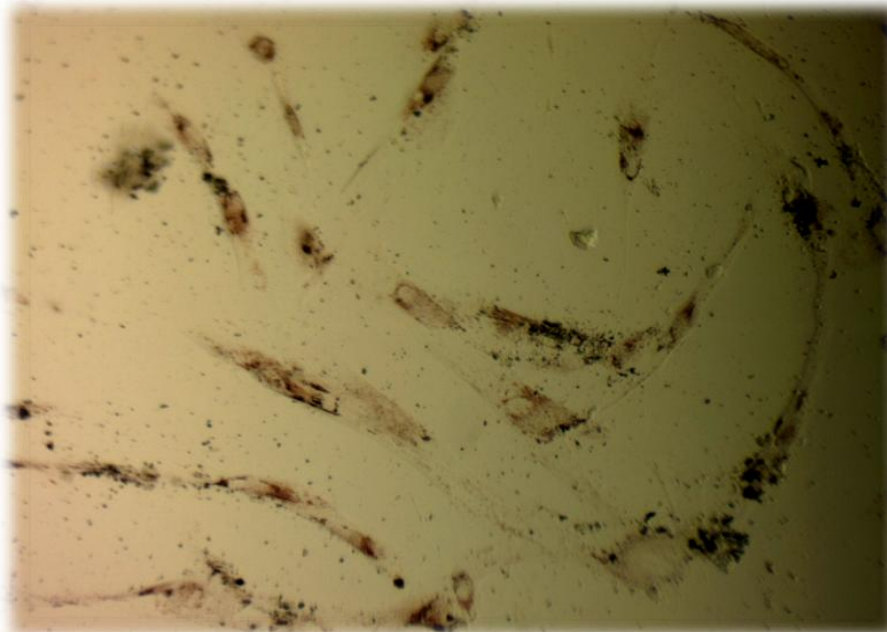
Слика 22. SCAP ћелијска култура, материјал ALBO-MPCs₂ након 7 дана (инвертни микроскоп, ×10)



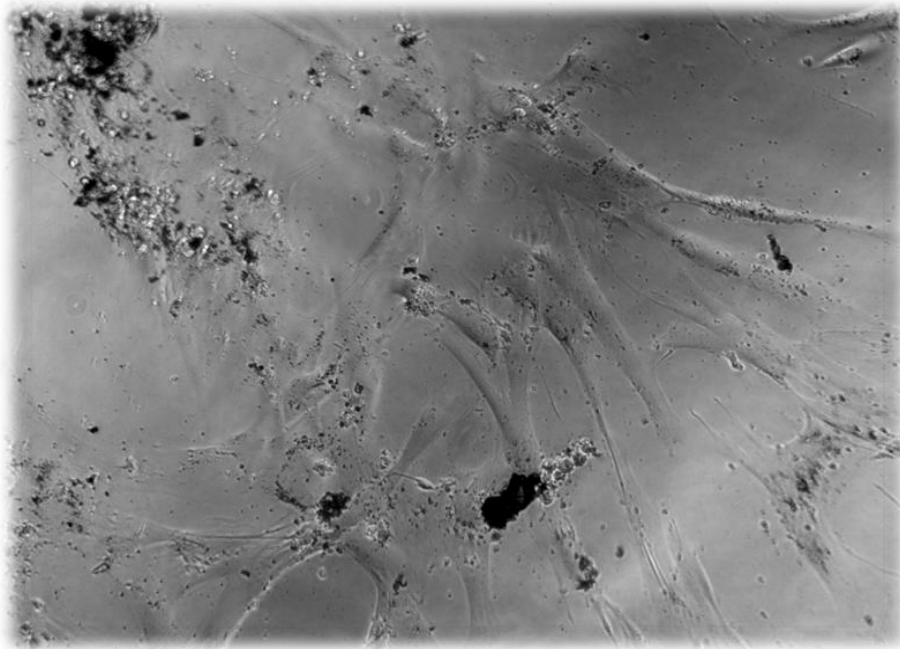
Слика 23. SCAP ћелијска култура, материјал ALBO-MPCs₂ након 7 дана (NR, ×10)



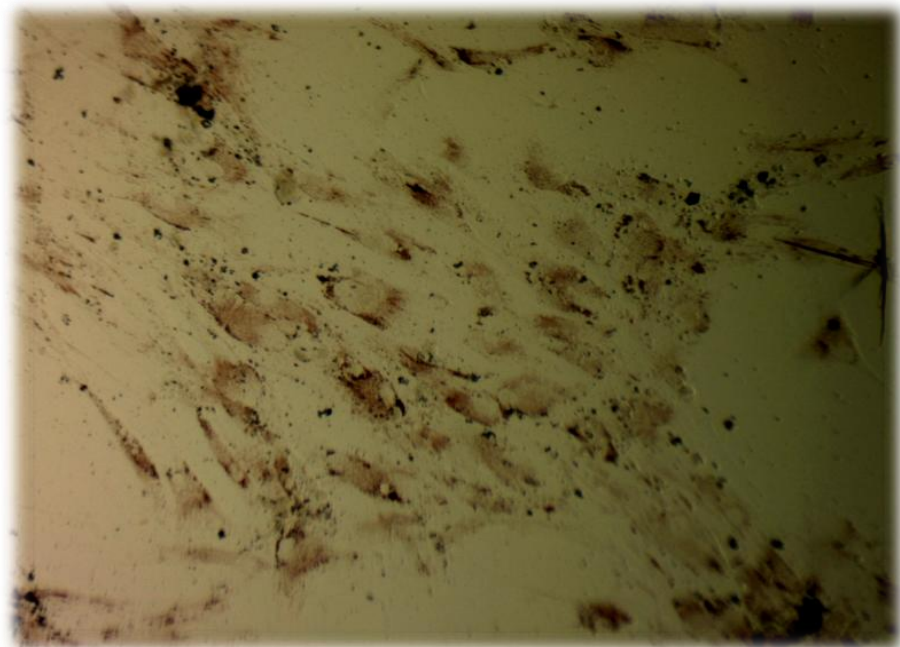
Слика 24. SCAP ћелијска култура, материјал GREY-MPCA након 7 дана (инвертни микроскоп, $\times 10$)



Слика 25. SCAP ћелијска култура, материјал GREY-MPCA након 7 дана (NR, $\times 10$)



Слика 26. SCAP ћелијска култура, материјал MTA⁺ након 7 дана
(инвертни микроскоп, ×10)



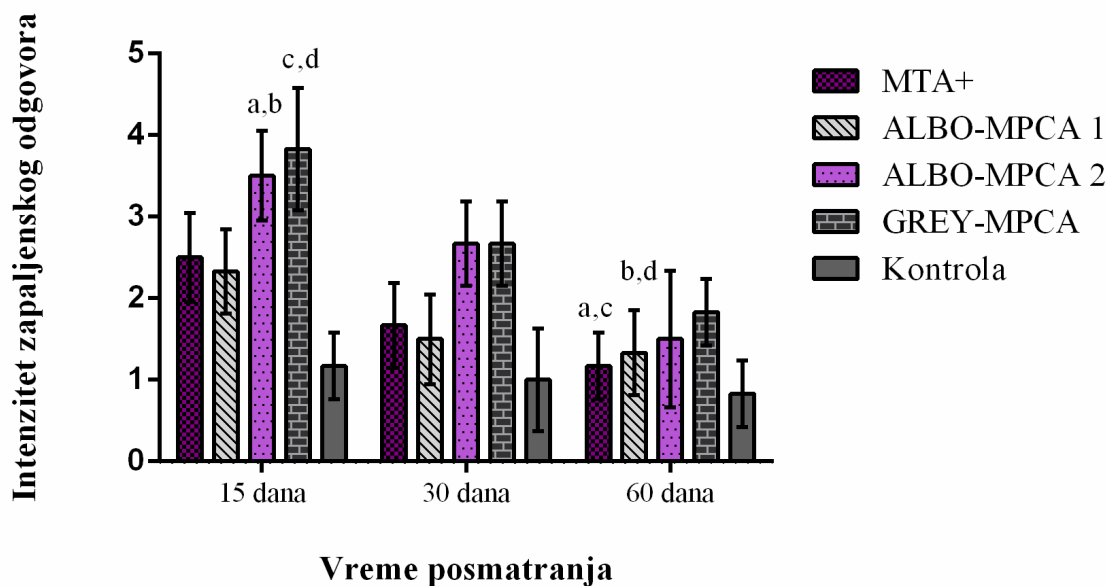
Слика 27. SCAP ћелијска култура, материјал MTA⁺ након 7 дана
(NR, ×10)

4.10. Резултати интрамишићне имплементације испитиваних материјала

Након експерименталног периода од 15 дана, средње вредности запаљенског одговора за материјале МТА⁺ и ALBO-MPCA₁ указивале су на благо до умерено запаљење, односно на умерено до интензивно запаљење за групе ALBO-MPCA₂ и GREY-MPCA. Статистички значајне разлике у интензитету запаљенског одговора у односу на контролну групу уочене су код испитиваних материјала ALBO-MPCA₂ и GREY-MPCA ($p < 0,05$). Средње вредности запаљенског одговора за материјале МТА⁺ и ALBO-MPCA₁ указивале су на благо запаљење, односно на благо до умерено запаљење за материјале ALBO-MPCA₂ и GREY-MPCA, 30 дана по имплементацији. Након експерименталног периода од 60 дана, средње вредности запаљенског одговора за све испитиване материјале указивале су на благо запаљење. Нису уочене статистички значајне разлике у интензитету запаљенског одговора између испитиваних материјала и контролних група након 30 и 60 дана ($p > 0,05$).

Статистички значајне разлике у интензитету запаљенског одговора између испитиваних материјала ALBO-MPCA₂ и GREY-MPCA након 15 дана регистроване су у односу на испитиване материјале ALBO-MPCA₁ и МТА⁺, 60 дана након имплементације ($p < 0,05$) (Графикон 11, Табела 14). Резултати хистопатолошке анализе приказани су на Сликама 28-42.

Анализирајући присуство циновских ћелија статистички значајне разлике уочене су једино између материјала МТА⁺ и GREY-MPCA након 15 дана ($p < 0,05$), док није било разлика у екстензији запаљењске реакције ($p > 0,05$). Честице ни једног материјала нису биле у значајно већем броју узорака расуте у ткиву даље од места имплементације.

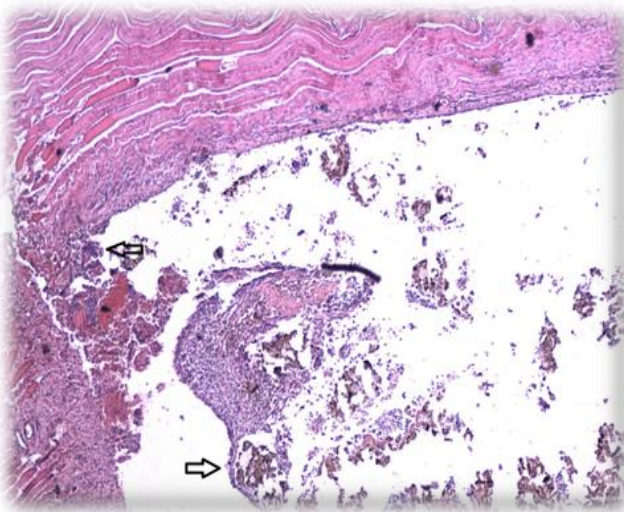


Графикон 11. Интензитет запаљенске реакције ткива након интрамишићне имплементације испитиваних материјала. Малим словима су означене статистички значајне разлике између испитиваних материјала.

Табела 14. Запаљенски одговор ткива ($MV \pm SD$) након интрамишићне имплементације испитиваних материјала

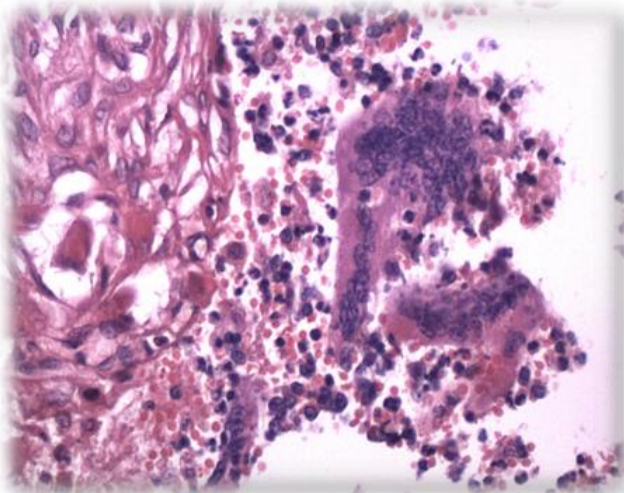
Материјал/Време	15 дана	30 дана	60 дана
MTA ⁺	2,50±0,55	1,67±0,52	1,17±0,41
ALBO-MPCA ₁	2,33±0,52	1,50±0,55	1,33±0,52
ALBO-MPCA ₂	3,50±0,55	2,67±0,52	1,50±0,84
GREY-MPCA	3,83±0,75	2,67±0,52	1,83±0,41
Контрола	1,17±0,41	1,00±0,63	0,83±0,41

MV- средња вредност; SD- стандардна девијација



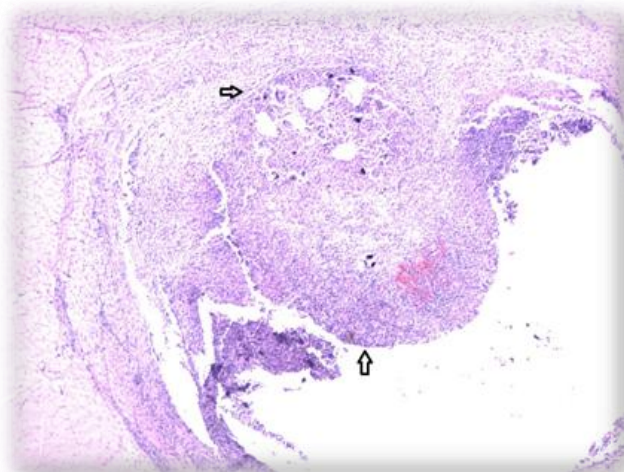
Слика 28. Материјал ALBO-MPCSA₁ 15 дана (HE, x16).

Фиброгрануломатозна пролиферација са интензивним запаљенским инфилтратом, расутим честицама материјала (црне стрелице) и околним мишићним ткивом без запаљенског инфилтрата.



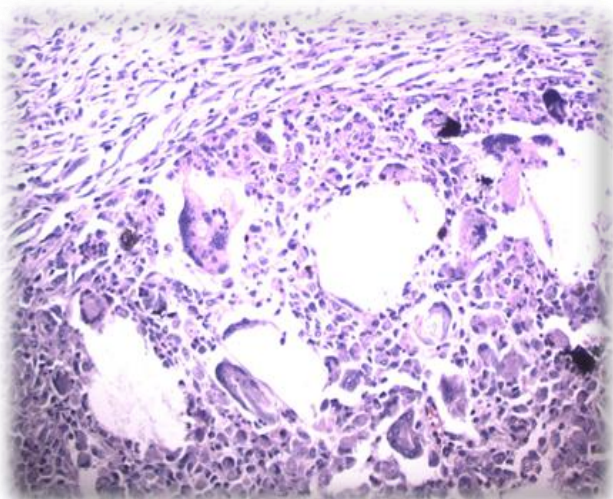
Слика 29. Материјал ALBO-MPCSA₁ 15 дана (HE, x40).

Детаљ са претходне слике. Циновске ћелије са запаљенским инфилтратом изграђеним од полиморфонуклеарних леукоцита и моноцита.



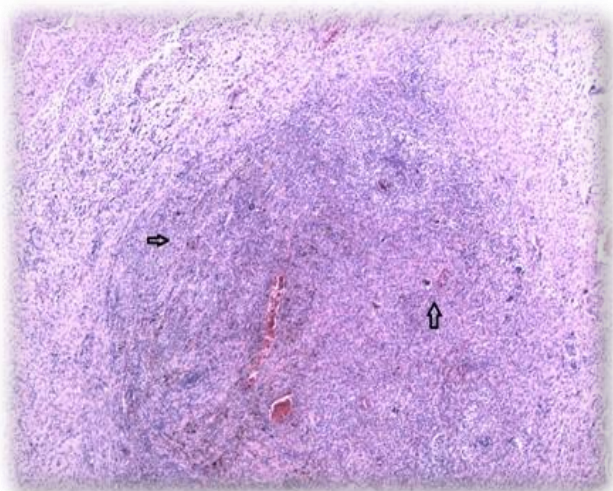
Слика 30. Материјал ALBO-MPCSA₁ 30 дана (HE, x4).

Фиброгрануломатозна пролиферација са умереним запаљенским инфилтратом (црне стрелице), јасно ограниченим од околног мишићног ткива без запаљенског инфилтрата.



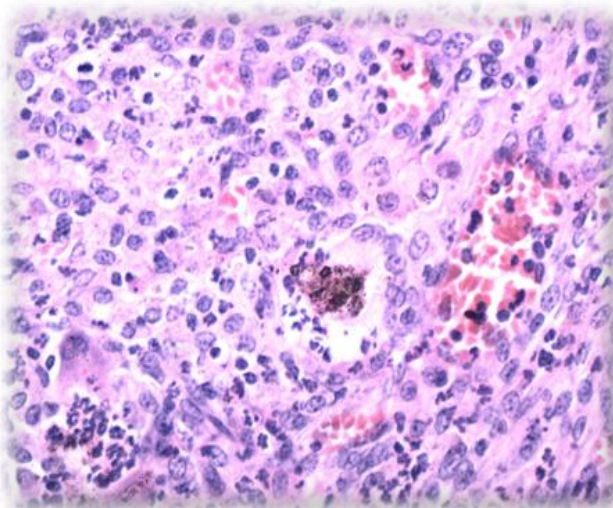
Слика 31. Материјал ALBO-MPCA₁ 30 дана (HE, x16).

Детаљ са претходне слике. Изражена макрофагна активност бројних циновских ћелија са запаљенским инфилтратом изграђеним од моноцита и полиморфонуклеарних леукоцита.



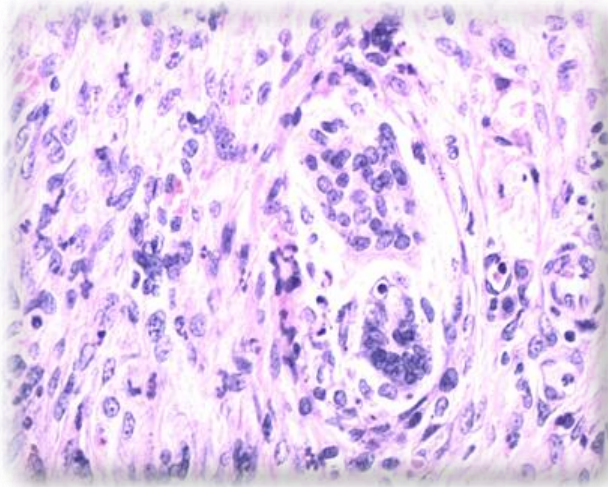
Слика 32. Материјал ALBO-MPCA₂ 30 дана (HE, x4).

Гранулом типа око страног тела (црне стрелице) са уочљивим честицама материјала и интензивним запаљенским инфилтратом.



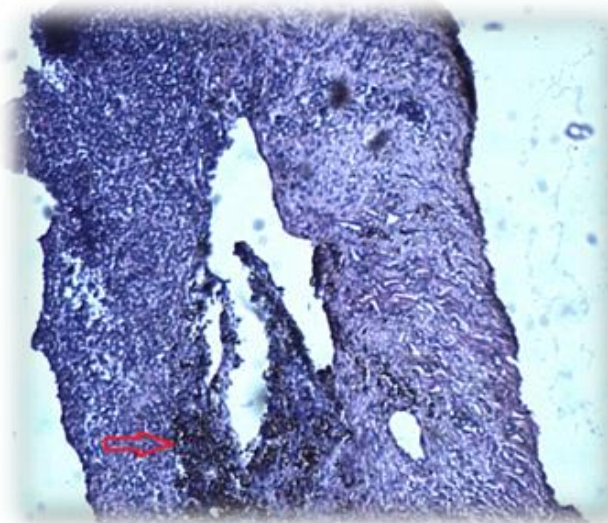
Слика 33. Материјал ALBO-MPCA₂ 30 дана (HE, x20).

Детаљ са претходне слике. Фагоцитоза испитиваног материјала са запаљенским инфилтратом изграђеним од полиморфонуклеарних леукоцита и моноцита.



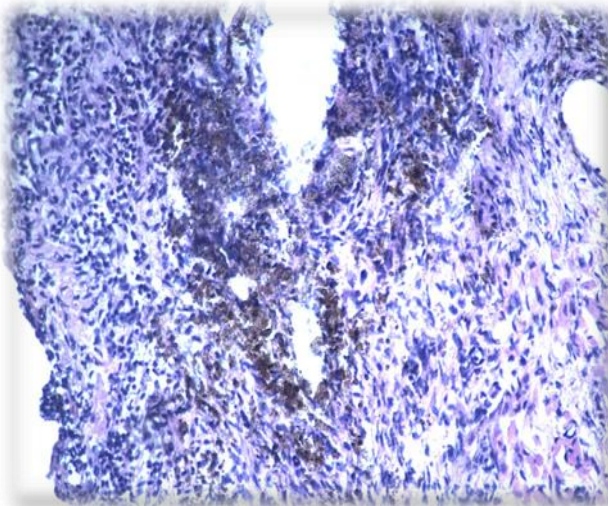
Слика 34. Материјал ALBO-MPCA₂ 30 дана (HE, x40).

