



**UNIVERZITET U BANJOJ LUCI**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**OGNJENKA JANKOVIĆ**

**BIOKOMPATIBILNOST NANOSTRUKTURNIH  
BIOMATERIJALA NA BAZI KALCIJUM  
ALUMINATA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**BANJA LUKA, 2018. GODINE**



**UNIVERSITY OF BANJA LUKA**  
**FACULTY OF MEDICINE**

**OGNJENKA JANKOVIĆ**

**BIOCOMPATIBILITY OF NANOSTRUCTURED  
BIOMATERIALS BASED ON CALCIUM  
ALUMINATE**

**DOCTORAL DISSERTATION**

**BANJA LUKA, 2018.**

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

## BIOKOMPATIBILNOST NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI KALCIJUM ALUMINATA

**Rezime:** Biokompatibilnost je sposobnost materijala da nakon aplikacije obavlja određenu funkciju u organizmu ne izazivajući pri tome neželjeni odgovor tkiva domaćina. Cilj ovog rada je bio da se ispita biokompatibilnost nanostrukturnih biomaterijala na bazi kalcijum aluminata (CA) u komparaciji sa kalcijum silikatom, kalcijum silikat hidroksiapatitom i komercijalnim mineraltrioksid agregatom. Istraživanje je realizovano u 4 faze: ispitivanje citotoksičnosti materijala primjenom MTT testa, ispitivanje genotoksičnosti materijala primjenom Komet testa, ispitivanje biokompatibilnosti materijala implantacijom u potkožno tkivo pacova i ispitivanje biokompatibilnosti materijala nakon direktnog prekrivanja eksponirane pulpe pacova. Prema rezultatima MTT-a samo je CS-HA pokazao citotoksičnu aktivnost, dok je ista izostala kod CA i MTA. Komet test je rađen na istoj ćelijskoj liniji (MRC-5) sa CA i CS-HA cementom. Prilikom Komet testa CA nije ispoljio genotoksični efekat, procenat oštećenja DNK pri svim primijenjenim koncentracijama je bio na nivou netretiranih kontrolnih ćelija, dok je CS-HA pokazao genotoksični potencijal pri koncentracijama  $\geq 12,5$  mg/mL. Prilikom in vivo studije potkožne implantacije na 18 pacova Wistar soja CA je pokazao komparativan rezultat sa CS-HA i MTA kad je u pitanju zapaljenje, uz najbolje organizovanu fibroznu kapsulu oko materijala i blagu narušenost strukture vezivnog tkiva. Prema rezultatima DPP kod većine ispitivanih uzoraka zuba zapaljenje je bilo odsutno ili je konstatovano prisustvo nekoliko raštrkanih upalnih ćelija. Bakterije nisu bile prisutne ni u jednom uzorku. Kod svih primijenjenih materijala je posle 30 dana došlo do formiranja dentinskog mosta. Kalcijum aluminat je indukovao stvaranje najkompletnijeg dentinskog mosta.

**Ključne riječi:** biokompatibilnost, citotoksičnost, genotoksičnost, potkožna implantacija, direktno prekrivanje pulpe, kalcijum aluminati.

Naučna oblast: Bolesti zuba

Naučno polje: Stomatologija

Klasifikaciona oznaka prema Cerif šifrarniku za naučnu oblast B001

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

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

## BIOCOMPATIBILITY OF NANOSTRUCTURED BIOMATERIALS BASED ON CALCIUM ALUMINATE

**Summary:** Biocompatibility is the ability of the material to perform a certain function in the body after an application without causing an adverse response to the host tissue. The aim of this paper was to examine the biocompatibility of calcium aluminate nanostructured biomaterials (CA) in comparison with calcium silicate, calcium silicate hydroxyapatite and commercial mineraltrioxide aggregate. The research was carried out in 4 phases: testing of cytotoxicity of the material using MTT test, examination of the genotoxicity of the material using the Comet test, testing of the biocompatibility of the material by implantation in the subcutaneous tissue of the rat and testing of the biocompatibility of the material after direct overlap of the exposed rat pulp. According to MTT results, only CS-HA showed cytotoxic activity, while it was absent in CA and MTA. The comet test was performed on the same cell line (MRC-5) with CA and CS-HA cement. During the Comet test CA did not exhibit a genotoxic effect, the percentage of DNA damage at all applied concentrations was at the level of untreated control cells, while CS-HA showed a genotoxic potential at concentrations of  $\geq$  12.5 mg / mL. During the in vivo subcutaneous implantation study of 18 rats, Wistar CA CA showed a comparative score with CS-HA and MTA when it comes to inflammation, with the best-organized fibrous capsule around the material and a mildly damaged structure of the connective tissue. According to DPP results, most infections of the tooth test were absent or the presence of several scattered inflammatory cells was observed. Bacteria were not present in any sample. With all the materials used, after 30 days, the dentine bridge was formed. Calcium aluminate induced the creation of the most complete dentine bridge.