Детаљ са претходне слике. Циновске ћелије типа око страног тела са запаљенским ћелијама расутим између фибробласта и колагених влакана.



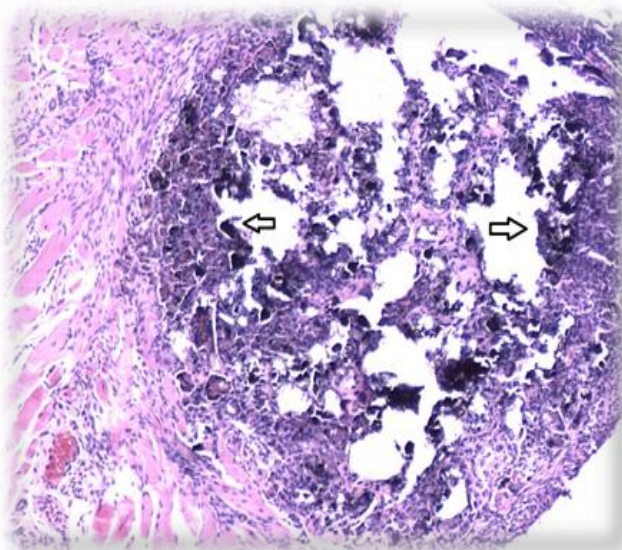
Слика 35. Материјал GREY-MPCA 15 дана (HE, x4).

Фиброгрануломатозна пролиферација са интензивним запаљенским инфилтратом (црвена стрелица) и фокално присутним материјалом, нејасно ограниченим од околног мишићног ткива



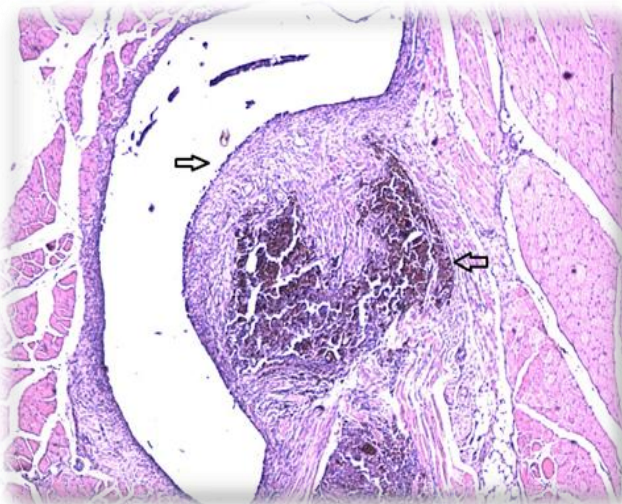
Слика 36. Материјал GREY-MPCA 15 дана (HE, x10).

Детаљ са претходне слике. Фиброгрануломатозна пролиферација са интензивним запаљенским инфилтратом и фокално присутним материјалом.



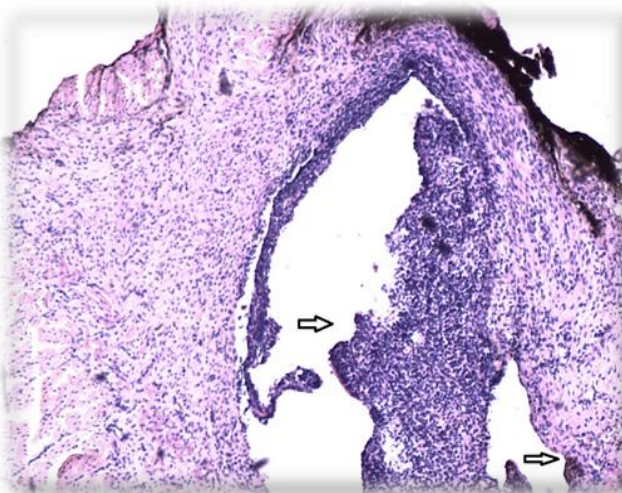
Слика 37. Материјал GREY-MPCA 60 дана (HE, x16).

Фиброгрануломатозна пролиферација са интензивним запаљенским инфилтратом и фокално присутним материјалом (црвене стрелице), нејасно ограниченим од околног мишићног ткива.



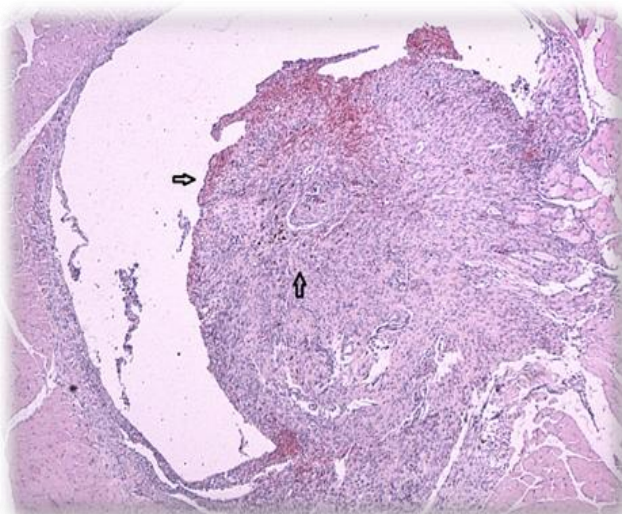
Слика 38. Материјал GREY-MPCA 60 дана (HE, x4).

Фиброгрануломатозна пролиферација са умереним запаљенским инфилтратом и фокално присутним материјалом (црне стрелице), нејасно ограниченим од околног мишићног ткива.



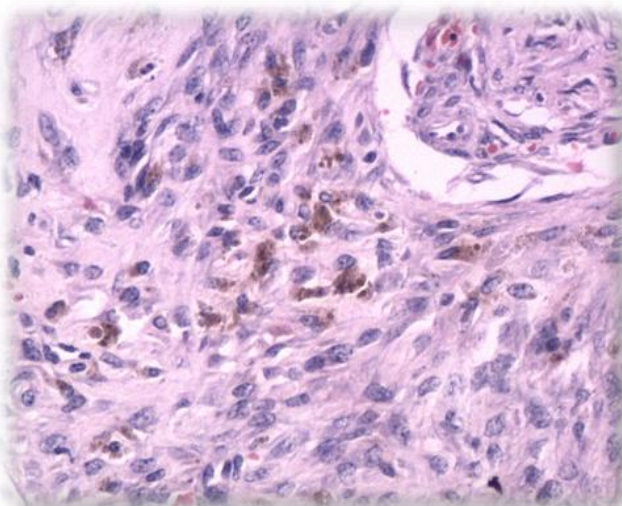
Слика 39. Материјал MTA⁺ 15 дана (HE, x4).

Фиброгрануломатозна пролиферација са интензивним запаљенским инфилтратом (црне стрелице), нејасно ограниченим од околног мишићног ткива.



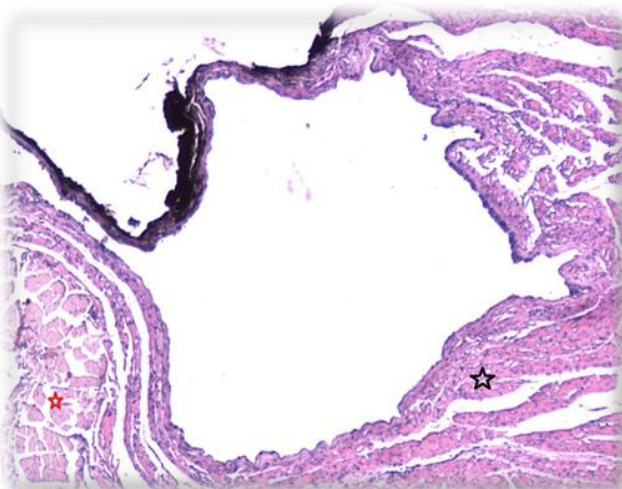
Слика 40. Материјал МТА⁺ 30 дана (HE, x4).

Фиброгрануломатозна пролиферација са умереним запаљенским инфилтратом (црне стрелице), јасно ограничена од околног мишићног ткива без запаљенског инфилтрата.



Слика 41. Материјал МТА⁺ 30 дана (HE, x20).

Детаљ са претходне слике. Расуте честице испитиваног материјала у директном контакту са фибробластима, колагеним влакнима и инфламаторним ћелијама.



Слика 42. Негативна контрола 60 дана (HE, x4).

Танка фиброзна капсула без запаљенског инфилтрата (црна звездица), јасно ограничена од околног мишићног ткива (црвена звездица).

4.11. Резултати интракоштане имплементације испитиваних материјала

Након експерименталног периода од 30 дана, средње вредности запаљенског одговара за све испитиване материјале указивале су на благо до умерено запаљење, односно 90 дана по имплементацији на благо запаљење (Графикон 12, Табела 15). Статистички значајне разлике у интензитету запаљенског одговора у односу на контролу групу уочене су код сви испитиваних материјала ($p < 0,05$), осим у случају ALBO-MPCA₁ након 90 дана. Анализирајући екстензију запаљења и присуство циновских ћелија нису утврђене статистички значајне разлике између материјала ($p > 0,05$).

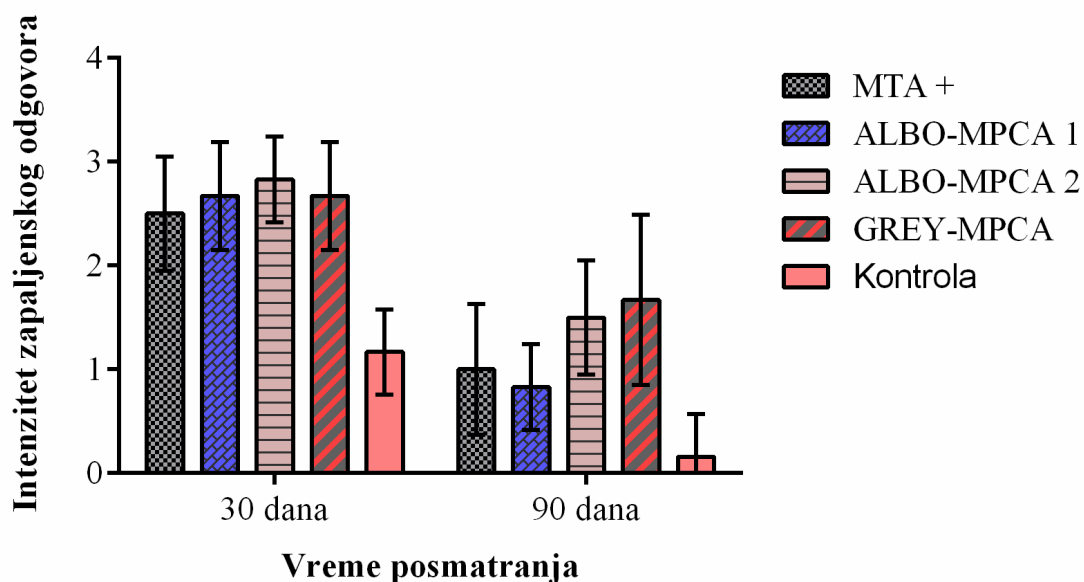
У већини узорака ALBO-MPCA₁ након 30 дана, новостворено калцификовано ткиво је било трабекуларне грађе, непотпуно минерализовано са минималним дисконтинуитетима (*Оцена 2*) и минимално присутним фиброваскуларним фокусима. Доминирала је директна веза новоформираног ткива и испитиваног материјала (83,3%). Након 90 дана новостворено калцификовано ткиво је било трабекуларне континуиране грађе (*Оцена 3*), при чему се није мењала природа везе између материјала и новоформираног коштаног ткива (Слике 43-46, 55-57).

У већини узорака ALBO-MPCA₂ након 30 дана, новоформирано калцификовано ткиво је било трабекуларне грађе, непотпуно минерализовано са присутним дисконтинуитетима (*Оцена 2*) и израженим фиброваскуларним фокусима. Доминирала је мешовита веза новоформираног ткива и испитиваног материјала (83,3%). Након 90 дана новостворено калцификовано ткиво је било трабекуларне континуиране грађе (*Оцена 3*), са мање фиброваскуларних фокуса уз углавном присутну мешовиту везу (66,6%); односно у случају два узорка уочена је директна веза између испитиваног материјала и новоформираног коштаног ткива (Слике 47, 48, 58).

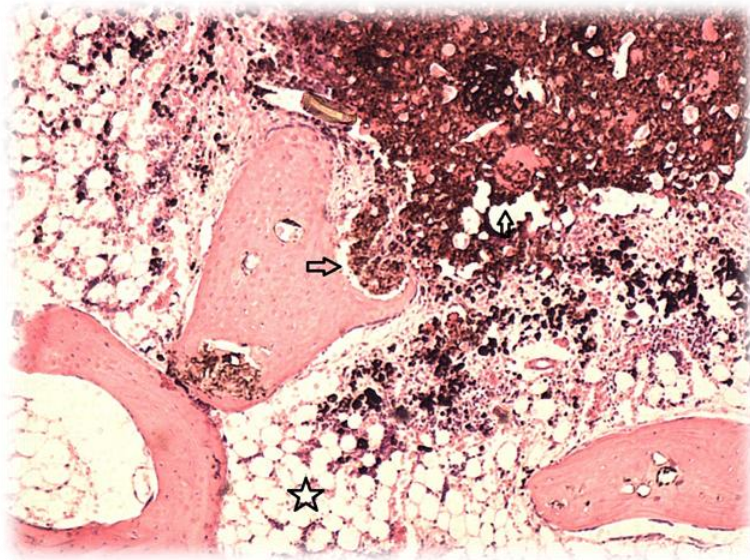
У половини узорака GREY-MPCA након 30 дана, новостворено калцификовано ткиво је било трабекуларне континуиране грађе (*Оцена 3*), уз уочљиву директну везу са новоформираним ткивом (100%), односно у два узорка са минималним дисконтинуитетима (*Оцена 2*) и умерено присутним фиброваскуларним фокусима.

Након 90 дана новостворено калцификовано ткиво је у већини узорака било трабекуларне континуиране грађе (Оцена 3), са минимално фиброваскуларних фокуса (Слике 49-52, 59, 60).

У већини узорака МТА⁺ након 30 дана, новостворено калцификовано ткиво је било трабекуларне континуиране грађе (Оцена 3). Испитивани материјал МТА⁺ оставаривао је директну везу са новоформираним коштаном ткивом (100%). Након 90 дана хистопатолошки налаз се није значајно разликовао, као ни природа везе материјала и новоформираног коштаног ткива (Слике 53, 54, 61, 62), док је у већини узорака материјал био ресорбован у највећој мери.

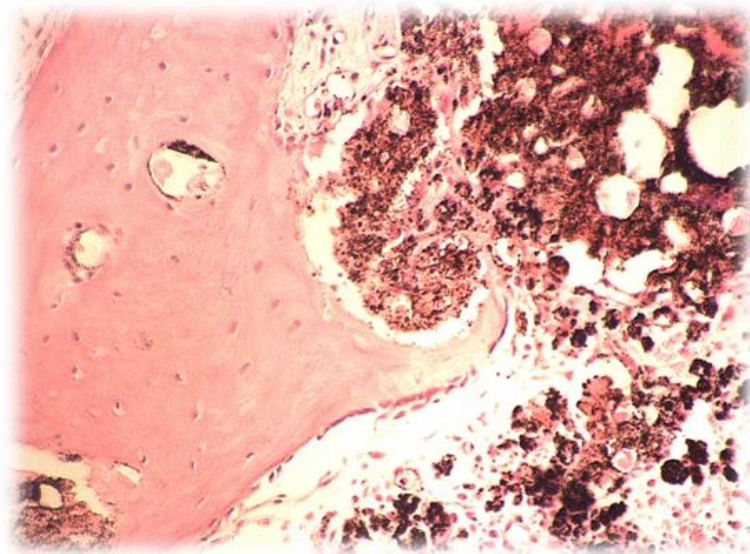


Графикон 12. Интензитет запаљенске реакције након интракоштане имплементације испитиваних материјала



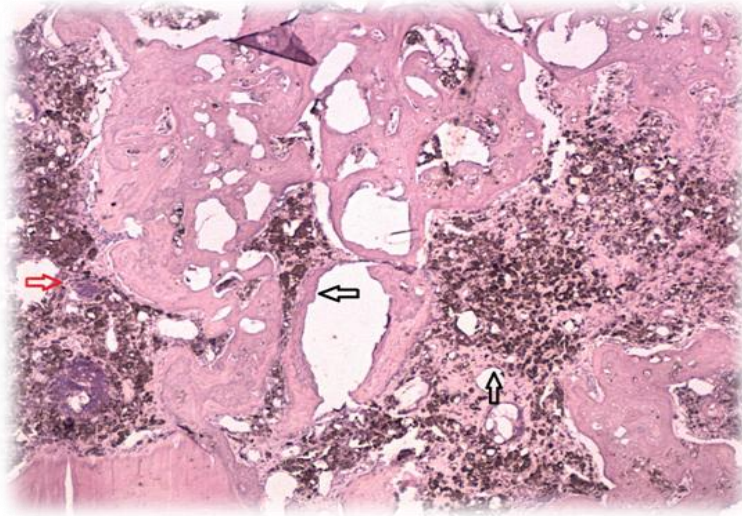
Слика 43. Материјал ALBO-MPC₁ 30 дана (HE, x16).

Новоформирано коштано ткиво трабекуларне грађе у директном контакту са материјалом (црне стрелице) и мононуклеарним лимфоцитним инфилтратом (црна звездица).



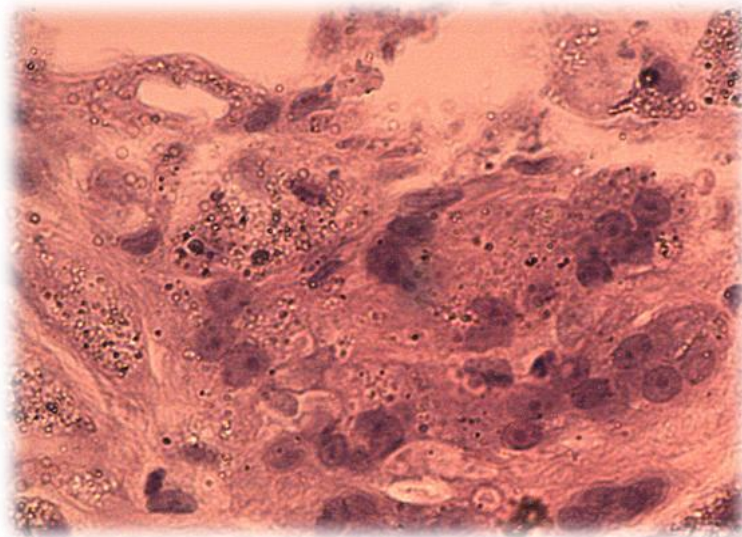
Слика 44. Материјал ALBO-MPC₁ 30 дана (HE, x20).

Детаљ са претходне микрофотографије. Директан контакт материјала и новоформираног коштаног ткива.



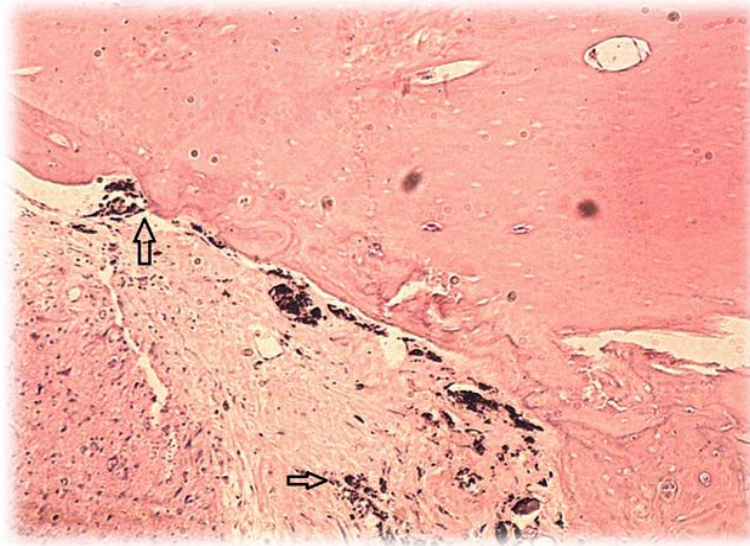
Слика 45. Материјал ALBO-MPCA₁ 90 дана (HE, x16).

Новоформирано коштано ткиво са фокално присутним материјалом у директном контакту (црне стрелице) и гранулационим ткиво са бројним хистиоцитима и циновским ћелијама (црвена стрелица).

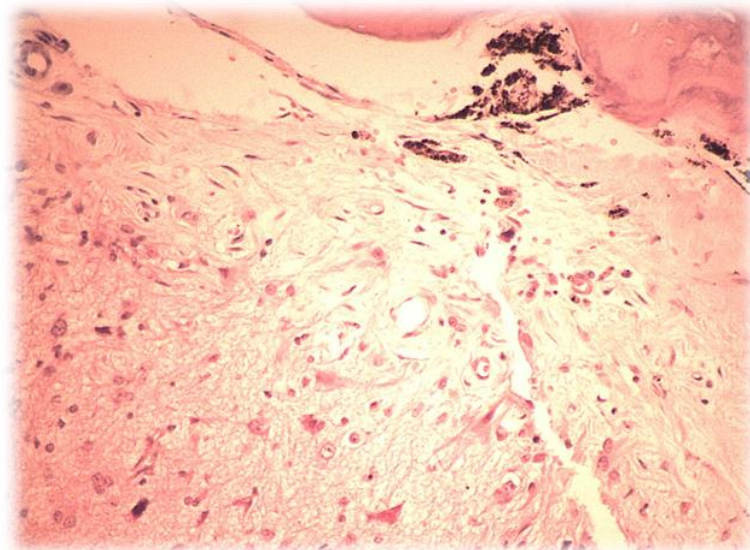


Слика 46. Материјал ALBO-MPCA₁ 90 дана (HE, x40).

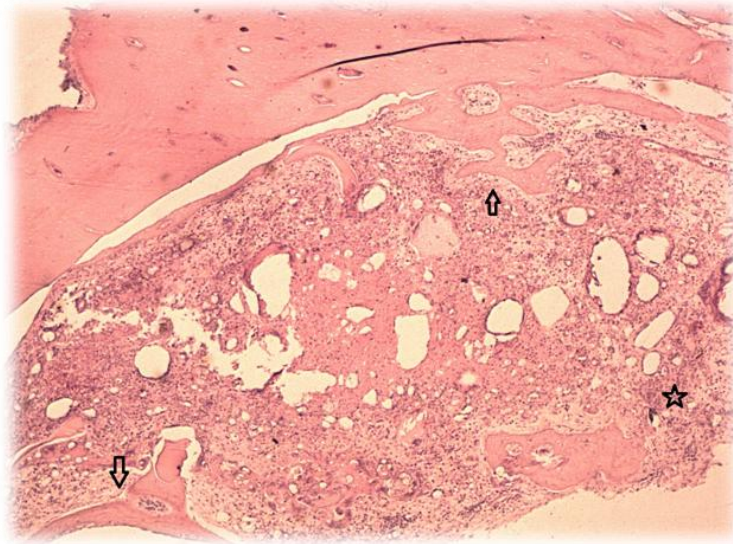
Детаљ са претходне микрофотографије. Циновска мултиједарна ћелија са фагоцитованим честицама материјала.



Слика 47. Материјал ALBO-MPCSA₂ 90 дана (HE, x16).
Новоформирано трабекуларно коштано ткиво са бројним остеобластима у директном и индиректном контакту са материјалом (црне стрелице).

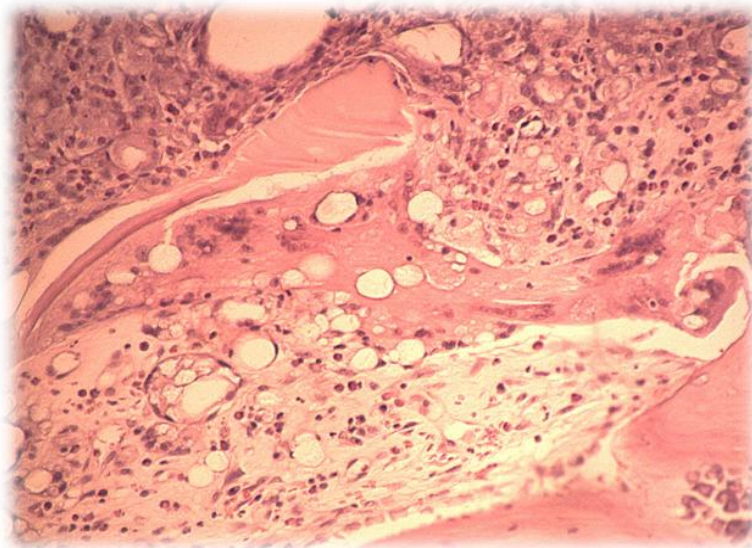


Слика 48. Материјал ALBO-MPCSA₂ 90 дана (HE, x20).
Детаљ са претходне микрофотографије. Директан контакт материјала и новоформираног коштаног ткива.



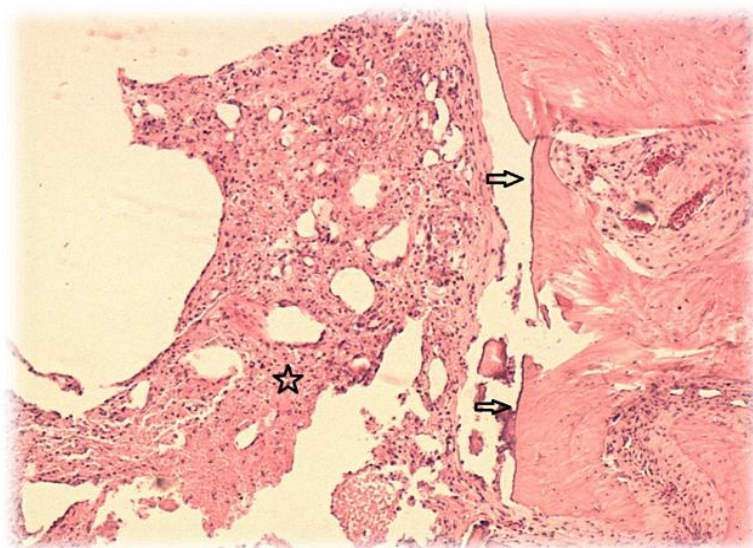
Слика 49. Материјал GREY-MPCSA 30 дана (HE, x4).

Новоформирано трабекуларно коштано ткиво са бројним остеобластима (црне стрелице), и гранулационим ткивом са бројним еозинофилима (црна звездица).



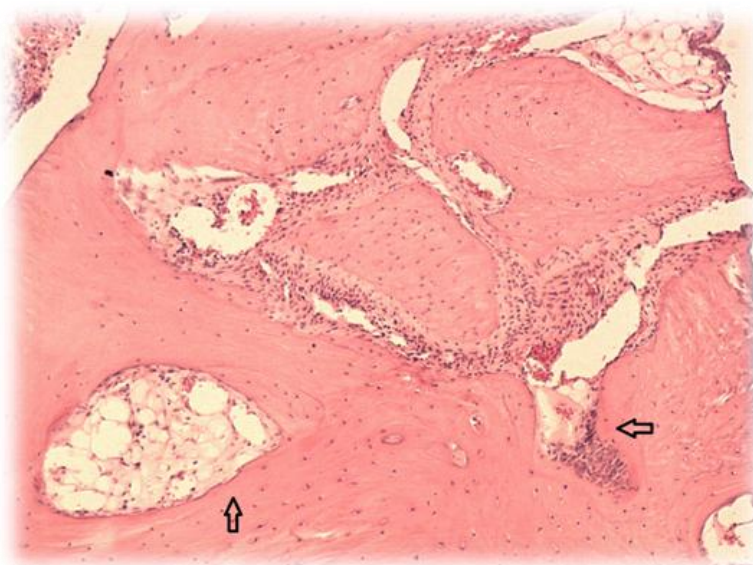
Слика 50. Материјал GREY-MPCSA 30 дана (HE, x20).

Детаљ са претходне слике. Стварање калцификованог ткива са јасно уочљивим остеобластима.



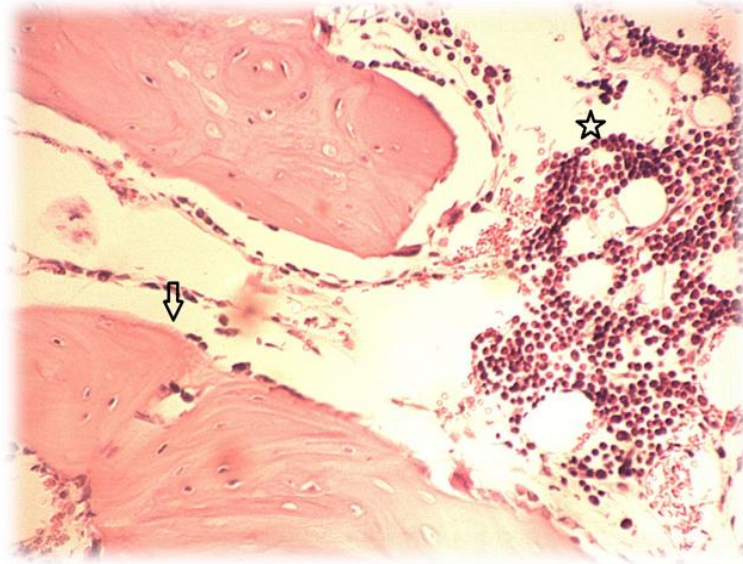
Слика 51. Материјал GREY-MPCSA 90 дана (HE, x16).

Новоформирано трабекуларно коштано ткиво са остеобластима на периферији (црне стрелице) и гранулационим ткивом са појединачним хистиоцитима (црна звездица).



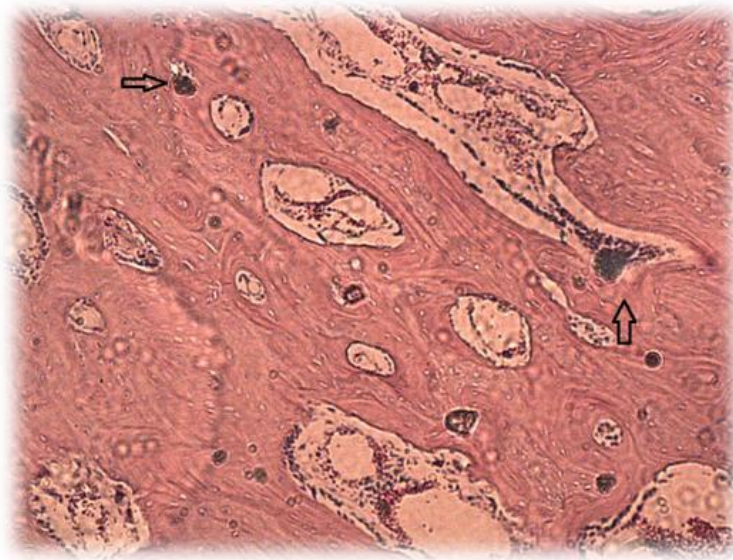
Слика 52. Материјал GREY-MPCSA 90 дана (HE, x16).

Новоформирано коштано ткиво трабекуларне грађе, регуларно минерализовано, са бројним остеоцитима у лакунама и остеобластима на периферији (црне стрелице).



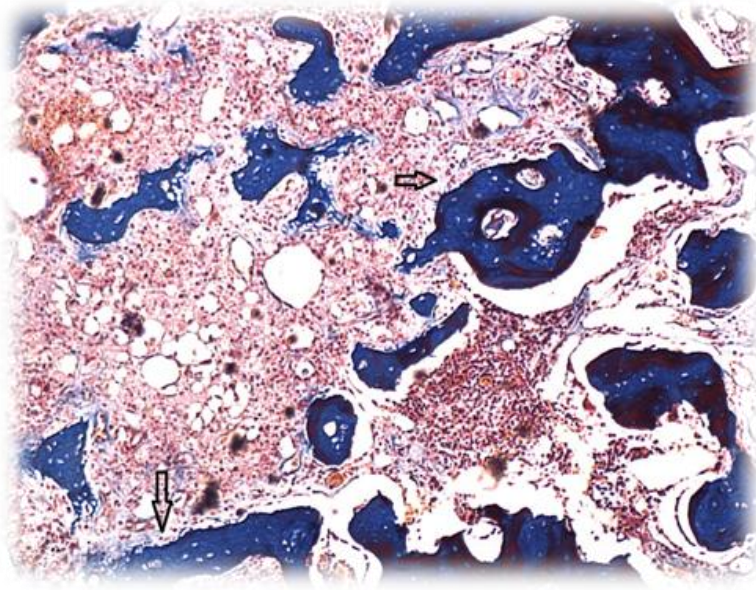
Слика 53. Материјал МТА⁺ 30 дана (HE, x4).

Новоформирано трабекуларно коштано ткиво са остеобластима на периферији (црна стрелица), груписаним хистиоцитима и малобројним плазмоцитима (црна звезда).

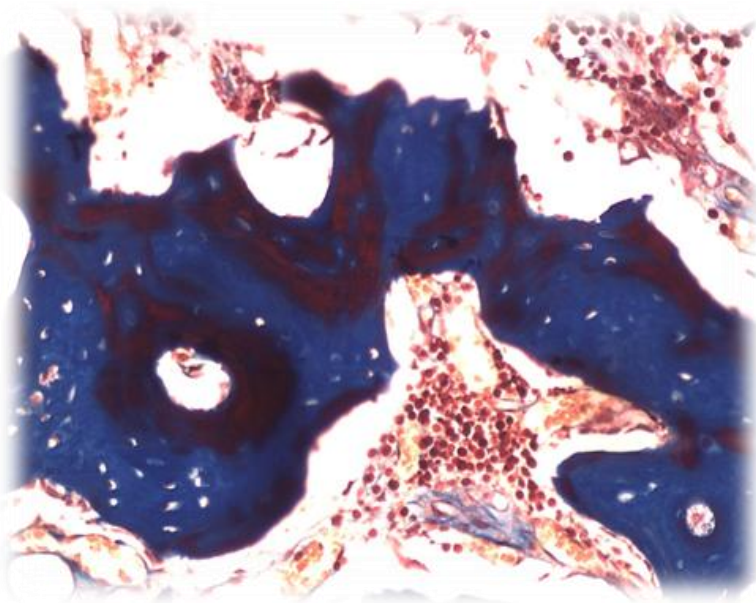


Слика 54. Материјал МТА⁺ 90 дана (HE, x16).

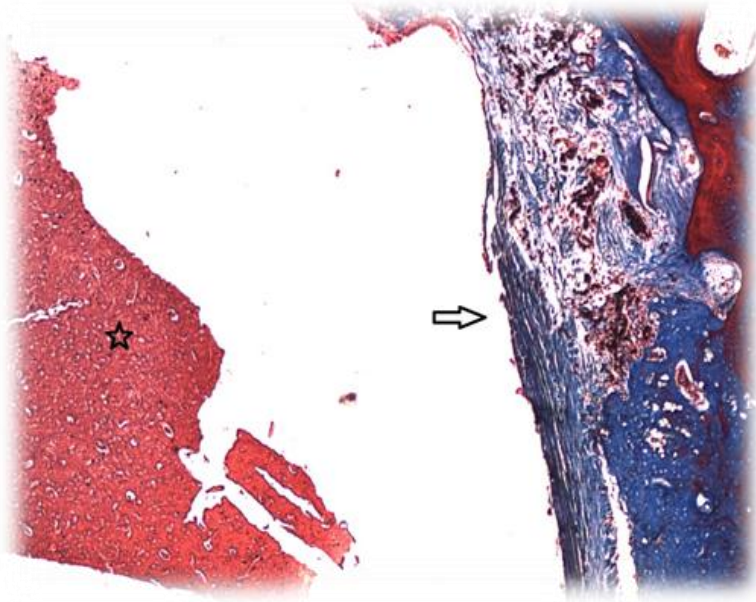
Новоформирано коштано ткиво трабекуларне грађе и регуларне минерализације у директном контакту са материјалом (црне стрелице) и груписаним хистиоцитима.



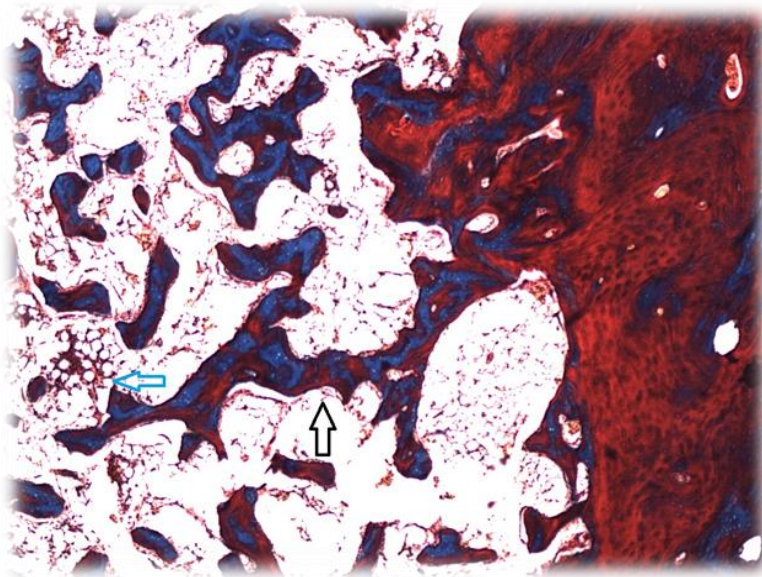
Слика 55. Материјал ALBO-MPCA₁ 30 дана (trichrome-Masson, x16).
Новостворено коштано ткиво трабекуларне грађе (црне стрелице) прожето фокусима
фиброваскуларне пролиферације.



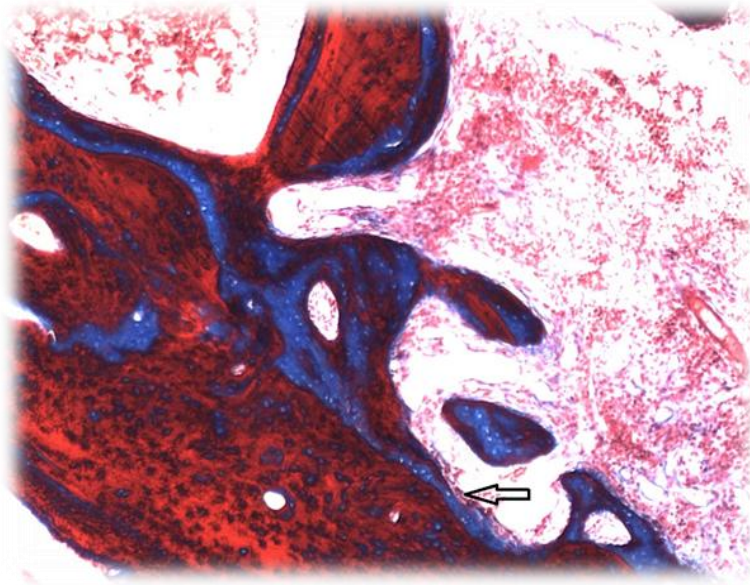
Слика 56. Материјал ALBO-MPCA₁ 30 дана (trichrome-Masson, x20).
Детаљ са претходне слике. Новоформирано хиперцелуларно коштано ткиво
трабекуларне грађе



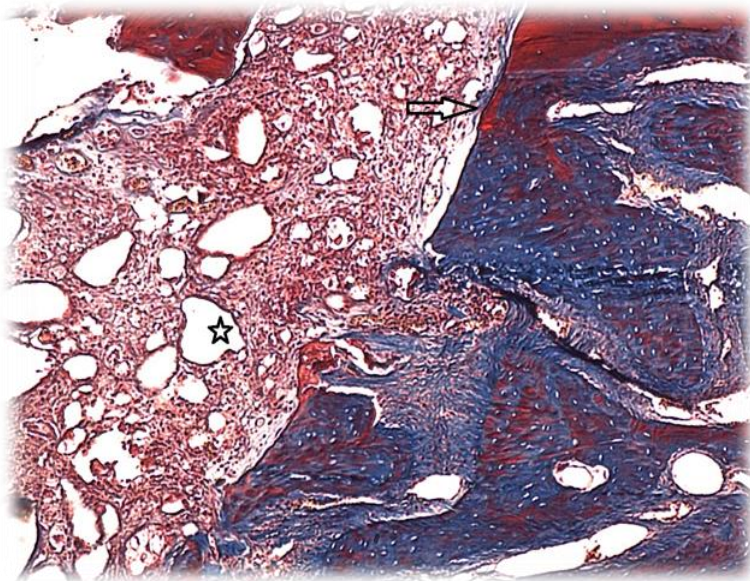
Слика 57. Материјал ALBO-MPCA₁ 90 дана (trichrome-Masson, x4).
Новоформирано трабекулрано коштано ткиво у директном контакту са остацима материјала (црна стрелица), организована фиброплазија (црна звездица).



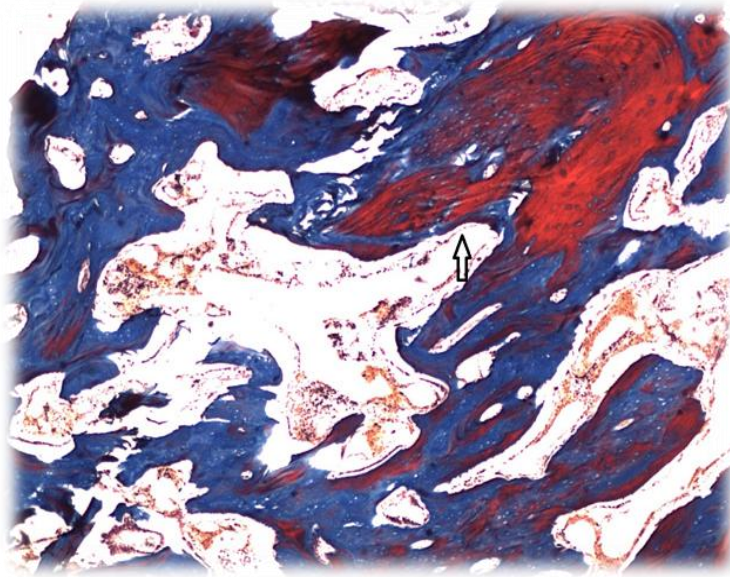
Слика 58. Материјал ALBO-MPCA₂ 90 дана (trichrome-Masson, x4).
Новоформирано коштано ткиво трабекуларне грађе (црна стрелица) са диспергованим честицама материјала (плава стрелица).