**Keywords:** biocompatibility, cytotoxicity, genotoxicity, subcutaneous implantation, direct pulp capping, calcium aluminate.

**Scientific field:** Dental diseases

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

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

## *Zahvalnica*

Zahvaljujem se mentoru prof. dr Slavoljubu Živkoviću na izboru teme ove doktorske disertacije. Posebno sam mu zahvalna na pomoći da pobijedim sebe i prihvatom izazov da radim eksperiment na životinjama i ukazanoj časti da se bavim ispitivanjem novosintetisanog materijala cijenjenog prof. dr Vukomana Jokanovića.

Veliku zahvalnost dugujem veterinaru Goranu Parašu i njegovoј supruzi Smiljani, kolegama sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Banjaluci na pomoći u realizaciji eksperimentalnog dijela ovog rada, kao i doktoricama Tatjani Stanojković, Irini Besa i molekularnom biologu Željku Žižak, sa Instituta za onkologiju u Beogradu.

Zahvaljujem se profesorici dr Živki Eri na ogromnoj pomoći u prezentaciji histoloških rezultata i podataka.

Ogromnu zahvalnost dugujem kolegi dr Igoru Đukiću sa Katedre za oralnu hirurgiju, koleginicama Adrijani Arbutini i Mirjani Umićević Davidović sa Katedre za ortopediju vilica i svojim kolegama sa Katedre za bolesti zuba.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici koja mi je kao i uvijek do sada bila najveći oslonac, vjetar u leđa i najveća podrška, koja me bodrila i onda kada ja nisam vjerovala u sebe. Hvala vam što postojite, što podnosite sve moje dobre i loše faze i što ste uvijek tu uz mene. Neizmjerno vas volim!

*Ovaj doktorat posvećujem mojoj kćerki Anastasiji!*

Ognjenka Janković

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. PREGLED LITERATURE .....	5
1.1.1. Fizičko-hemijske karakteristike kalcijum aluminatnih sistema .....	5
1.1.2. Biološka aktivnost materijala na bazi kalcijum aluminata .....	14
1.1.2.1. Ispitivanje biokompatibilnosti kalcijum aluminatnih sistema u <i>in vitro</i> studijama .....	18
1.1.2.2. Ispitivanje biokompatibilnosti kalcijum aluminatnih sistema u <i>in vivo</i> uslovima .....	22
1.1.3. Primjena materijala na bazi kalcijum silikata u stomatologiji.....	25
1.1.3.1. Studije biokompatibilnosti kalcijum silikatnih cemenata .....	29
2. RADNA HIPOTEZA.....	34
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	35
4.MATERIJAL I METOD RADA .....	36
4.1. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI KALCIJUM ALUMINATNIH SISTEMA.....	38
4.1.1 Testirani materijali .....	38
4.1.1.1 Priprema ispitivanih cemenata .....	38
4.1.2. Hranljiva podloga i reagensi.....	38
4.1.3. Ćelijska linija.....	39
4.1.4. Određivanje intenziteta citotoksičnog dejstva ispitivanih cemenata.....	39
4.1.4.1. Tretman ćelija (određivanje ćelijskog preživljavanja).....	39
4.2. ISPITIVANJE GENOTOKSIČNOSTI KALCIJUM ALUMINATNIH SISTEMA.....	41
4.2.1. Testirani materijali .....	41
4.2.2. Priprema reagenasa .....	41
4.2.3. Priprema slajdova za SCGE/Komet test .....	43
4.2.4.Tretman ćelija .....	44
4.2.5. Elektroforeza mikrogel slajdova.....	44
4.2.6. Evaluacija DNK oštećenja .....	45
4.2.7. Statistička obrada podataka.....	45
4.3. ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI KALCIJUM ALUMINATNIH SISTEMA IMPLANTACIJOM U POTKOŽNO TKIVO: IN VIVO STUDIJA .....	46
4.3.1. Eksperimentalne životinje.....	46
4.3.1.1. Raspoređivanje pacova po grupama.....	46
4.3.2. Testirani materijali .....	46
4.3.3. Postupak rada .....	47
4.3.3.1 Hirurška intervencija .....	47