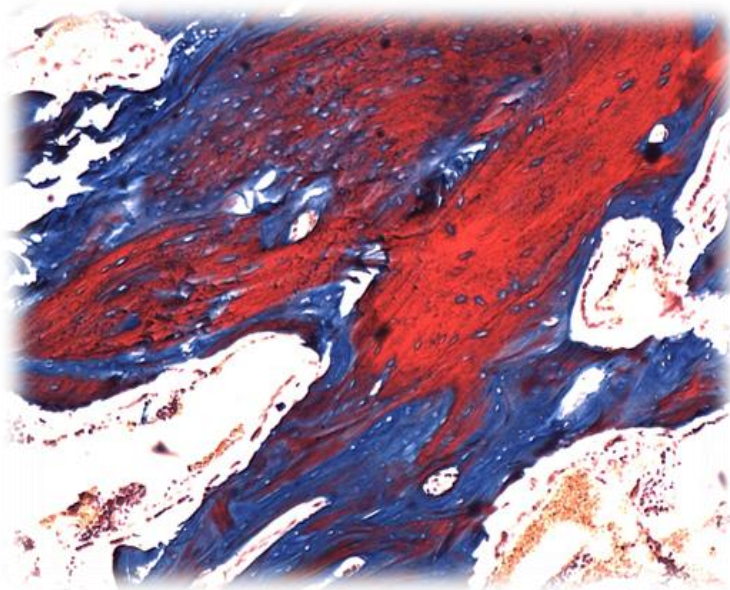
Слика 59. Материјал GREY-MPCA 30 дана (trichrome-Masson, x16).
Новоформирано трабекуларно коштано ткиво са честицама материјала у директном контакту (црна стрелица).



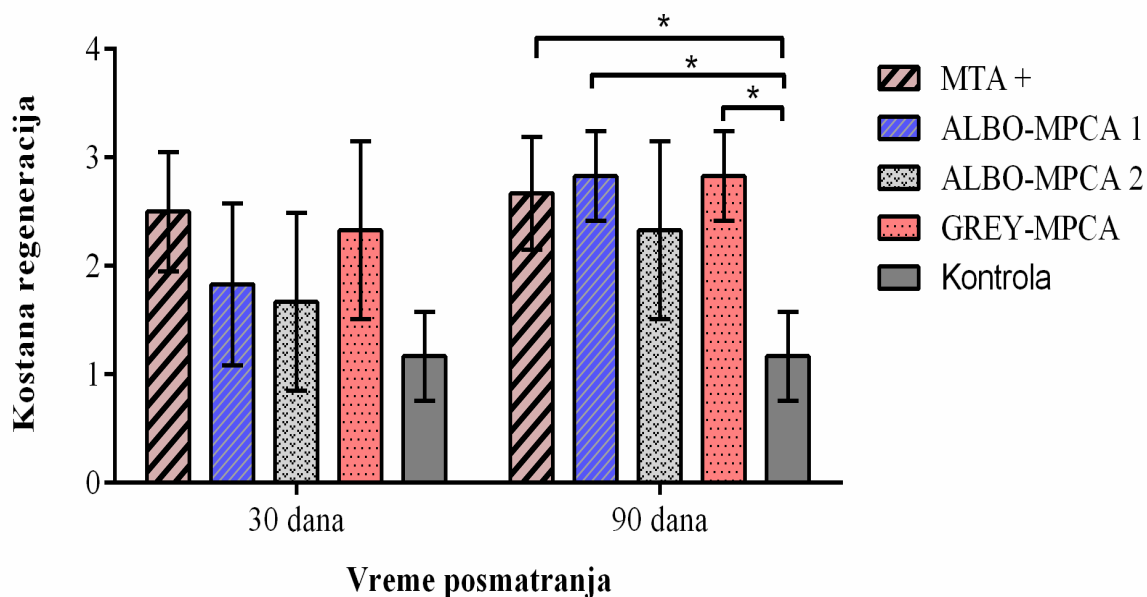
Слика 60. Материјал GREY-MPCA 90 дана (trichrome-Masson, x16).
Новоформирано коштано ткиво трабекуларне грађе у директном контакту са материјалом (црна стрелица) и организованим гранулационим ткивом (црна звездица).



Слика 61. Материјал МТА⁺ 30 дана (trichrome-Masson, x4).
Новоформирано коштано ткиво трабекуларне грађе са честицама материјала у директном контакту (црна стрелица).



Слика 62. Материјал МТА⁺ 30 дана (trichrome-Masson, x16).
Детаљ са претходне слике. Новоформирано хиперцелуларно коштано ткиво.



Графикон 13. Интензитет коштане регенерације након имплементације испитиваних материјала. Звездицама су означене статистички значајне разлике.

Табела 15. Резултати интракоштане имплементације испитиваних материјала (MV±SD)

Време/ Материјал	30 дана			90 дана		
	IIR	BR	FBR	IIR	BR	FBR
MTA ⁺	2,50±0,55	2,50±0,55	0,17±0,33	1,00±0,63	2,83±0,41	0
ALBO-MPCA ₁	2,67±0,52	1,83±0,75	0,41±0,52	0,83±0,41	2,83±0,41	0
ALBO-MPCA ₂	2,83±0,41	1,67±0,82	0,17±0,33	1,50±0,55	2,33±0,82	0,17±0,33
GREY-MPCA	2,67±0,52	2,33±0,82	0,41±0,52	1,67±0,82	2,83±0,41	0
Контрола	1,17±0,41	1,17±0,41	0	0,16±0,41	1,83±0,75	0

IIR- интензитет запаљенске реакције, FBR- присуство циновских ћелија типа око страног тела, BR- коштана регенерација, MV- средња вредност; SD- стандардна девијација

Статистички значајне разлике у погледу коштане регенерације уочене су након 90 дана између испитиваних материјала МТА⁺, GREY-MPCА, ALBO-MPCА₁ и контролне групе ($p < 0,05$; Графикон 13, Табела 15). Статистичком анализом нису утврђене значајне разлике између материјала у погледу континуитета новоствореног калцификованог ткива, његове морфологије и природе везе материјала и новоствореног коштаног ткива ($p > 0,05$).

4.12. Резултати директног прекривања пулпе зуба

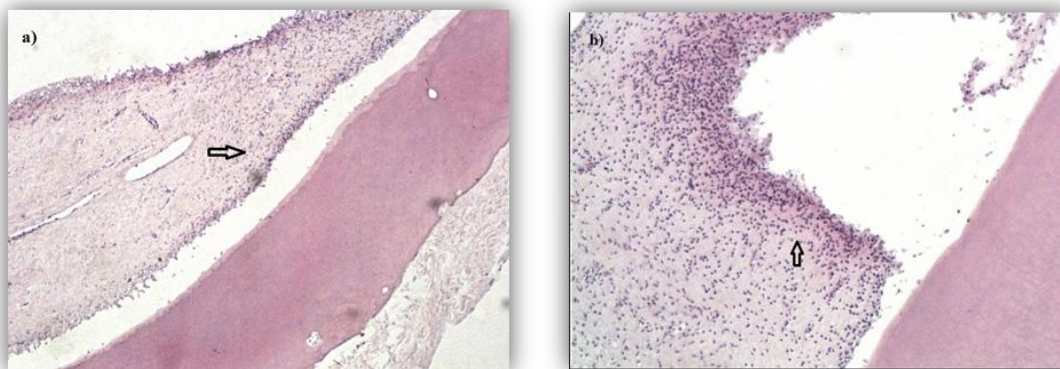
Резултати директног прекривања пулпе екстрахованих хуманих зуба након експерименталног периода од 15 дана, указивале су на умерено запаљење за групе МТА⁺ и ALBO-MPCА₁, односно на интензивно запаљење за групе ALBO-MPCА₂ и GREY-MPCА. Статистички значајне разлике у интензитету запаљенског одговора уочене су између GREY-MPCА и ALBO-MPCА₁, односно GREY-MPCА и МТА⁺ ($p < 0,05$).

Након експерименталног периода од 30 дана, средње вредности запаљенског одговара за групе МТА⁺ и ALBO-MPCА₁ указивале су на благо до умерено запаљење, односно на умерено до интензивно запаљење за групе ALBO-MPCА₂ и GREY-MPCА (Графикон 14, Табела 16). Резултати хистопатолошке анализе приказани су на Сликама 63-64.

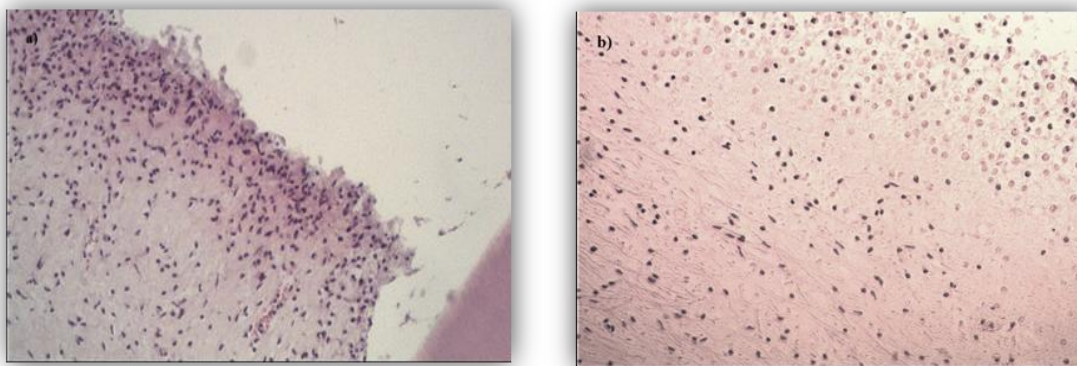
Табела 16. Инфламаторни одговор ткива (MV±SD) након директног прекривања пулпе

Материјал/Време	15 дана	30 дана
МТА ⁺	2,50±0,55	2,33±0,52
ALBO-MPCА ₁	2,67±0,52	2,67±0,82
ALBO-MPCА ₂	3,50±0,55	3,00±0,63
GREY-MPCА	3,83±0,75	3,33±0,52

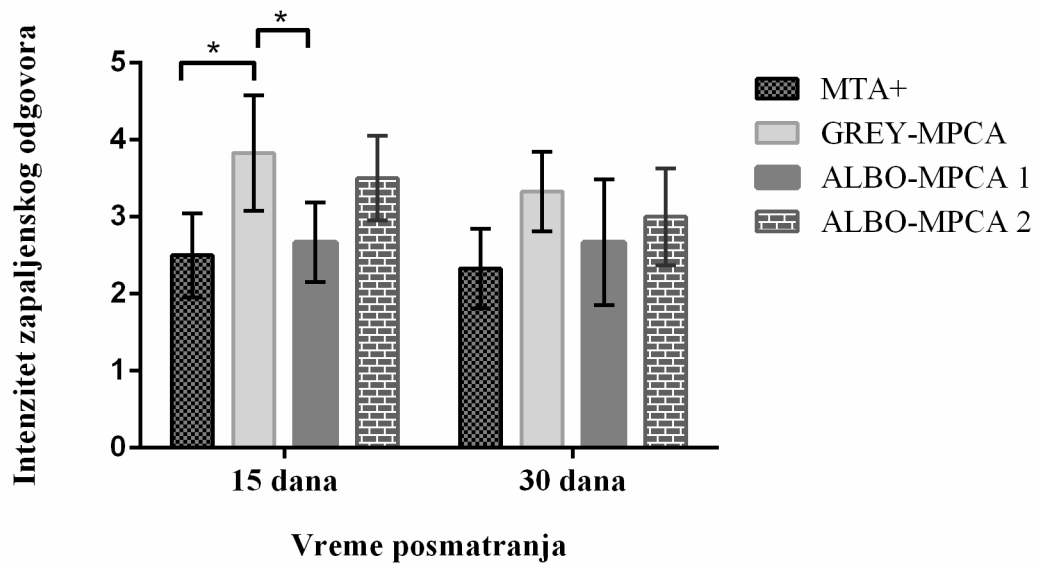
MV- средња вредност; SD- стандардна девијација



Слика 63. а) Директно прекривање пулпе, материјал ALBO-MPCA₂, 15 дана. Очуваност одонтбластног слоја (црна стерлица; HE, x4); б) Директно прекривање пулпе, материјал ALBO-MPCA₁, 15 дана. Запаљенска реакција пулпног ткива непосредно испод места пласирања материјала (црна стрелица;



Слика 64. а) Директно прекривање, материјал GREY-MPCA, 15 дана. Интензивна запаљенска реакција (HE, x20); б) Директно прекривање, материјал MTA⁺, 15 дана. Умерена запаљенска реакција (HE, x20).



Графикон 14. Интензитет запаљенске реакције након директног прекривања пулпе зуба

5. Дискусија

5. Дискусија

Иако FDA дефинише денталне материјале као медицинска средства у смислу испитивања њихове биокомпатибилности, реално је очекивати да ће се ти ставови у будућности променити ако узмемо у обзир чињеницу да неки дентални материјали јасно остварују своје примарне ефекте хемијским путем. Узмимо за примере антикариогени ефекат глас-јономер цемената реализован путем ослобађања флуорида; способност имплантата да индукују стварање новог коштаног ткива или способност МТА и калцијум-хидроксида да стимулишу стварање терцијарног дентина.

Препоручени као прва инстанца у испитивању биокомпатибилности новог материјала, *in vitro* тестовима је могуће контролисати услове гајења ћелија и њихову интеракцију са материјалом, али и детаљно и прецизно мерити ћелијски одговор. *In vitro* тестови су ефикасни, нису скупи и подложни су лакој репродукцији. С друге стране, *in vitro* тестови нису довољно релевантни за клиничку употребу материјала и подразумевају дефинисање низа варијабли (ISO 10993-1).

И поред законских норматива и финансијских аспеката, анимали модели за испитивање биокомпатибилности могу бити тако конструисани да опонашају клиничку употребу материјала до одређене мере, генерално су јефтинији од клиничких тестова, захтевају мање времена за реализацију и у већој мери могу бити контролисани. Поред тога, животиње могу бити изложене дејству материјала или њиховим продуктима у дозама и путевима администрације у различитим стадијумима живота које из етичких разлога није могуће применити на човеку (Schmalz, 1997).

Потенцијална могућност да маскирају неки од важних биолошких одговора лежи у неколико специфичних недостатака тестова биокомпатибилности на анималим моделима. Као прво, биолошки одговор различитих врста на испитивани материјал може бити драматично различит. Друго, ограничења у дизајнирању анималних модела који ће у потпуности опонашати интеракцију човек - материјал чини ове тестове мање релевантним. Интерпретација одговора може да буде изузетно

комплексна због симултаног одвијања бројних процеса у организму експериментане животиње. Тако крајњи одговор ткива може бити јасан, али допринос појединачних механизма који се одвијају тешко је рашчланити (Wataha, 2012).

Тестови на анималим моделима намећу неколико јединствених изазова. Прво, питање адекватне контроле како би се обезбедила њихова што већа репродукцибилност (нехируршка регија, позитивна и негативна контрола, *sham* хирургија како би се утврдио утицај саме хируршке интервенције). С друге стране, јако је тешко квантитативно проценити интеракцију материјала и ткива, а да се при томе та интеракција не поремети или резултати неадекватно интерпретирају (енгл. *Heisenberg uncertainty effect*). Неизоставно се намеће и питање етичких и законских регулатива, као и проблем статистичке анализе, односно дефинисање независних варијабли које се из етичких и финансијских разлога често пренебегавају, нпр. ако се на једној експерименталној животињи користи више зуба, онда сваки појединачни зуб у оквиру експеримента не може да представља независну варијаблу (Anderson, 2001).

5.1. Дискусија резултата карактеризације испитиваних материјала

Раних деведесетих година прошлог века МТА је представљен као материјал избора за ретроградне испуне (Torabinejad et al., 1995). Данас, МТА се у виду различитих комерцијалних производа користи у бројним ендодонтским и орално-хируршким захватима са значајним клиничким успехом (Torabinejad et al., 1995; Simon et al, 2007; Cetenovic et al., 2013). МТА остварује добро апексно заптивање у присуству влаге и постиже високу рН вредност (10,2 на 12,5) у прва три сата после мешања (Torabinejad et al., 1995; Danesh et al., 2006). *In vitro* и *in vivo* студије на анималним моделима и хуманим зубима потврдила су његову биокompatibilност (Silva, 2006), биоактивност и биоиндуктивност (Oviir et al., 2006; Guven et al., 2007). Међутим, материјали на бази МТА показују неколико недостатака у смислу отежане манипулације изазване њиховом сувом конзистенцијом, дугим временом везивања (више од три сата) и мањом притисном чврстоћом у односу на сличне материјале

(Torabinejad et al., 1995; Chng et al., 2005).

Стога постоји константна потрага за новим материјалима сличног хемијског састава који показују бољу активност и боља механичка својства. Примењена, потпуно иновативна метода заснована на комбинацији сол-гел процеса и реакције само-сагоревајућих таласа у оквиру наше студије, омогућила је да поменути недостатци у току синтезе материјала на бази калцијум-силиката, пре свега у смислу скраћивања времена везивања кроз њихову убрзану хидратацију фаза, буду превазиђени.

Реакција између C_3S фазе и воде главни је фактор у процесу везивања и стврдњавања цемента на бази калцијум-силиката. Током ове реакције зрна калцијум-силиката се навлаже и узрокују брзо ослобађање Ca^{2+} и OH^- јона са површине сваког зрна. Процес трансформације C_3S фазе у аморфни калцијумсилика-хидрат (CSH) познат је као тоберморит гел (Cong and Kirkpatrick, 1996; Ridi et al., 2006). CSH може бити променљивог састава, а прва структурна формула додељена овом једињењу била је $Ca_2[SiO_2(OH)_2]_2[Ca(OH)_2]$ (Taylor and Howison, 1956; Bonaccorsi et al., 2004).

Тешкоће у одређивању тачне реакције хидратације повезане су са проблемом утврђивања тачне структуре и одговарајуће формуле тоберморита. Претпоставка је да је идеална формула тоберморита $4CaO \cdot Ca(OH)_2 \cdot 6SiO_2 \cdot 4H_2O$. Централни део сваког слоја тоберморита сличан је октаедарском слоју у минералу глине, који би се могао описати као искривљени калцијум-хидроксидни слој лишен свих атома водоника. Ипак, сматра се да у молекулу тоберморита има више SiOH група него што је представљено идеалном формулом, уз одговарајућу замену воде из међуслоја хидроксилним групама (Chen et al., 2004; Churakov, 2009). У складу са тим, C_3S фаза вероватно реагује веома брзо и вода постаје изненада засићена калцијум-хидроксином (у току неколико минута). Исто се дешава и са β - C_2S фазом, али знатно спорије. Као резултат хидратације калцијум-силиката долази до стварања калцијум-хидроксида (портландит) и једног члана подгрупе тоберморита (G, тоберморит 11) (Churakov, 2009).

XRD анализе након хидратације у оквиру наше студије указују на присуство преобладајуће тоберморит фазе која потврђује да је наступио процес хидратације

испитиваних материјала, односно процес везивања β -C₂S и C₃S фаза. Док су активне силикатне фазе подлегле процесу трансформације, калцилит, Bi₂O₃ и BaSO₄ фаза остале су непромењене. У хидратисаним узорцима испитиваних материјала такође је детектовано и присуство портландит фазе, али у мањим количинама, што је у складу са резултатима сличних студија (Dammaschke et al., 2005; Camilleri, 2007; Camilleri, 2008).

EDS анализа испитиваних материјала потврдила је да је однос Ca:Si \sim 2.7 at%, што је еквивалентно односу CaO:SiO₂, а упућује на хомогену расподелу фаза у узорцима (C₃S/C₂S=2:1) (Dammaschke et al., 2005; Camilleri, 2007; Camilleri, 2008). Величина кристала, израчуната Шереровом једначином, у случају C₃S и C₂S фаза, била је 19,9 nm, што потврђује да су синтетисани материјали адекватно дизајнирани.

Поред XRD анализе, FTIR анализа је посебно погодна за праћење аморфних фаза, односно како процес хидратације напредује, трикалцијум-силикат и дикалцијум-силикат бивају конзумирани, уочавају се у већем обиму калцијумсилика-хидрат (тоберморит) и калцијум-хидроксид. FTIR спектра хидратисаних узорака испитиваних материјала у овој студији доказала је могућу комбинацију тоберморита величине 1,4 и 1,1 nm. Уочене линије на 3726 cm⁻¹ и 3718 cm⁻¹ указивале су на присуство 1,4 тоберморита који садржи слабо раздвојене линије у распону од 2800 cm⁻¹ до 3700 cm⁻¹ због већег садржаја H₂O у односу на 1,1 nm тоберморит. Линије на 2997 cm⁻¹, 2938 cm⁻¹ и 2880 cm⁻¹ и 2990 cm⁻¹, 2938 cm⁻¹ и 2872 cm⁻¹ такође доказују присуство тоберморита 1,4 nm (Cong & Kirkpatrick, 1996). Истежуће вибрације Si-O на Q3 месту, типичне за присуство тоберморита величине 1,1 nm, биле су регистроване су линијама на 1216 cm⁻¹, односно на Q2 месту линијама 1061 cm⁻¹ и 1054 cm⁻¹.

Величина честица хидратисаних узорака испитиваних материјала, израчуната коришћењем SEM, варирала је од 90 nm до 500 nm, и била је најмања у случају ALBO-MPCA₁, што упућује на закључак да новосинтетисани материјали имају одговарајућу морфологију површине. Поред дећи величину честица испитиваних материјала добијену SEM анализом и величину кристала помоћу XRD анализе, може се закључити да су испитивани материјали изграђени од наночестица који формирају

мале кристале што указује на потенцијалну биолошку активност синтетисаних система (Xia et al., 2013; Lin et al., 2013). Такође, познато је да честице мање од 1,5 μm , односно мање од промера дентинских тубула (Komabayashi & Spangberg, 2008; Storm et al., 2008), имају пресудну улогу у остваривању доброг маргиналног заптивања, као важне карактеристике материјала којима је примарна индикација апикална оптурација младих сталних зуба са незавршеним растом корена. Очекивано је да ће последица дизајнирања материјала на бази наночестица бити и увећана кохезивност, а тиме и лакша манипулација, што је од изузетног значаја за њихову клиничку употребу.

Структуре изграђене од три-хијерархијска нивоа (агломерати, кристали и честице), на шта упућују резултати хемијске карактеризације испитиваних материјала у оквиру наше студије, имају потенцијално велику биолошку употребну вредност, обзиром да нису деструктивни (димензије агломерата нису компарабилне са каналима унутар ћелијских мембрана), а наноелементи (кристали) омогућавају изразиту активност ових система, неопходну за њихово брзо везивање по пласирању у витална ткива.

5.2. Дискусија резултата испитивања рН и кинетике ослобађања јона

У оквиру наше студије, свежи раствори наносинтетисаних материјала на бази калцијум-силиката били су високо алкални у току 24 h (изнад 11,2), што је у складу са резултатима ранијих студија (Fridland & Rosado, 2003; Sarkar et al., 2005; Antunes et al., 2006; Ozdemir et al., 2008; Natale et al., 2015). Међутим, рН вредности екстраката свих испитиваних материјала су биле благо алкалне (око 8). Ова карактеристика може да буде изузетно повољна са аспекта биоактивности новосинтетисаних материјала, као што је повећање новоа алкалне фосфатазе (енгл. *Alkaline phosphatase-ALP*) и коштаног морфогеног протеина-2 (енгл. *Bone morphogenic protein- BMP-2*) што је доказано у условима рН средине која је у границама физиолошких (Okabe et al. 2006). Слични резултати, као и у нашој студији, приказани су и у скоријим истраживањима, где су рН вредности испитиваних материјала на бази калцијум-

силиката постепено опадале у функцији времена, и након 28 дана биле су готово неутралне (Gandolfi et al., 2014).

Један од предуслова за остваривање позитивног биолошког одговора материјала на бази калцијум-силиката јесте и константно ослобађање јона калцијума (Valerio et al., 2009; Marie, 2010; Sangwan et al., 2013), на шта упућују и резултати наше студије који су у сагласности претходним истраживањима (Fridland & Rosado, 2003; Sarkar et al., 2005; Antunes et al., 2006; Ozdemir et al., 2008). Новије студије наводе да ацидна средина смањује количину ослобођених јона калцијума у односу на неутралну (Natale et al., 2015), супротно приказаном за јоне бизмута (Camilleri et al., 2007). Ови податци су јако важни са аспекта клиничке примене материјала на бази калцијум-силиката у средини где постоји запаљенски процес, што би потенцијално могло негативно да се одрази на њихову биокомпатибилност. Имајући у виду потенцијалну клиничку апликацију испитиваних материјала, као и чињеницу да је концентрација ослобођеног бизмута у оквиру наше студије у току времена била у константном порасту (нижа случају материјала ALBO-MPCA₁ у односу на контролни материјал МТА⁺ изузев након 24 h), смернице за даља истраживања односила би се на испитивање утицаја промена рН средине на кинетику ослобађања јона који би могли да утичу на биокомпатибилност новосинтетисаних материјала.

Од других катјона који могу да компромитују биокомпатибилност новосинтетисаних материјала издваја се: алуминијум, чије је ослобађање у функцији времена опадало; гвожђе, које није регистровано ни у једном узорку испитиваних материјала; и бакар, који је детектован у изузетно ниским концентрацијама једино у узорцима материјала GREY-MPCA (Radziun et al., 2011; Yang et al., 2011; Sarkar & Sil, 2014; Rodhe et al., 2015). Вредности ослобођеног баријума за узорке GREY-MPCA као значајно ниже, константно су опадале у току 21 дана, за разлику од ALBO-MPCA₂. Узимајући у обзир податке из литератре који се односе на ефекте баријум-сулфата (Kim et al., 2002), добијени резултат у оквиру наше студије, могли би негативно да се одразе на биокомпатибилност материјала ALBO-MPCA₂. Супротно, једино регистровано ослобађање јона силицијума, које је било у константном порасту, као и највиша кумулативна концентрација магнезијума, могли би да испоље

позитивне ефекте на биокомпатибилност и биоактивност материјала GREY-MPCА (Damen & Ten Cate, 1992; Zreiqat et al., 2002; Yamasaki et al., 2002; Jugdaohsingh et al., 2004).

По сазнањима аутора ове студије постоји јако ограничен број студија које су вршиле анализу кинетике отпуштања јона из узорака материјала на бази калцијум-силиката, осим јасно документованих резултата везаних за ослобођање јона калцијума, што овим резултатима даје посебну важност и ствара простор за даља истраживања.

5.3. Дискусија резултата *in vitro* испитивања биокомпатибилности материјала

Идеалан ендодонтски материјал требало би да поседује следеће карактеристике: способност адхеренције за дентин, добро апикално затварање, нерастворљивост у ткивним течностима, димензиону стабилност, лакоћу при манипулацији, нересорптивност, рендгенконтрастност, дуго радно време, кратко време везивања и биокомпатибилност (Parirokh & Torabinejad, 2010). Студије које се баве испитивањем биокомпатибилности материјала или њихових екстракта на примарним или перманентним ћелијским линијама могу да процењују ћелијску вијабилност, карактеристике контакта ћелија и материјала, експресију/супресију појединих цитокина и маркера биолошке активности итд.

МТТ је функционални, колориметријски тест за индиректно испитивање цитотоксичности, који се заснива на способности ензима митохондријалне дехидрогеназе да у живим, метаболички активним ћелијама конвертује жуту тетразолијумску со у љубичастоплаве кристале формаза. Мерењем оптичке густине ратворених кристала формаза, омогућена је оцена метаболичке активности ћелија (Zhuang et al., 2007).

У нашим експериментима МТТ тестом је процењиван проценат метаболичке активности у односу на контролне ћелије гајене у медијуму без екстракта испитиваних материјала. Уколико медијум који је инкубиран са материјалом

показује цитотоксичност, очекивано је да ће доћи до смањења метаболичке активност ћелија у датом узорку. У циљу утврђивања зависности метаболичке активности од концентрације, испитивани су ефекти различитих концентрација свежих раствора материјала, као и разблажених и неразблажених екстраката везаних материјала (24 h, 7 дана и 21 дан). Узимајући у обзир хемијски састав, сложен и недовољно разјашњен процес везивања материјала на бази калцијум-силиката, праћен различитом динамиком ослобађања јона, у оквиру ове студије спроведене су и рН и ICP-OES анализе раствора испитиваних материјала.

Експериментални модел у оквиру наше студије, који се односио на испитивање биокомпатибилности екстраката везаних материјала помоћу МТТ теста, дизајниран је по угледу на студију *Modareszadeh* и сарадника (Modareszadeh et al., 2011). Занимљиво је да су поменути аутори уочили пролонгирану цитотоксичност неразблажених екстраката ProRoot МТА након 14 дана, али су вредности метаболичке активности ћелија L-929 биле највише након 21 дана (Modareszadeh et al., 2011). Статистички значајна разлика уочена је између 50% разблажених и неразблажених раствора након 24-часовне и 7-дневне екстракције, док је у оквиру нашег истраживања значајна разлика између 50% разблажених и неразблажених раствора у случају свих испитиваних материјала запажена након 21-дневне екстракције.

Резултати студије *Modareszade* и сар. само делимично подржавају резултате наше студије, обзиром да је анализа података упућивала на пораст метаболичке активности L-929 ћелија у односу на време екстракције када је реч о 50% разблаженим растворима екстраката свих испитиваних материјала; неразблаженим екстрактима материјала МТА⁺, као и неразблаженим 24-часовним и 7-дневним екстрактима материјала ALBO-MPCA₂, ALBO-MPCA₁ и GREY-MPCA. Поред разлика у хемијском саставу испитиваних материјала, на добијене резултате у ове две студије, могле су да имају утицај и разлике у односу површине узорака материјала и запремине медијума који је коришћен за екстракцију. Ипак, наши резултати били су у сагласности са ранијим студијама које говоре у прилог изузетне

биокомпатибилности материјала на бази калцијум-силиката (De Deus et al., 2005; Koulaouzidou et al., 2005; Camilleri et al., 2005; Yoshino et al., 2013).

Највећи пад у метаболичкој активности, који није превазилазио дозвољене вредности дефинисане ISO стандардом, забележен код неразблажених раствора материјала ALBO-MPCA₂ након 21-дневне екстракције, може да буде последица кумулативног ефекта ослобођених јона алуминијума (163,7 µg/L) и константног пораста у концентрацији јона баријума. Забележени тренд у истој групи односио се и на испитиване материјале GREY-MPCA и ALBO-MPCA₁, што може бити објашњено највишом кумулативном концентрацијом јона алуминијума (519,74 µg/L) у случају материјала GREY-MPCA; односно динамиком његовог ослобађања у случају ALBO-MPCA₁ (недетектован након 21 дана у случају МТА⁺), будући да је кумулативна концентрација јона алуминијума била слична у поређењу узорака материјала ALBO-MPCA₁ (148,5 µg/L) и МТА⁺ (145,5 µg/L).

Сматра се да су једињења разних метала која се налазе у саставу материјала на бази калцијум-силиката главни чиниоци који могу да испоље негативан утицај на њихову биокомпатибилност (Radziun et al., 2011; Sarkar and Sil, 2014; Rodhe et al., 2015). Посебна пажња усмерена је на оксид бизмута, као најчешће коришћено радиоконтрастно средство (Camilleri et al., 2005), као и на баријум-сулфат (употребљен у току синтезе материјала ALBO-MPCA₂), обзиром да представљају само пуниоце који немају утицаја на процес хидратације материјала на бази калцијум-силиката (Camilleri, 2010). Иако литература показује контраверзни ефекат оксида бизмута у погледу његове биокомпатибилности (Camilleri et al., 2005; Min et al., 2007; Kim et al., 2008; Gomes Cornélio et al., 2011), на основу резултати наше студије може се закључити да бизмут-оксид нема значајан утицај на биокомпатибилност испитиваних материјала како су забележене ниже вредности ослобођеног бизмута у случају ALBO-MPCA₁ (12,1 µg/L) након 21-дневне екстракције, као и његова кумулативна концентрација (21 µg/L) у поређењу са МТА⁺ (17,7 µg/L након 21-дневне екстракције; кумулативна вредност 25,7 µg/L). Са друге стране, кинетика рН екстраката материјала ALBO-MPCA₂, ALBO-MPCA₁ и GREY-MPCA није се битније разликовала у односу на контролни материјал МТА⁺, односно

pH вредности су биле слабо базне, и као такве нису могле да имају значајан утицај на метаболичку активност ћелија.

Анализом утицаја раствора свежих материјала на ћелијску активност запажена је њена зависност од концентрације материјала GREY-MPCA помоћу МТТ теста. На основу резултата наше студије, иста зависност није доказана у случају испитиваних материјала ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂ и МТА⁺. Слична метаболичка активност ћелија регистрована је у односу на све испитиване материјале у најнижој тестираној концентрацији (12,5 mg/mL), као и између материјала ALBO-MPCA₁ и МТА⁺ (концентрација 25 mg/mL), и између ALBO-MPCA₂ и GREY-MPCA (концентрација 50 mg/mL). Контролни материјал МТА⁺ испољио је пораст метаболичке активности у односу на контролне ћелије у свим тестираним концентрацијама. Исти тренд одликовао је и друге испитиване материјале, изузев највише испитиване концентрације материјала (100 mg/mL), али су те вредности и даље биле задовољавајуће (изнад 89%). Овај резултат се може довести у везу са кинетиком pH свежих раствора материјала МТА⁺, која је константно опадала у функцији времена за разлику од других испитиваних материјала. Међутим иако је нашим резултатима утврђен пораст метаболичке активности, не може се са сигурношћу тврдити да је наступила и пролиферација ћелија у ћелијској култури, како је то раније навођено (De Deus et al., 2005), обзиром да је МТТ индиректан тест цитотоксичности који једино говори о митохондријалној активности.

У циљу испитивања директне цитотоксичности екстраката материјала, који су били предмет истраживања наше студије, коришћен је LDH тест. Овим тестом се вијабилност ћелија процењује на основу количине лактат дехидрогеназе која се ослободи у екстраћелијску средину. Количину лактат дехидрогеназе која је директно пропорционална броју вијабилних ћелија, могуће је одредити након лизирања ћелија (Marques et al., 2002). У нашим експериментима LDH тестом је одређиван број вијабилних ћелија у односу на позитивну контролну групу, односно ћелије лизиране нејонским детергентом *Triton X-100* (3%) који условљава максимално ослобађање цитосолне LDH услед потпуног нарушавања интегритета ћелијске мембране.

Раније су *Karimjee* и сар., писали о порасту токсичности МТА у односу на ћелијске културе периодонталног лигамента после дужег времена екстраховања материјала применом LDH теста (*Karimjee et al.*, 2006). Супртно налазима *Karimjee* и сар., у нашем истраживању проценат цитотоксичности опадао је са порастом времена екстракције материјала, осим код 50% разблажених екстраката материјала ALBO-MPCA₂ и GREY-MPCA, али та разлика није била већа од 6%. Статистички значајне разлике у проценту цитотоксичности између разблажених и неразблажених раствора уочене су након 24-часовне екстракције код свих испитиваних материјала, односно у случају МТА⁺, ALBO-MPCA₁ и ALBO-MPCA₂ након 7-дневне екстракције, док након 21-дневне екстракције није постојала разлика у цитотоксичном ефекту испитиваних материјала. То објашњава да степен отпуштених, потенцијално штетних материја непосредно након припреме материјала расте, да би касније опадао, а током времена цитотоксични ефекат потенцијално слаби.

Како ни МТТ, ни LDH тест не могу са потпуном сигурношћу да потврде да ли је уследила пролиферација ћелија у ћелијској култури, као најрелевантнијег показатеља цитотоксичности неког материјала, степен пролиферације ћелија, у оквиру наше студије, утврђен је на основу степена уградње радиоактивног ³H-тимидина у ланац ДНК у току репликације. Резултати експеримента су потврдили да екстракти ни једаног од испитиваних материјала не испољавају цитотоксични ефекат на култури L-929 фибробласта, обзиром да степен пролиферације ћелија није био нижи од 74% независно од времена посматрања. Такође, да је реч о биокомпатибилним материјалима упућује и податак да је пролиферација ћелија изнад 100% у оквиру наше студије евидентирана у случају неразблажених и 50% разблажених раствора материјала МТА⁺ и ALBO-MPCA₁ након 24-часовне екстракције, ALBO-MPCA₁ и ALBO-MPCA₂ након 7-дневне екстракције, односно 50% разблажених раствора материјала ALBO-MPCA₂ након 24-часовне и МТА⁺ након 7-дневне екстракције.

Слично су потврдили и резултати *Bonson* и сар., који су користили флуоросцентну боју- *CyQUANT GR* (везује за оштећену ДНК) како би утврдили утицај МТА на пролиферативну активност ћелијске културе PDL фибробласта

(Bonson et al., 2004). Нижи степен цитотоксичност показали су екстракти материјала у односу на свеже замешане (Bonson et al., 2004), што је у потпуности очекиван и конзистентан резултат са наводима наше студије, ако се узме у обзир сложени процес везивања материјала на бази калцијум-силиката, кинетика ослобађања јона и промене рН вредности у току њиховог везивања.

Како би дефинисали промене које настају при директном контракту материјала на бази калцијум-силиката и културе ћелија, истраживачи су најчешће прибегавали коришћењу SEM анализе. Поменутом методом потврђена је нормална морфологија, адхезија и ћелијски раст периодонталних фибробласта на површини 24-часовно везаних узорака GMТА (Balto, 2004). Међутим, исте ћелије засејане на површини свеже замешаних GMТА узорака испољиле су лоптасту морфологију са јасно уочљивим површинским недостацима и одсутном адхезијом. На основу ових резултата могло се закључити да су везани узорци GMТА мање токсични од свеже замешаних. У складу са овим били су резултати *Saidon*-а и сар., који су утврдили да дуже време везивања значајно смањује токсичност МТА и РС (Saidon et al., 2003). Ови резултати нису међутим у сагласности са истраживањем *Nakayama* и сар., који наводе да је остеобластна диференцијација ћелија супримирана у контакту са МТА, иако није инхибиран ћелијски раст (Nakayama et al., 2005). Проучавајући разлике у морфологији и адхезији мишићних остеобласта и MG-63 ћелија остеосаркома засејаних на површини ProRoot GMТА и ProRoot WMТА, Pérez и сар. су уочили добро адхериране обе врсте ћелија једино на површини узорака ProRoot GMТА (Pérez et al., 2003). Супротно наведеном, Camilleri и сар. закључују да нема разлика у степену пролиферације ћелија у односу на узорке WMТА и GMТА, али је занимљив податак да су 24-часовно везани узорци били биокомпатибилнији од 28-дневних (Camilleri et al., 2004).

Главни проблем употребе SEM методе у испитивању директне цитотоксичности материјала на бази калцијумсиликата представља реакција материјала са фосфатним пуфером, који се користи као медијум за припрему узорака, што за последицу има стварање кристала калцијум-фосфата на његовој површини. Поред тога, процес сушења, као неизоставни поступак у припреми узорака за SEM

анализу, изазива карбонизацију материјала и тиме мења њихову површинску структуру, што има утицаја на ефекте ћелијске адхезије. Такође, чињеница да су аутори у својим студијама користили различите врсте ћелијских култура, различите комерцијалне препарате материјала на бази калцијум-силиката, свеже замешане или везане у различитим временским периодима, може да буде разлог прикупљања наведених контрадикторних резултата.

Сходно наведеним ограничењима примењених методологија, у оквиру нашег истраживања, директан контакт свеже припремљених испитиваних материјала и ћелијске културе, процењиван је бојењем неутрално црвеном. Овај тест се заснива на инкорпорацији неутрално црвене боје у лизозомима виталних ћелија. Уколико токсичне супстанце оштете ћелијску мембрану или јако осетљиву мембрану лизосома, биће смањено преузимање неутрално црвене боје путем активног ћелијског транспорта и даље њена инкорпорација у лизозоме. Овај тест тако обезбеђује „осетљив сигнал“ о интегритету ћелије и инхибицији ћелијског раста, односно омогућава да се направи разлика између оштећених, виталних и авиталних ћелија у ћелијској култури (Fotakis & Timbrell, 2006). Стога је приликом дизајнирања експерименталног модела у оквиру ове студије одабран поменути тест због његове осетљивости, а *SCAP* ћелијска култура због чињенице да је примарна индикација материјала на бази калцијум-силиката у терапија зуба са незавршеним растом корена.

Резултати нашег истраживања упућују да свеже замешани испитивани материјали *ALBO-MPCA₁*, *ALBO-MPCA₂* и *GREY-MPCA* не испољавају цитотоксични ефекат, обзиром да је релативна вијабилност и поред благе тенденције опадања у функцији времена (7 дана) била изнад 70%, што може бити последица пораста рН вредности њихових свежих раствора. *SCAP* ћелије које су биле у контакту са испитиваним материјалима, посебно у случају *MTA⁺*, *ALBO-MPCA₁* и *ALBO-MPCA₂*, испољавале су сферичан облик са проминентним једром, уочљивим једарцетом и јасно израженим бројним танким и дугим цитоплазматским продужетцима. Занимљиво је да су се дисолвиране партикле испитиваних материјала концентрисале управо на самим *SCAP* ћелијама и дуж њихових цитоплазматских продужетака. Такође, цитоплазматски продужетци *SCAP* ћелија орјентисали су се ка

узорцима испитиваних материјала који су били пласирани у централном делу флашка, што све говори у прилог њихове биокompatбилности.

Паста *UltraCal XS* коришћена је у овом делу студије такође као контролни материјал, обзиром да пасте на бази калцијум-хидроксида представљају „златни стандард“ у терапији зуба са незавршеним растом корена. У оба времена посматрања паста *UltraCal XS* испољила је цитотоксични ефекат по критеријумима *ISO* стандарда (Anderson, 2001; ISO 10993-1), односно релативна вијабилност ћелија је била нижа од 70%), што је и у складу са ранијим наводима (Yasuda et al., 2008). Овај ефекат може бити последица високих рН вредности (изнад 12,5), основне карактеристике оваквих препарата, које делују више штетно, него благотворно на ћелијску културу. Међутим у *in vivo* условима тако високе рН вредности пуферским капацитетом дентина снижавају се на ниво физиолошких, што ствара оптималне услове за њихово биолошко дејство (Wang & Hume, 1988).

Слично нашим закључцима, у директном контакту материјала и ћелијске културе хуманог остеосаркома бојењем Аламар плавим, *Camilleri* и сар. су констатовали слабији ћелијски раст у односу на контролну ћелијску културу, без разлика у цитотоксичним ефектима између GMТА и WMTA (*Camilleri et al.*, 2005). Компаратбилни резултати, у смислу степена пролиферације ћелијске културе фибробласта у директном контакту са МТА и Биодентином приказани су и новијим истраживањима (*Pistorius et al.*, 2003, *Corral Nunez et al.*, 2014). Поредићи ограничени број студија који се бавио испитивањем биокompatбилности свеже замешаних материјала при директном контакту са ћелијским културама, мора се нагласити да постоје значајне разлике у коришћеним методологијама, хемијском саставу испитиваних материјала и тестираној концентрацији, потом у односу контактне површине материјала и ћелијске културе, врсти ћелијске културе, што све укупно има значајан утицај на добијене резултате.

Поједини аутори су се бавили и испитивањем цитотоксичности измењених формулација калцијум-силикатних система, направљене у циљу скраћивања времена везивања и повећања вискозности материјала, као њихових лоших карактеристика. Додавањем Na_2HPO_4 , *Ding* и сар. су постигли значајно скраћење времена везивања

МТА, не нарушавајући првобитну биокompatibilност материјала. Степен вијабилности ћелија износио је више од 90% у односу на контролу, а SEM анализа је указала на добру адхезију ћелија (Ding et al., 2006). Синтезом наночестичних материјала, односно високо реактивних силикатних фаза у нашој студији, време везивања материјала је скраћено кроз њихову убрзану хидратацију (Jokanovic et al., 2014) са идејом да се позитивно утиче на њихову биокompatibilност и биоактивност.

Савремени концепт биокompatibilности подразумева и деловање материјала у адекватан одговор домаћина у специфичној ситуацији (Williams, 2008). Уколико је запаљенска реакција на месту експонирања пулпе локализована, а њен степен опада у функцији времена, на шта указују и резултати наше студије, постоје почетни услови како би наступио процес репараторне одонтогенезе. Сам процес захтева ангажовање и диференцијацију матичних ћелија зубне пулпе у одонтобластима сличне ћелије, које надаље стварају дентину слично минерализовано ожиљачно ткиво или остеодинтин (Smith et al., 2001). Фактори раста, као што су трансформишући фактор раста-1 (енгл. *Transforming growth factor*- TGF), TGF-3, BMP-2, инсулину сличаног фактора раста- 1 (енгл. *Insulin growth factor*- IGF) и биоактивни молекули ослобођени из дентинског матрикса представљају специфичан сигнал за диференцирање матичних ћелија зубне пулпе (Lesot et al., 1993). *In vitro* студијама потврђена је индукција остеогеног фенотипа, односно експресија алкалне фосфатазе, остеоидогена, остеодинтина и остеодинтина у присуству материјала на бази калцијум-силиката (Bonson et al., 2004). Такође, уочена је и повећана експресија бројних цитокина и маркера билошке активности као што су: TGF- β_1 , BMP-2, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-18 (Koh et al., 1998; Mitchell et al., 1999; Abdullah et al., 2002; Thomson et al., 2003; Huang et al., 2005; Guven et al., 2007; Tani-Ishii et al., 2007; Tomson et al., 2007; Chen et al., 2009; Deller-Quinn et al., 2009).

Истраживања указују да пораст рН вредности у физиолошким границама утиче на повећање новог ALP, BMP-2 и формирање калцификованих остраца (Okabe et al., 2006). Дејство ALP у процесу репараторне одонтогенезе је јако битно, обзиром да она елиминише пирофосфатне јоне, главне инхибиторе минерализације. Раније

пријављене високе рН вредности материјала на бази калцијум-силиката које се одржавају и у дужем временском периоду (Torabinejad et al., 1995; Formosa et al., 2013), потврђују и резултати свежих раствора испитиваних материјала у оквиру наше студије. Међутим, анализа кинетике рН вредности везаних материјала говори у прилог слабој базности, што упућује на њихову потенцијалну биолошку вредност. Још један показатељ потенцијалне биоактивности односи се на константно ослобађање јона калцијума забележено код свих испитиваних материјала. Поред тога што има утицаја на позитивну хемотаксу, калцијум је важан регулатор ћелијске пролиферације, диференцијације и минерализације (Zayzafoon, 2006); стимулише синтезу фибронектина, експресију BMP-2, остеопонтинина и калцијум-зависне пирофосфатазе (Heithersay, 1975; Rashid et al., 2003; Mizuno & Banzai, 2008).

У спроведеној студији примењене су препоруке ISO стандарда (ISO 10993-5) које се односе на испитивање директне и индиректне цитотоксичности материјала у *in vitro* условима. Истовремено је испитивана биокompatibilност различитих облика синтетисаних материјала: праха, свеже замешани и везани материјали. Ни једна форма тестираних материјала у оквиру наше студије није испољила цитотоксични ефекат, обзиром да редукција метаболичке активности, односно ћелијске пролиферације није била већа од 30%. У циљу избегавања погрешног тумачења цитотоксичних ефеката испитиваних материјала, односно дефинисања разлика у ефектима цитотоксичности, различите концентрације материјала и више времена посматрања неопходно је обухватити експерименталним методама. Такође, потребно је користити више од једног теста за одређивање виталности ћелија у *in vitro* студијама како би поузданост добијених резултата била релевантнија.

5.4. Дискусија резултата *in vivo* испитивања биокомпатибилности материјала

Сходно биолошкој реакцији ткива домаћина на имплантат, материјали се могу поделити у четири групе: биоактивне, ресорптивне, порозне и инертне (Niu et al, 2014). Обзиром да материјал на бази калцијум-силиката нису ресорптивни и не поседују поре довољно велике за урастање крвних судова (Niu et al, 2014), јасно је да ће се ови материјали у организму понашати или као инертни или као биоактивни. Одмах након имплантације било ког страног материјала у живо ткиво, протеини крви и међућелијске течности адхерирају се на његовој површини, омогућавајући на тај начин организму да материјал препозна као страно тело. Одговор домаћина на страно тело зависиће од његове хемијске реактивности, као и од специфичне површинске структуре.

У случају имплантације инертних материјала, организам реагује формирањем фиброзне капсуле, која у функцији времена прогресивно задебљава. Насупрот томе, доказано је да фибробласти не пролиферишу на површини биоактивних материјала (Seitz et al., 1982). Сматра се да је разлог томе селективна апсорпција протеина серума, посебно фибронектина, који садржи интегрин везујућу аргинин-глицерин-аспартанску киселину, одговорну за појачану остеобластну адхезију (Garcia et al., 1998). Поред тога, површина биоактивних материјала утиче и на специфичну конформацију апсорбованог фибронектина, која је одговорна за образовање аморфног калцијум-фосфата, снажног индуктора остеобластне адхезије (El-Ghannam et al., 1999). Такође, познато је да је апсорпција BMP-2 условљена електростатским интеракцијама између самог протеина и површине материјала, како катјонским калцијумовим који је фаворизују, тако и анјонским фосфатним који је инхибирају (Voix et al., 2005). Поред тога, денатурација протеина снажно је промовисана на површинама које су хидрофобне (Keselowsky et al., 2003), док присуство хидроксилих група резултира већом апсорпцијом протеина са конформацијама које омогућавају њихову стабилност и функцију (Keselowsky et al., 2004).

Истраживања су потврдила да се потапањем материјала на бази калцијум-силиката у стимулисану телесну течност дешава брза размена јона Ca^{2+} јонима H^+ или H_3O^+ (Gandolfi et al., 2010). Реакција Ca^{2+} и OH^- јона из стимулисане телесне течности наступа готово тренутно, што иницијално ствара јаку алкалну средину, да би се даља јонска размена Ca^{2+} , SiO_3^{2-} , и у зависности од састава материјала, мањих количина Al^{3+} , Fe^{3+} и SO_4^{2-} наставила континуирано. Катјонска размена условљава повећање хидроксилних јона у раствору што даље доводи до хидролозе SO_4^{4-} група. Резултат ове реакције је формирање аморфног калцијумсилика-хидрата на површини материјала. Због присутних силанол група (SiOH), читава површина материјала негативно је наелектрисана, што привлачи катјоне калцијума из раствора, преко којих се везују HPO_4^{2-} анјони, образујући на тај начин накупине аморфног калцијумфосфата субнаномерне величине (Deu et al., 2010). Даљом нуклеацијом аморфног калцијум-фосфата формира се хидроксиапатит- $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_x$ (Combes and Rey, 2010).

Оцењивање реакције ткива након имплементације материјала од кључног је значаја за одређивање његове *in vivo* биокомпатибилности. Новоформирана коштаног ткиво, уочено у случају свих узорака, потврђује да тестирани материјали ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂, GREY-MPCA поред биокомпатибилности, такође испољавају и биоиндуктивни потенцијал. Како интраћелијски одговор локалног ткива може бити индукован ослобађањем појединих неорганских јона из имплантираног материјала (Норре et al., 2011), бољи биолошки одговор ALBO-MPCA₁ у односу на остале испитиване материјале у нашој студији, у смислу коштане регенерације, може се довести у везу са највећим кумулативним ослобађањем јона калцијума (78080 $\mu\text{g/L}$). Доказано је да се континуираним ослобађањем јона калцијума из материјала на бази калцијум-силиката формира његов концентрациони градијент који има улогу у позитивној хемотакси, односно ћелијској миграцији (Sangwan et al., 2013). Поред тога, јони калцијума фаворизују остеобластну диференцијацију, пролиферацију и минерализацију (Maeno et al., 2005), као и активацију Ca-сензитивних рецептора у остеобластима и експресију IGF I и IGF II (Valerio et al., 2009; Marie, 2010). Ослобађање јона калцијума из материјала у оквиру наше студије било је константно

у функцији времена, односно највише након седам дана у случају свих испитиваних материјала ($ALBO-MPCA_1 > ALBO-MPCA_2 > GREY-MPCA > MTA^+$).

Иако су иницијално регистроване највише вредности ослобођеног калцијума у случају GREY-MPCA, након 21 дана те вредности су биле најниже у поређењу са осталим испитиваним материјалима (16860 $\mu\text{g/L}$). Занимљиво је да је ослобађање силицијума детектовано једино у случају узорака GREY-MPCA, што може бити један од разлога повољног биолошког одговора након имплементације овог материјала, пошто је утврђено да силицијум индукује преципитацију апатита (Damen and Ten Cate, 1992), повећава степен минерализације коштаног ткива (Jugdaohsingh et al., 2004), док ортосалицилна киселина стимулише синтезу колагена типа I и диференцијацију остеобласта у *in vitro* условима (Silver et al., 2001; Bosetti et al., 2003; Reffitt et al., 2003). Доказано је да силикати појачавају и експресију остеопротегерина у остеобластима и тиме модулирају међућелијску комуникацију остеобласта и остеокласта. Тачније, остеопротегерин везивањем за рецептор- активатор за нуклеарни фактор κB лиганд (енгл. *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand-RANKL*) на остеобластима, блокира RANKL-RANK интеракцију између остеобласта и прекурсора остеокласта и тиме спречава њихову диференцијацију у зреле остеокласте (Schröder et al., 2012). Поред тога, највиша кумулативна концентрација магнезијума у узорцима екстраката материјала GREY-MPCA (706,5 $\mu\text{g/L}$), додатно подржава резултате повољног биолошког одговора у случају његове интракоштане имплементације, како је потврђено у литератури да магнезијум стимулише остеобластну адхезију реакцијом са интегринима у ћелијској мембрани (Zreiqat et al., 2002; Yamasaki et al., 2002).

Константан пораст у ослобађању јона баријума, може бити разлог нешто слабијег биолошког одговора у случају материјала $ALBO-MPCA_2$, обзиром да је доказано да $BaSO_4$, који је коришћен као радио контрастно средство у синтези овог материјала, може да инхибира синтезу остеокалцина (Kim et al., 2002). Наведени ефекат делом може бити ублажен високим кумулативним вредностима ослобођеног магнезијума регистроване у случају $ALBO-MPCA_2$ (184,5 $\mu\text{g/L}$). Међутим, потребно је нагласити да услови у динамичном, живом систему у потпуности не одговарају

догађајима у статичком систему *in vitro* модела, који је коришћен у овој студији за утврђивање динамике ослобађања јона из везаних испитиваних материјала.

Морфологија и континуитет новоформираног коштаног ткива чије је формирање потврђивано специфичним *Masson-trichrom* бојењем разликовали су се у зависности од материјала и времена посматрања и нашој студији. Младо коштаног ткиво са минималним дисконтинуитетима и васкуларизованим фокусима фибробластног ткива могло се уочити код узорака ALBO-MPCA₁, GREY-MPCA и МТА⁺ након 30 дана, да би у функцији времена постајало регуларно минерализовано и континуирано. У случају материјала ALBO-MPCA₂ након 30 дана, младо дисконтинуирано коштаног ткиво са васкуларизованим фокусима фибробластних пролиферација регистровано је код нешто више од половине узорака. Ишчезавање фибробластних фокуса, регуларност у минерализацији и континуитету младог коштаног ткива било је уочљиво након 90 дана код већине узорака ALBO-MPCA₂, што говори у прилог добре толеранције ткива домаћина на његово присуство.

Резултати интакостане имплементације упућују на закључак да бизмут-оксид, коришћен као рендгенконтрастно средство у синтези материјала ALBO-MPCA₁ (7,30 wt%) и МТА⁺ (6,51 wt%) не утиче негативно на биоактивност ових материјала, обзиром да је доказано да додавање 20 wt% бизмут-оксида може бити узрок слабије пролиферације, диференцијације и формирања минерализованих депозита (Chiang et al., 2013). Са друге стране, постоје наводи да присуство до 3 wt% алуминијум-оксида у биостаклу може комплетно да инхибира његову биолошку активност (Greenspan and Hench, 1976). У нашем истраживању једини материјал за који је EDS анализом утврђено присуство алуминијума веће од 3 wt% био је материјал GREY-MPCA (4,1 wt%). Обзиром да је у синтези материјала GREY-MPCA коришћен РС за који се у литератури наводи да садржи око 4,7 wt% алуминијум-оксида (Darvell and Wu, 2011), овај резултат је био у потпуности очекиван. Чињеница да део неизреагованог алуминијума може бити ослобођен након везивања материјала на бази калцијум-силиката (Andersen et al., 2003; Pardal et al., 2009), што су потврдили и наши резултати, може се рећи да није имала значајнији утицај на испољен биолошки одговор испитиваних материјала, пре свега GREY-MPCA, обзиром да су

регистроване концентрације ослобођеног алуминијума биле највише у случају овог материјала.

Од других катјона који могу да имају утицаја на биолошки одговор коштаног ткива издваја се гвожђе, сходно доказима да гвожђе може да инхибира експресију BMP-2, снажаног индуктора остеогенезе (Yang et al., 2011). Међутим, иако је EDS анализа потврдила присуство гвожђа у узорцима материјала GREY-MPCA (4,27 wt%) и МТА⁺ (0,76 wt%), његово ослобађање у функцији времена није уочено ни код једног узорка, што је супротно претходних наводима (Sarkar et al., 2005). Такође, и поред велике заступљеност бакра у узорцима материјала GREY-MPCA (7,10 wt%), може се закључити да ослобођене количине овог јона (< 1 µg/L) нису имале негативан утицај на ефекте његове *in vivo* имплементације, обзиром на његове потенцијалне токсичне ефекте (Rodhe et al., 2015). У прилог нашим резултатима могу да говоре докази да јони бакра могу и да индукцију диференцијацију мезенхималних ћелија у остеобласте, као и да синергистички делују са фибробластним фактором раста-2 (енгл. *Fibroblast growth factor*, FGF-2) у промоцији ангиогенезе (Hu, 1998; Rodriguez et al., 2002; Gerard et al., 2012).

Поред хемијског састава и структуре, на биоактивност материјала може да утиче и његова топографија. Доказано је да наноструктурисана површина боље имитира хијерархијску организацију коштаног ткива у поређењу са микроструктурисаном, повећавајући концентрацију активних биомолекула који фаворизују ћелијску миграцију, адхезију, диференцијацију и пролиферацију (Xia et al., 2013; Lin et al., 2013). Студије су показале да изглед честица кристала хидратисаних материјала на бази калцијум-силиката може да варира од игличастог, штапићастог, лоптастог, попут латица, налик плочи (Han et al., 2010; Gandolfi et al., 2011; Camilleri et al., 2013). Доказано је и да сферичне честице побољшавају ћелијску миграцију и остеобластну пролиферацију у поређењу са штапићастим структурама (Xu et al., 2009). Новија истраживања указују да диференцијација матичних ћелија зависи и од микроеластичности матрице са којом ћелије ступају у интеракцију. Тако је остеобластна диференцијација побољшана са повећањем нивоа ламинина-А који регулише SRF (енгл. *Serum response factor*) и YAP 1 (енгл. *Yes-associated protein 1*)

гене, одговорне за ћелијски раст и пролиферацију, као и инхибицију ћелијске апоптозе (Swift et al., 2013).

Хемијска карактеризација показала је да су новосинтетисани материјали у оквиру наше студије, изграђени од наночестица и кристала који образују агрегате различитог облика, најчешће сферног и штапићастог, са хомогеном дистрибуцијом фаза. Такви три-хијерархијски системи испољавају потенцијално изузетно пожељне биолошке карактеристике (Xu et al., 2009). Осим тога, наноелементи обезбеђују посебну активност материјала структурисних по оваквом принципу, неопходну за њихово брзо везивање након имплементације у виталним ткивима.

У току испитивања биокompatбилности и биоактивности материјала након њихове интракоштане имплантације на одговарајућем анималном моделу, изузетно је важно утврдити природу везе испитиваног материјала и новоформираног коштаног ткива. Природа ове везе може се дефинисати као: директан контакт новоформираног коштаног ткива и материјала (екстензивна веза - комплетно прекривање односно премештавање површине материјала новоформираним коштаном ткивом), мешовита (умерена веза - прекривање бар 50% површине материјала новоформираним коштаном ткивом) и индиректна - образовање фиброзне капсуле између материјала и новоформираног коштаног ткива (слаба веза - спорадично присуство острваца коштаног ткива; прекривање мање од 25% површине материјала новоформираним коштаном ткивом) (Niu et al, 2014).

У оквиру нашег истраживања, веза материјала ALBO-MPC₁ и МТА⁺ са новоформираним младим коштаном ткивом, била је константно екстензивна, односно у већини узорака је уочено комплетно прекривање површине материјала новоформираним коштаном ткивом, што може бити објашњено сличним хемијским саставом ових материјала, што је потврђено EDS анализом у оквиру наше студије, односно сличном динамиком отпуштања јона. Резултати нашег истраживања били су у супротности са претходним наводима (Torabinejad et al., 1998; Saidon et al., 2003; Gomes-Filho et al., 2011), што не може бити објашњено само са чињеницом да су испитивани материјали пласирани у тefлонске тубице, како су аутори наводили,

обзиром да су слични ефекти уочени и у случају свеже замешаних узорака који су директно пласирани у коштане дефекте (Moretton et al., 2000).

И поред високог садржаја бакра, гвожђа и алуминијума у хидратисаним узорцима, исти тип везе карактерисао је и узорке материјала GREY-MPCA што може бити објашњено ослобађањем јона силицијума, које је одликовало само узорке овог материјала у оквиру наше студије, пошто је доказано да силицијум индукује преципитацију апатита (Damen and Ten Cate, 1992). Веза материјала ALBO-MPCA₂ и новоформираног коштаног ткива била је умерена, са нешто већим процентом регистроване директне везе након 90 дана. Овај резултат може да се доведе у везу са хемијским саставом овог материјала, односно укупном заступљеношћу баријума у мешавини (14,35 wt%).

Наводи *Rahimi* и сар. подржавају резултате наше студије, како је директна веза уочена код свих узорака након 56 дана, а тип везе се мењао са временом посматрања, упућујући на бољу толеранцију ткива на имплементирани материјал (Rahimi et al., 2012). Очигледне разлике које постоје у презентованим резултатима могу се приписати пре свега различитом хемијском саставу испитиваних материјала, а потом тестираној форми материјала и примењеној методологији.

Иако су раније студије (Torabinejad et al., 1995) објашњавале присуство фибробластних пролиферација као последицу померања тефлонских тубица у оперативној регији, развој запаљенске реакције у потпуности је очекиван због високе рН вредност, која потиче од јаке базе калцијум-хидроксида, који настаје као продукт ране хидратације трикалцијум-силиката и касне хидратације дикалцијум-силиката (Brouwers and van Eijk, 2003; Chen and Brouwers, 2010). Иако, највећи део калцијум-хидроксида бива депонован у виду кристала портландита, један део остаје слободан у порама везаног материјала (Brouwers and van Eijk, 2003; Chen and Brouwers, 2010). Управо дисоцијација хидроксилних јона из аморфног калцијум-хидроксида условљава појаву коагулационе некрозе, односно доводи до развоја локалне запаљенске реакције индукцијом експресије проинфламаорних цитокина, пре свега IL-1 (Chen et al., 2011; Tran et al., 2012). Иако постоје наводи да се рН вредности материјала на бази калцијум-силиката одржавају високим у дужем временском

периоду, оне ипак опадају у функцији времена (Fridland & Rosado, 2003; Sarkar et al., 2005; Antunes et al., 2006; Ozdemir et al., 2008; Natibovic-Kofman et al., 2008). Резултати овог истраживања потврдили су да су рН вредности везаних материјала, који су били предмет истраживања ове студије, благо алкалне. Управо одржавање алкланости у границама физиолошких испољава благотворне ефекте на процес репарације, односно остеогенезе, могућим порастом нивоа ALP и BMP-2 (Sangwan et al., 2013).

Сви тестирани материјали иницијално су показали благу до умерену запаљенску реакцију коштаног ткива која се временом смиривала, што је у складу са резултатима претходних истраживања (Torabinejad et al., 1995; Torabinejad et al., 1998; Moretton et al., 2000; Saidon et al., 2003). Инфламаторни одговор коштаног ткива најслабијег интензитета био је присутан у групи узорак ALBO-MPCSA₁ и MTA⁺ након 90 дана што указује на изузетно добру толеранцију ткива домаћина на испитиване материјале, а може се објаснити њиховим сличним хемијским саставом.

С друге стране, запаљенски одговор мишићног ткива, потпуно очекивано, био је интензивнији, али се смиривао са временом; фиброзна капсула постајала је тања и јасно ограниченија од околног ткива, што представља добре знаке ткивног опоравка. Резултати нашег истраживања били су у складу са резултатима ранијих студија који су процењивали степен запаљенске реакције поткожном имплементацијом материјала на бази калцијум-силиката (Moretton et al., 2000; Holland et al., 2001; Yaltirik et al., 2004), и једином доступном студијом која је користила интрамишићни имплементациони модел (Lin et al., 2013). Најинтензивнији запаљенски одговор регистрован је у сва три времена посматрања у случају GREY-MPCSA, што је и било очекивано и у складу са резултатима хемијске карактеризације, односно последица присуства тешких метала, пре свега бакра, гвожђа и алуминијума у хидратисаним узорцима.

Међутим, и поред разлика у хемијском саставу, прикупљени подаци у оквиру овог истраживања упућују да не постоје статистички значајане разлике у степену запаљенског одговора између испитиваних материјала. Конфликтни резултати доступни у вези са реакцијом меких ткива између материјала на бази калцијум-

силиката могу бити приписани, поред разлика у хемијском саставу испитиваних материјала и коришћењу различитих критеријума за хистолошку оцену (Shahi et al., 2006; Vosoughhosseini et al., 2008). У оквиру наше студије коришћени су модификовани критеријуми *Panzarini* и сарадника (Panzarini et al., 2007) и Pinheiro и сарадника (Pinheiro et al., 2011), због њихове свеобухватности.

Присуство циновских ћелија (енгл. *Foreign body giant cells*, FBGC) уочено је у случају коштаног ткива само код једног узорка ALBO-MPCА₂ и МТА⁺, односно код два узорка ALBO-MPCА₁ и GREY-MPCА након 30 дана, док је након 90 дана позитиван налаз регистрован код само једног узорка ALBO-MPCА₂. Насупрот томе, када је реч интрамишићној имплементацији испитиваних материјала, значајне разлике у присуству FBGC уочене су једино између материјала МТА⁺ и GREY-MPCА након 15 дана, што је доказ смиривања запаљенског процеса у функцији времена.

Расипање честица материјала у ткиву даље од места имплантације није било запажено ни код једног узорка материјала који су били предмет истраживања без обзира на врсту ткива, што упућује на добру толеранцију ткива на испитиване материјале. Присуство микроорганизама такође није регистровано хистопатолошким анализом узорака испитиваних материјала у нашој студији. Ови резултати су у складу са чињеницом да материјали који у току везивања остварују високу алкалност, испољавају антибактеријске ефекте на одређене врсте микроорганизама, што су потврдиле и рН анализе у нашем истраживању.

Одабир експерименталних животиња, величине и облика имплантираног материјала, као времена посматрања (30 и 90 дана), у оквиру ове студије, спроведени су у складу са препорукама *ISO* стандарда (*ISO 10993-6: 2007, Part 6*). Добијени резултати су показали да све тестиране материјале одликује биокомпатибилност и способност индукције младог коштаног ткива ткива, с тим да је апликација материјала ALBO-MPCА₁ резултирала најбољим биолошким одговором ткива. Употреба већег броја животиња, а тиме већег броја узорака по времену посматрања допринела би релевантнијој статистичкој анализи добијених резултата и отворила могућности за даљу клиничку употребу испитиваних материјала.

6. Закључци

6. Закључци

На основу спроведених испитивања биокомпатибилности и биоактивности наноматеријала на бази активних калцијум-силикатних система може се закључити следеће:

- Резултати карактеризације показују да су синтетисани материјали адекватно дизајнирани и да имају одговарајућу морфологију површине која је од значаја за њихову биоактивност,
- Биолошка вредност испитиваних материјала ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂ и GREY-MPCA била је задовољавајућа, мерена постојаном и благо алкалном рН вредношћу у оквиру физиолошких граница,
- Биокомпатибилност испитиваних материјала мерена тестовима цитотоксичности показала је добре резултате и компарабилне вредности са контролним материјалом,
- SCAP ћелије у директном контакту са испитиваним материјалима, посебно у случају ALBO-MPCA₁ и ALBO-MPCA₂ испољавале су морфологију сличну фибробластима, док су се дисолвиране партикле испитиваних материјала концентрисале на самим ћелијама и дуж њихових цитоплазматских продужетака, што говори у прилог њихове биокомпатибилности,
- *In vivo* имплементација испитиваних материјала ALBO-MPCA₁, ALBO-MPCA₂ и GREY-MPCA указује на изузетно добру толеранцију мишићног ткива домаћина на тестиране материјале, мерена нивоом запаљенске реакције.
- Реакција коштаног ткива на испитиване материјале показала је изражену биокомпатибилност; а материјал ALBO-MPCA₁ и изузетну биокондуктивност у директном контакту са новоформираним коштаном ткивом.
- Сви испитивани материјали при директном контакту са пулпним ткивом на моделу културе хуманих зуба испољавају знакове одонтогених репараторних процеса.

- Резултати спроведених истраживања показују да испитивани материјали представљају изузетно добре кандидате за даља клиничка истраживања.

7. Литература

7. Литература

- Abdullah D, Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials* 2002;23:4001–10.
- Abedi HR, Ingle JJ. Mineral trioxide aggregate: a review of a new cement. *Journal of the California Dental Association* 1995;23:36–9.
- Accorinte ML, Loguercio AD, Reis A, Bauer JR, Grande RH, Murata SS, Souza V, Holland R. Evaluation of two mineral trioxide aggregate compounds as pulp-capping agents in human teeth. *Journal of Endodontics* 2009;42:122–8.
- Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *International Endodontic Journal* 2002;36:225–31.
- Aligizaki KK. Pore structure of cement-based materials: testing interpretation and requirements. Taylor & Francis, 2006.
- American Association of Endodontists. Glossary of Endodontic Terms, 7th edn. Chicago, IL: American Association of Endodontists, 2003.
- Andelin WE, Shabahang S, Wirght K, Torabinejad M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. *Journal of Endodontics* 2003;29:646–50.
- Andersen MD, Jakobsen HJ, Skibsted J. Incorporation of aluminum in the calcium silicate hydrate (C-S-H) of hydrated Portland cements: a high-field ^{27}Al and ^{29}Si MAS NMR investigation. *Inorganic Chemistry* 2003;42:2280–7.
- Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dental Traumatology* 2002;18:134–7.
- Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth, Copenhagen, Blackwell Munksgaard, 2007.
- Anderson JM. Biological responses to materials. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2001;31:81–110.

- Antunes Bortoluzzi E, Juarez Broon N, Antonio Hungaro Duarte M, De Oliveira Demarchi AC, Bramante M. The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and white Portland cement. *Journal of Endodontics* 2006;32:1194–7.
- Assmann E, Böttcher DE, Hoppe CB, Grecca FS, Kopper PM. Evaluation of bone tissue response to a sealer containing mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* 2015;41:62–6.
- Asrari M, Lobner D. In vitro neurotoxic evaluation of root-end-filling materials. *Journal of Endodontics* 2003;29:743–6.
- Asgary S, Parirokh M, Egbbal MJ, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* 2005;31:101–3.
- Bates CF, Carnes DL, Del Rio CE. Longitudinal sealing ability of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *Journal of Endodontics* 1996;22:575–8.
- Bayne SC. Dental restoration for oral rehabilitation-testing of laboratory properties versus clinical performance for clinical decision making. *Journal of Oral Rehabilitation* 2007;34:921–32.
- Balto HA. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study. *Journal of Endodontics* 2004;30:25–9.
- Bensted J, Barnes P. *Structure and performance of cements*. 2nd ed. Spon Press; 2002.
- Belio-Reyes IA, Bucio L, Cruz-Chavez E. Phase composition of ProRoot mineral trioxide aggregate by X-ray powder diffraction. *Journal of Endodontics* 2009;35:875–8.
- Bogen G, Kim JS, Bakland LK. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an observational study. *JADA* 2008;139:305–15.
- Boix T, Gomez-Morales J, Torrent-Burgues J, Monfort A, Pulgdomenech P, Rodriguez-Clemente R. Adsorption of recombinant human bone morphogenetic protein rhBMP-2m onto hydroxyapatite. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2005;99:1043–50.
- Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *Journal of Dental Research* 2004;83:408–13.

- Bonaccorsi E, Merlino S, Taylor HFW. The crystal structure of jennite, $\text{Ca}_9\text{Si}_6\text{O}_{18}(\text{OH})_6 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$. *Cement Concrete Research* 2004;34:1481–8.
- Bortoluzzi EA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Duarte MAH. Radiographic effect of different radiopacifiers on a potential retrograde filling material. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics* 2009;108:628–32.
- Bosetti M, Zanardi L, Hench L, Type CM. I collagen production by osteoblast-like cells cultured in contact with different bioactive glasses. *Journal of Biomedical Materials Research A* 2003;64:189–95.
- Bozeman TB, Lemon RR, Eleazer PD. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. *Journal of Endodontics* 2006;32:425–8.
- Bramante CM, Oliveira Demarchi ACC, De Moraes IG, Bernadineli N, Garcia RB, Spangberg LSW, et al. Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics* 2008;106:909–13.
- Brouwers HJH, van Eijk RJ. Alkali concentrations of pore solution in hydrating OPC. *Cement and Concrete Research* 2003;33:191–6.
- Bullard KM, Longaker MT, Lorenz HP Fetal wound healing: current biology. *World Journal of Surgery* 2003;27:54–61.
- Burgess J, Levin R, Watson T, Strassler H, Margolis F, Glassman G. Biodentine® bioactive dentin substitute. Available online: www.septodontusa.com
- Bye, GC. Introduction and composition of Portland cement. in: GC Bye (Ed.) *Portland Cement: Composition, Production and Properties*. Pergamon Press, Oxford; 1983:7–13.
- Camilleri J. Hydration characteristics of calcium silicate cements with alternative radiopacifiers used as root-end filling materials. *Journal of Endodontics* 2010;36:502–8.
- Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal* 2004;37:699–704.

- Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, Pitt Ford TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *International Endodontic Journal* 2005;38:834–42.
- Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Pitt Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dental Materials* 2005;21:297–303.
- Camilleri, J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal* 2007;40:462–70.
- Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal* 2008;41:408–17.
- Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dental Materials* 2013;29:580–93.
- Cetenovic B, Markovic D, Petrovic B, Peric T, Jokanovic V. Use of mineral trioxide aggregate in the treatment of traumatized teeth in children-two case reports. *Vojnosanit Pregl* 2013;70:781–4.
- Chang SW, Lee SY, Kum KY, Kim EC. Effects of ProRoot MTA, Bioaggregate, and Micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *Journal of Endodontics* 2014;40:113–8.
- Chen CC, Shie MY, Ding SJ. Human dental pulp cell response to new calcium silicate-based endodontic materials. *International Endodontic Journal* 2011;44:836–42.
- Chen CL, Huang TH, Ding SJ, Shie MY, Kao CT. Comparison of calcium and silicate cement and mineral trioxide aggregate biologic effects and bone markers expression in MG63 cells. *Journal of Endodontics* 2009;35:682–5.
- Chen JJ, Thomas JJ, Taylor HFW, Jennings HM. Solubility and structure of calcium silicate hydrate. *Cement Concrete Research* 2004;34:1499–519.
- Chen W, Brouwers HJH. Alkali binding in hydrated Portland cement paste. *Cement and Concrete Research* 2010;40:716–22.
- Chiang TY, Wei CK, Ding SJ. Effects of bismuth oxide on physicochemical properties and osteogenic activity of dicalcium silicate cements. *Journal of Medical Biology Engineering* 2013;34:30–5.

- Chng HK, Islam I, Yap AU, Tong YW, Koh ET. Properties of a new root-end filling material. *Journal of Endodontics* 2005;31:665–8.
- Churakov SV. Structure of the interlayer in normal 11 A tobermorite from an ab initio study. *European Journal of Mineralogy* 2009;21:261–71.
- Cintra LT, de Moraes IG, Estrada BP, Gomes-Filho JE, Bramante CM, Garcia RB, Bernardinelli N. Evaluation of the tissue response to MTA and MBPC: Microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. *Journal of Endodontics* 2006;32:556–9.
- Clark RAF *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, 2nd edn. New York, NY: Plenum Press, 1996.
- Cochrane Collaboration Website: <http://www.cochrane.org>.
- Combes C, Rey C. Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials. *Acta Biomaterialia* 2010;6:3362–78.
- Cong X, Kirkpatrick RJ. ²⁹Si MAS study of the structure of calcium silicate hydrate. *Advanced Chemistry Based Materials* 1996;3:144–56.
- Corral Nunez CM, Bosomworth HJ, Field C, Whitworth JM, Valentine RA. Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate Induce Similar Cellular Responses in a Fibroblast Cell Line. *Journal of Endodontics* 2014;40:406–11.
- Dammaschke T, Gerth HUV, Zuchner H, Schafer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dental Materials* 2005;21:731–8.
- Damaske T, Stratmann U, Wolff P, Sagheri D, Schafer E. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an immunohistological comparison with calcium hydroxide in rodents. *Journal of Endodontics* 2010;36:10–20.
- Damen JJM, Ten Cate JM. Silica-induced precipitation of calcium phosphate in the presence of inhibitors of hydroxyapatite formation. *Journal of Dental Research* 1992;71:453–7.
- Danesh G, Dammaschke T, Gerth HUV, Zandbiglari T, Schafer E. A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide aggregate and two Portland cements. *International Endodontic Journal* 2006;39:213–9.

- Darvell BW, Wu RC. MTA-an hydraulic silicate cement: review update and setting reaction. *Dental Materials* 2011;27:407–22.
- 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. *International Endodontic Journal* 2005;38:604–9.
- De Noirfontaine, MN, Dunstetter, F, Courtial, M, Gasecki, G, Signes-Frehel, M. Tricalcium silicate Ca_3SiO_5 , the major component of anhydrous Portland cement: on the conservation of distances and directions and their relationship to the structural elements. *Zeitschrift für Kristallographie* 2003;218:8–11.
- De Rossi A, Silva LA, Gatón-Hernández P, Sousa-Neto MD, Nelson-Filho P, Silva RA, de Queiroz AM. Comparison of pulpal responses to pulpotomy and pulp capping with biodentine and mineral trioxide aggregate in dogs. *Journal of Endodontics* 2014;40:1362–9.
- De Vasconcelos BC, Bernardes RA, Luna Cruz SM, Duarte MAH, De Magalhaes Padilha P, Bernardineli N, et al. Evaluation of pH and calcium ion release of new root-end filling materials. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics* 2009;108:135–9.
- Deller-Quinn M, Perinpanayagam H. Osteoblast expression of cytokines is altered on MTA surfaces. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2009;108:302–7.
- Dey A, Bomans PH, Müller FA, Will J, Frederik PM, de With G, et al. The role of prenucleation clusters in surface- induced calcium phosphate crystallization. *Nature Materials* 2010;9:1010–4.
- 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. *Journal of Endodontics* 2006;34:748–51.
- Do Nascimento C, Issa JP, Iyomasa MM, Regalo SC, Siéssere S, Pitol DL, de Oliveira Wolga N, Pedrazzi V. Bone repair using mineral trioxide aggregate combined to a material carrier, associated or not with calcium hydroxide in bone defects. *Micron* 2008;39:868–74.

- El-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM. Effect of serum proteins on osteoblast adhesion to surface-modified bioactive glass and hydroxyapatite. *Journal of Orthopaedic Research* 1999;17:340–5.
- Faraco IM, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate of a calcium hydroxide cement. *Dental Traumatology* 2001;17:163–6.
- Fayad MI, Hawkinson R, Daniel J, Hao J. The effect of CO₂ laser irradiation on PDL cell attachment to resected root surfaces. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2004;97:518–23.
- Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. Mineral trioxide aggregate with anti-washout gel-properties and microstructure. *Dental Materials* 2013;29:294–306.
- Fridland M, Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *Journal of Endodontics* 2003;29:814–7.
- Fridland M, Rosado R. MTA solubility: a long term study. *Journal of Endodontics* 2005;31:376–9.
- Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* 2006;160:171–7.
- Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, De Stefano Dorigo E, Rossi PL, Prati C. Kinetics of apatite formation on a calcium-silicate cement for root-end filling during ageing in physiological-like phosphate solutions. *Clinical Oral Investigation* 2010;14:659–68.
- Gandolfi MG, Van Landuyt K, Taddei P, Modena E, Van Meerbeek B, Prati C. ESEM-EDX and Raman techniques to study ProRoot MTA and calcium-silicate cements in wet conditions and in real-time. *Journal of Endodontics* 2010;36:851–7.
- Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, De Stefano Dorigo E, Prati C. Alpha-TCP improves the apatite-formation ability of calcium-silicate hydraulic cement soaked in phosphate solutions. *Materials Science Engineering C* 2011;31:1412–22.
- Gandolfi MG, Taddei P, Modena E, Siboni F, Prati C. Biointeractivity-related vs chemi/physisorption-related apatite precursor-forming ability of current root end filling materials. *Journal of Biomedical Materials Research B* 2013;101B:1107–23.

- Gandolfi MG, Siboni F, Primus CM, Prati C. Ion Release, Porosity, Solubility, and Bioactivity of MTA Plus Tricalcium Silicate. *Journal of Endodontics* 2014;40:1632–7.
- Garcia AJ, Ducheyne P, Boettiger D. Effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998;40:48–56.
- Garcia-Godoy F, Murray PE. Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. *Dental Traumatology* 2012; 28:33–41.
- Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M. In vitro evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. *Endodontic Dental Traumatology* 1993;9:249–53.
- Gérard C, Bordeleau LJ, Barralet J, Doillon CJ. The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper. *Biomaterials* 2010;31:824–31.
- Gerstenfeld C, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry* 2003;88:873–84.
- 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. *Journal of Endodontics* 2011;37:203–10.
- Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabe PF, de Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *Journal of Endodontics* 2009;35:256–60.
- Gomes-Filho JE, Costa MM, Cintra LT, Duarte PC, Takamiya AS, Lodi CS, et al. Evaluation of rat alveolar bone response to Angelus MTA or experimental light-cured mineral trioxide aggregate using fluoro-chromes. *Journal of Endodontics* 2011;37:250–4.
- Greenspan DC, Hench LL. Chemical and mechanical behavior of bioglass-coated alumina. *Journal of Biomedical Materials Research* 1976;10:503–9.
- Grisham MB, *Reactive Metabolites of Oxygen and Nitrogen in Biology and Medicine*, R.G. Landes Co., Austin, 1992.

- Greenberg SA, Chang TN. The hydration of tricalcium silicate. *J Phys Chem* 1965;69:553–61.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008;453:314–21.
- Güven G, Çehreli ZC, Ural A, Serdar MA, Basak F. Effect of mineral trioxide aggregate cements on transforming growth factor beta1 and bone morphogenic protein production by human fibroblasts in vitro. *Journal of Endodontics* 2007;33:447–50.
- Han L, Okiji T, Okawa S. Morphological and chemical analysis of different precipitates on mineral trioxide aggregate immersed in different fluids. *Dental Materials Journal* 2010;29:512–7.
- Hatibovic-Kofman S, Raimundo L, Zheng L, Chong L, Friedman M, Andreasen JO. Fracture resistance and histological findings of immature teeth treated with mineral trioxide aggregate. *Dental Traumatology* 2008;24:272–6.
- Heithersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. *Journal of the British Endodontic Society* 1975;8:74–93.
- Hensten-Pettersen A, Helgeland K. Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1977;85:291–6.
- Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabe PF, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *Journal of Endodontics* 1999;25:161–6.
- Holland R, de Souza V, Nery MJ, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Brazilian Dental Journal* 2001;12:3–8.
- Holland R, de Souza V, Nery MJ, et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. *Journal of Endodontics* 2002;28:173–6.
- Holland R, Souza V, Nery MJ, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Brazilian Dental Journal* 2002;13:23–6.

- Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass–ceramics. *Biomaterials* 2011;32:2757–74.
- Horsted-Bindslev P, Lovshall H. Treatment outcome of vital pulp treatment. *Endodontic Topics* 2002;2:24–34.
- Hu GF. Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *Journal of Cellular Biochemistry* 1998;69:326–35.
- Huang TH, Ding SJ, Hsu TC, Kao CT. Effects of mineral trioxide aggregate (MTA) extracts on mitogen-activated protein kinase activity in human osteosarcoma cell line (U2OS). *Biomaterials* 2003;24:3909–13.
- Huang TH, Yang CC, Ding SJ, Yeng M, Kao CT, Chou MY. Inflammatory cytokines reaction elicited by root-end filling materials. *Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials* 2005;73:123–8.
- Hwang YC, Lee SH, Hwang IN, et al. Chemical composition, radiopacity, and biocompatibility of Portland cement with bismuth oxide. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2009;107:e96–102.
- Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *Journal of Endodontics* 2006;32:193–7.
- International Standards Organization. Biological evaluation of medical devices. Part 1: guidance on selection of tests. ISO 10993-1, 1st ed. 1992-04-15.
- International Standards Organization. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. ISO 10993-5, 3rd ed. 2009-06-01.
- Iwamoto CE, Adachi E, Pameijer CH, Barnes D, Romberg EE, Jeffries S. Clinical and histological evaluation of white ProRoot MTA in direct pulp capping. *American Journal of Dentistry* 2006;19:85–90.
- Jafarnia B, Jiang J, He J, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Evaluation of cytotoxicity of MTA employing various additives. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2009;107:739–44.
- Jokanović, V. 2012. Nanomedicine, the greatest challenge of 21. century [book in Serbian], Datastatus, Belgrade.

- Jokanovic V, Colovic B, Mitric M, Markovic D, Cetenovic B. Synthesis and properties of a new endodontic material based on nanostructured highly active calcium-silicates and calcium carbonates. *International Journal of Applied Ceramic Technology* 2014;11:57–64.
- Jugdaohsingh R, Tucker KL, Qiao N, Cupples LA, Kiel DP, Powell JJ. Dietary silicon intake is positively associated with bone mineral density in men and premenopausal women of the Framingham Offspring cohort. *Journal of Bone and Mineral Research* 2004;19:297–307.
- Jung JY, Woo SM, Lee BN, Koh JT, Nor JE, Hwang YC. Effect of Biodentine and Bioaggregate on odontoblastic differentiation via mitogenactivated protein kinase pathway in human dental pulp cells. *International Endodontic Journal* 2015;48:177–84.
- Kao CT, Tsai CH, Huang TH. Tissue and cell reactions to implanted root-end filling materials. *Journal of Material Science Materials in Medicine* 2006;17:841–7.
- Karimjee CK, Koka S, Rallis DM, Gound TG. Cellular toxicity of Mineral trioxide aggregate mixed with an alternative delivery vehicle. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2006;102:115–20.
- Kawahara H, Yamagami A, Nakamura M. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *International Dental Journal* 1968;18:443–67.
- Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Endodontics* 2000;26:288–91.
- Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2003;66:247–59.
- Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials* 2004;25:5947–54.
- Kim EC, Lee BC, Chang HS, Lee W, Hong CU, Min KS. Evaluation of the radiopacity and cytotoxicity of Portland cements containing bismuth oxide. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2008;105:e54–7.

- Kim YS, Woo YK, Chung JW, Yang SC, Kwon SY, Lee EJ, Lee KH. Effect of BaSO₄ in Bone Cement on Rat Osteoblast. *Journal of Korean Orthopedic Research Society* 2002;5:20–5.
- Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics* 1998;24:543–7.
- Komabayashi T, Spangberg LSW. Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and Portland cement: a study with a flow particle image analyzer. *Journal of Endodontics* 2008;34:94–8.
- Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Economides NA, Beltes P, Kortsaris AH. Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide-eugenol cement, and glass-ionomer cement against three fibroblastic cell lines. *Journal of Endodontics* 2005;31:44–6.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th edn. Philadelphia, PA:Saunders, 2009.
- Laliz EM, Esain ML, Kokubu GA, Willis J, Chaves C, Grana DR. Rat subcutaneous tissue response to modified Portland cement, a new mineral trioxide aggregate. *Brazilian Dental Journal* 2009;20:112–7.
- Lee YL, Lee BS, Lin FH, Yun Lin A, Lan WH, Lin CP. Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 2004;25:787–93.
- Leirskar J, Helgeland K. A methodologic study of the effect of dental materials on growth and adhesion of animal cells in vitro. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1972;80:120–33.
- Lesot H, Beguekirn C, Kubler MD, Meyer JM, Smith AJ et al. Experimental induction of odontoblast differentiation and stimulation during reparative processes. *Cells & Materials* 1993;3:201–17.
- Lin CP, Chen YJ, Lee YL, Wang JS, Chang MC, Lan WH et al. Effects of root-end filling materials and eugenol on mitochondrial dehydrogenase activity and cytotoxicity to human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2004;71:429–40.

- Lin K, Lunguo X, Jingbo G, Zhiyuan Z, Hong C, Xinquan J, Jiang C. Tailoring the Nanostructured Surfaces of Hydroxyapatite Bioceramics to Promote Protein Adsorption, Osteoblast Growth, and Osteogenic Differentiation. *ACS Applied Materials and Interfaces* 2013;5:8008–17.
- Lin Q, Zhang W, Lu C, Hou G, Xu Z. In vivo investigation of biological responses to tricalcium silicate pastes in muscle tissue. *Ceramics International* 2014;40:1879–83.
- Longaker KT, Bouhana KS, Harrison MR, Danielpour D, Roberts AB, Banda MJ. Wound healing in the fetus. Possible role for inflammatory macrophages and transforming growth factor- β isoforms. *Wound Repair and Regeneration* 1994;2:104–12.
- Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, et al. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* 2005;26:4847–55.
- Majno G, Joris I. *Cells, Tissues, and Disease*, 2nd edn. Oxford, London, UK: Oxford University Press, 2004.
- Marie PJ. The calcium-sensing receptor in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone* 2010;46:571–6.
- Martin P, Parkhurst SM. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* 2004;131:3021–34.
- Markovic D, Cetenovic B, Vukovic A, Markovic T, Jokanovic V. In book: *NanoBioMaterials in Dentistry*, Edition: 1st, Chapter XI: Nanosynthesized calcium silicate based biomaterials in endodontic treatment of young permanent teeth, Publisher: Elsevier, Editors: Alexandru Mihai Grumezescu, *In press* 2016.
- Martin RL, Monticelli F, Brackett WW, Loushine RJ, Rockman RA, Ferrari M, et al. Sealing properties of mineral trioxide aggregate orthograde apical plugs and root fillings in an in vitro apexification model. *Journal of Endodontics* 2007;33:272–5.
- Marques AP, Reis RL, Hunt JA. The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. *Biomaterials* 2002;23:1471–8.
- Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VGG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and

- white Portland cements as wound dressings. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2004;98:376–9.
- Min KS, Chang HS, Bae JM, Park SH, Hong CU, Kim EC. The induction of heme oxygenase-1 modulates bismuth oxide-induced cytotoxicity in human dental pulp cells. *Journal of Endodontics* 2007;33:1342–6.
- Mitchell PJ, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 1999;20:167–73.
- Mizuno M, Banzai Y (2008) Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *International Endodontic Journal* 2008;41:933–8.
- Mjör IA. Minimum requirement for new dental materials. *Journal of Oral Rehabilitation* 2007;34:907–12.
- 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. *International Endodontic Journal* 2011;44:154–61.
- Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *Journal of Endodontics* 2005;31:387–91.
- Monsein LH. Primer on medical device regulations: Part II. Regulation of medical devices the by U.S. Food and Drug Administration. *Radiology* 1997;205:10–8.
- Moore A, Howley MF, O'connell AC. Treatment of open apex teeth using two types of white mineral trioxide aggregate after initial dressing with calcium hydroxide in children. *Dental Traumatology* 2011;27:166–73.
- Moretton TR, Brown Jr CE, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000;52:528–33.
- Murray PE, Hafez AA, Smith AJ, Windsor LJ, Cox CF. Histomorphometric analysis of odontoblast-like cell numbers and dentine bridge secretory activity following pulp exposure. *International Endodontic Journal* 2003;36:106–16.

- Nair PN, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *International Endodontic Journal* 2008;41:128–50.
- Nakayama A, Ogiso B, Tanabe N, Takeichi O, Matsuzaka K, Inoue T. Behaviour of bone marrow osteoblast-like cells on mineral trioxide aggregate: morphology and expression of type I collagen and bone-related protein mRNAs. *International Endodontic Journal* 2005;38:203–10.
- Natale LC, Rodrigues MC, Xavier TA, Simões A, de Souza DN, Braga RR. Ion release and mechanical properties of calcium silicate and calcium hydroxide materials used for pulp capping. *International Endodontic Journal* 2015;48:89–94.
- Niu L, Jiao K, Wang T, Zhang W, Camilleri J, Bergeron BE, et al. A review of the bioactivity of hydraulic calcium silicate cements. *Journal of Dentistry* 2014;42:517–33.
- Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, Kaczmarek W, Buczkowska-Radlińska J. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* 2013;39:743–7.
- Odler, I. Constituents and composition. in: I Odler (Ed.) *Special Inorganic Cements*. Taylor & Francis, Oxford; 2000:9–12.
- Okabe T, Sakamoto M, Takeuchi H, Matsushima K. Effects of pH on mineralization ability of human dental pulp cells. *Journal of Endodontics* 2006;32:198–201.
- Oviir T, Pagoria D, Ibarra G, Geurtsen W. Effect of gray and white mineral trioxide aggregate on proliferation of oral keratinocytes and cementoblasts. *Journal of Endodontics* 2006;32:210–3.
- Ozdemir HO, Ozçelik B, Karabucak B, Cehreli ZC. Calcium ion diffusion from mineral trioxide aggregate through simulated root resorption defects. *Dental Traumatology* 2008;24:70–3.

- Panzarini SR, Holland R, De Souza V, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D. Mineral trioxide aggregate as a root canal filling material in reimplanted teeth. Microscopic analysis in monkeys. *Dental Traumatology* 2007;23:265–72.
- Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. *Journal of Endodontics* 2010;36:1042–7.
- Pardal X, Pochard I, Nonat A. Experimental study of Si–Al substitution in calcium-silicate-hydrate (C-S-H) prepared under equilibrium conditions. *Cement and Concrete Research* 2009;39:637–53.
- Park JW, Hong SH, Kim JH, Lee SJ, Shin SJ. X-Ray diffraction analysis of white ProRoot MTA and Diadent BioAggregate. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2010;109:155–8.
- Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ, Stowe S, Eslami B, Eskandarizade A, Shabahang S. A comparative study of white and grey mineral trioxide aggregate as pulp capping in dog's teeth. *Dent Traumatology* 2005;21:150–4.
- Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part III: clinical applications, drawbacks and mechanism of action. *Journal of Endodontics* 2010;36:400–13.
- Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *Journal of Endodontics* 2008;34:421–6.
- Perez AL, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot MTA and White MTA. *International Endodontic Journal* 2003;36:564–70.
- Petrović V, Marković D, Cakić S, Krstić N. Clinical study on the influence of hydroxyapatite on apexogenesis in monkeys. *Acta Veterinaria* 2008;58:395–409.
- Pinheiro AL, Soares LG, Aciole GT, Correia NA, Barbosa AF, Ramalho LM, Dos Santos JN. Light microscopic description of the effects of laser phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided

- bone regeneration in a rodent model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2011;98:212–21.
- Pistorius A, Willershausen B, Briseño Marroquin B. Effect of apical root-end filling materials on gingival fibroblasts. *International Endodontic Journal* 2003;36:610–5.
- Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abredi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *Journal of American Dental Association* 1996;127:1491–4.
- Radziun E, Dudkiewicz Wilczynska JD, Ksiazek I, Nowak K, Anuszezwska EL, Kunicki A, Olszyna A, Zabkowski T. Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells. *Toxicology in Vitro* 2011;25:1694–1700.
- Rahimi S, Mokhtari H, Shahi S, Kazemi A, Asgary S, Eghbal MJ, et al. Osseous reaction to implantation of two endodontic cements: mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium enriched mixture (CEM). *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal* 2012;17:e907–11.
- Rashid F, Shiba H, Mizuno N, Mouri Y, Fujita T, Shinohara H, Ogawa T The effect of extracellular calcium ion on gene expression of bonerelated proteins in human pulp cells. *Journal of Endodontics* 2003;29:104–7.
- Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2004;6:41–75.
- Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HFJ, Evans BAJ, Thompson RPH, et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 2003;32:127–35.
- Ridi F, Fratini E, Milani S, Baglioni P. Near-infrared spectroscopy investigation of the water confined in tricalcium silicate pastes. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006;110:16326–31.
- Rodhe Y, Skoglund S, Wallinder IO, Potáčová Z, Möller L. Copper-based nanoparticles induce high toxicity in leukemic HL60 cells. *Toxicology in Vitro* 2015;29:1711–9.
- Rodríguez JP, Ríos S, González M. Modulation of the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells by copper. *Journal of Cellular Biochemistry* 2002;85:92–100.

- Saghiri MA, Garcia-Godoy F, Asatourian A. Effect of pH on some modifications of mineral trioxide aggregate. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal* 2013;18:e714–20.
- Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2003;95:483–9.
- Sangwan P, Sangwan A, Duha J, Rohilla A. Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: A review of proposed mechanisms. *International Endodontic Journal* 2013;46:3–19.
- Sarkar NK, Caidedo R, Tirwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* 2005;31:97–100.
- Sarkar A, Sil PC. Iron oxide nanoparticles mediated cytotoxicity via PI3K/AKT pathway: Role of quercetin. *Food and Chemical Toxicology* 2014;71:106–15.
- Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clinical Oral Investigations* 1997;1:154–62.
- Schröder HC, Wang XH, Wiens M, Diehl-Seifert B, Kropf K, Schloßmacher U, et al. Silicate modulates the cross-talk between osteoblasts (SaOS-2) and osteoclasts (RAW 264.7 cells): inhibition of osteoclast growth and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 2012;113:3197–206.
- Seitz TL, Noonan KD, Hench LL, Noonan NE. Effect of fibronectin on the adhesion of an established cell line to a surface reactive biomaterial. *Journal of Biomedical Materials Research* 1982;16:195–207.
- Shahi S, Rahimi S, Lotfi M, Yavari H, Gaderian A. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. *Journal of Endodontics* 2006;32:776–80.
- Shayegan A, Jurysta C, Atash R, Petein M, Abbeele AV. Biodentine used as a pulp-capping agent in primary pig teeth. *Pediatric Dentistry* 2012;34:202–8.
- Shen Q, Sun J, Wu J, Liu C, Chen F. An in vitro investigation of the mechanical–chemical and biological properties of calcium phosphate/calcium silicate/bismutite cement for

- dental pulp capping. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* 2010;94:141–8.
- Silva GN, Braz MG, de Camargo EA, Salvadori DM, Ribeiro DA. Genotoxicity in primary human peripheral lymphocytes after exposure to regular and white mineral trioxide aggregate. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2006;102:e50–4.
- Silva LGR, Kim SH, Luczyszyn SM, Papalexiou V, Giovanini A, Almeida LE, Tramontina VA. Histological and immunohistochemical evaluation of biphasic calcium phosphate and a mineral trioxide aggregate for bone healing in rat calvaria. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2015;44:535–42.
- Silver IA, Deas J, Erecińska M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials* 2001;22:175–85.
- Simon S, Rilliard F, Berdal A, Machtou P. The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. *International Endodontic Journal* 2007;40:186–97.
- Smith AJ, Tobias RS, Murray PE. Transdentinal stimulation of reactionary dentinogenesis in ferrets by dentine matrix components. *Journal of Dentistry* 2001;29:341–6.
- Soroka I. Portland cement paste and concrete. The Macmillan Press Ltd, 1979.
- Sousa CJ, Loyola AM, Versiani MA, Biffi JC, Oliveira RP, Pascon EA. A comparative histological evaluation of the biocompatibility of materials used in apical surgery. *International Endodontic Journal* 2004;37:738–48.
- Spangberg L. Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 1973;35:389–401.
- Storm B, Eichmiller FC, Tordik PA, Goodell GG. Setting expansion of gray and white mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Journal of Endodontics* 2008;34:80–2.
- Sumer M, Muglali M, Bodrumlu E, Guvenc T. Reactions of connective tissue to amalgam, intermediate restorative material, mineral trioxide aggregate, and mineral trioxide aggregate mixed with chlorhexidine. *Journal of Endodontics* 2006;32:1094–6.

- Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PC, Pinter J. Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation. *Science* 2013;341:1240104.
- Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, Ito K. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *International Endodontic Journal* 2006;39:415–22.
- Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T. Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. *Journal of Endodontics* 2007;33:836–9.
- Tay FR, Pashley DH, Rueggeberg FA, Loushine RJ, Weller RN. Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the Portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. *Journal of Endodontics* 2007;33:1347–51.
- Taylor HFW, Howison JW. Relationship between calcium silicates and clay minerals. *Clay Minerals Bulletin* 1956;3:98–111.
- Taylor HFW. High temperature chemistry, in: HFW Taylor Cement Chemistry. Academic Press, New York; 1990:28–32.
- Tecles O, Laurent P, Aubut V, About I. Human tooth culture: a study model for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* 2008;85:180–7.
- Thomson TS, Berry JE, Somerman MJ, Kirkwood KL. Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* 2003;29:407–12.
- Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bioactive dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *Journal of Dentistry* 2007;35:636–42.
- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kaiyawasam SP. Tissue reaction to implanted super-EBA and mineral trioxide aggregate in the mandible of guinea pigs: a preliminary report. *Journal of Endodontics* 1995;21:569–71.

- Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *Journal of Endodontics* 1995;21:349–353.
- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *Journal of Endodontics* 1995;21:489–92.
- Torabinejad M, Ford TR, Abedi HR, Kariyawasam SP, Tang HM. Tissue reaction to implanted root-end filling materials in the tibia and mandible of guinea pigs. *Journal of Endodontics* 1998;24:468–71.
- 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. *Journal of Dental Research* 2012;91:1166–71.
- Trope M. Endodontic considerations in dental trauma. In: Ingle, J. I., Bakland, L. K. & Baumgartner, J. C. (eds.) *Ingle's endodontics 6*. BC Decker Inc., Hamilton Ontario, 2008, pp. 1330–57.
- Turkun M, Cengiz T. The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on tissue dissolution and root canal cleanliness. *International Endodontic Journal* 1997;30:335–42.
- Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. Effects of extracellular calcium concentration on the glutamate release by bioactive glass (BG60S) preincubated osteoblasts. *Biomedical Materials* 2009;4:045011.
- Vivan RR, Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, Duarte MAH, et al. Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental root-end filling materials. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics* 2009;108:e35–8.
- Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, et al. Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. *Journal of Endodontics* 2008;34:715–7.
- Wang JD, Hume WR. Diffusion of hydrogen ion and hydroxyl ion from various sources through dentine. *International Endodontic Journal* 1988;21:17–26.
- Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dental Materials* 2012;28:23–40.

- Watts JD, Holt DM, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. Effects of pH and mixing agents on the temporal setting of tooth-colored and gray mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* 2007;33:970–3.
- Werner S, Gross R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiology Review* 2003;83:835–70.
- Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008;29:2941–53.
- Wilk, MB. The Randomization Analysis of a Generalized Randomized Block Design. *Biometrika*, 1955.
- Xia L, Lin K, Jiang X, Xu Y, Zhang M, Chang J, Zhang Z. Enhanced osteogenesis through nano-structured surface design of macroporous hydroxyapatite bioceramic scaffolds *via* activation of ERK and p38 MAPK signaling pathways. *Journal of Materials Chemistry B* 2013;1:5403–16.
- Xu JL, Khor KA, Sui JJ, Zhang JH, Chen WN. Protein expression profiles in osteoblasts in response to differentially shaped hydroxyapatite nanoparticles. *Biomaterials* 2009;30:5385–91.
- Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *Journal of Endodontics* 2004;30:95–9.
- Yamasaki Y, Yoshida Y, Okazaki M, Shimazu A, Uchida T, Kubo T, et al. Synthesis of functionally graded MgCO₃ apatite accelerating osteoblast adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002;62:99–105.
- Yan P, Yuan Z, Jiang H, Peng B, Bian Z. Effect of bioaggregate on differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *International Endodontic Journal* 2010;43:1116–21.
- Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. *Journal of Endodontics* 2008;34:1057–60.
- Yoldas O, Dogan C, Seydaoglu G. The effect of two different calcium hydroxide combinations on root dentine microhardness. *International Endodontic Journal* 2004;37:828–31.

- 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. *Brazilian Dental Journal* 2013;24:111–6.
- Yuan Z, Peng B, Jiang H, Bian Z, Yan P. Effect of bioaggregate on mineral-associated gene expression in osteoblast cells. *Journal of Endodontics* 2010;36:1145–8.
- Zhang S, Yang X, Fan M. BioAggregate and iRoot BP Plus optimize the proliferation and mineralization ability of human dental pulp cells. *International Endodontic Journal* 2013;46:923–9.
- Zhuang H, Zheng JP, Gao H, De Yao K. In vitro biodegradation and biocompatibility of gelatin/montmorillonite-chitosan intercalated nanocomposite. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 2007;18:951–7.
- Zayzafoon M. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006;97:56–70.
- Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, et al. Mechanisms of magnesium- stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002;62:175–84.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____

број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____

Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада _____

Ментор _____

Потписани/а _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

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

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

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

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

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

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