4.3.3.2. Histološka analiza .....	49
4.3.4. Statistička obrada podataka.....	51
4.4. ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI KALCIJUM ALUMINATNIH SISTEMA NAKON DIREKTNOG PREKRIVANJA PULPE .....	52
4.4.1. Uslovi eksperimenta.....	52
4.4.1.1. Eksperimentalne grupe .....	53
4.4.2. Terapijski postupak direktnog prekrivanje pulpe sa kalcijum aluminatom .....	54
4.4.3.Žrtvovanje životinja.....	55
4.4.4. Patohistološka analiza.....	56
4.4.5. Statistička analiza.....	57
5. REZULTATI .....	58
5.1. REZULTATI ISPITIVANJA CITOTOKSIČNOSTI KALCIJUM ALUMINATNIH SISTEMA PRIMJENOM MTT TESTA .....	58
5.2 REZULTATI ISPITIVANJA GENOTOKSIČNOSTI KALCIJUM ALUMINATNIH SISTEMA PRIMJENOM KOMET TESTA.....	60
5.3. REZULTATI ISPITIVANJA POTKOŽNE IMPLANTACIJE POLIETILENSKIH TUBICA KOD PACOVA WISTAR SOJA.....	62
5.3.1 Rezultati histološke analize nakon 7 dana .....	63
5.3.2. Rezultati histološke analize nakon 15 dana .....	67
5.3.3. Rezultati histološke analize nakon 30 dana .....	71
5.4. REZULTATI DIREKTNOG PREKRIVANJA PULPE PACOVA .....	79
5.4.1.Inflamacija pulpnog tkiva ispod kalcijum aluminata (CA).....	82
5.4.2 Inflamacija pulpnog tkiva ispod kalcijum silikata (CS) .....	84
5.4.3. Inflamacija pulpmog tkiva ispod CS-HA .....	86
5.4.4. Inflamacija pulpnog tkiva ispod MTA.....	87
6. DISKUSIJA .....	90
6.1. DISKUSIJA REZULTATA BIOKOMPATIBILNOSTI NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI KALCIJUM ALUMINATA: Procjenom citotoksičnosti .....	90
6.2.DISKUSIJA REZULTATA BIOKOMPATIBILNOSTI NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI KALCIJUM ALUMINATA: Procjenom genotoksičnosti .....	94
6.3. DISKUSIJA REZULTATA BIOKOMPATIBILNOSTI NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI KALCIJUM ALUMINATA NAKON POTKOŽNE IMPLANTACIJE .....	100
6.4. DISKUSIJA REZULTATA BIOKOMPATIBILNOSTI NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI KALCIJUM ALUMINATA NAKON DIREKTNOG PREKRIVANJA PULPE.....	104
7. ZAKLJUČAK .....	110
8. LITERATURA .....	111

## 1. UVOD

Težnje naučnih istraživanja konstantno su usmjereni ka otkrivanju novih biomaterijala koji će, uz posjedovanje biokompatibilnosti, bioaktivnosti i bioinduktivnosti, određenim izmjenama u sastavu i poboljšanim karakteristikama, prevazići uočene nedostatke postojećih.

Biokompatibilnost se definiše kao svojstvo materijala da nakon aplikacije ne izaziva neželjeni odgovor tkiva domaćina. Prema definiciji koju je dao *Wataha JC.* (2001), biokompatibilnost podrazumijeva harmoniju međusobne interakcije tkiva domaćina, korišćenog materijala i funkcije koju on obavlja, pri čemu se reakcija tkiva domaćina zadržava u granicama tolerancije [1].

Kako bi se potvrdila biokompatibilnost, materijali moraju zadovoljiti niz preduslova i proći kroz brojna in vitro testiranja, pa sve do kliničkih studija na ljudima. Primarni zadatak testova za biokompatibilnost je da se, na osnovu eksperimenata na ćelijama ili životinjama, predvide svi rizici primjene tih materijala i obezbijedi zaštita pacijenata na kojima će se isti primjenjivati, kao i osoblja koje će rukovati sa njima. Testovi kojima se procjenjuje biokompatibilnost materijala podijeljeni su u tri grupe: 1) prva grupa su primarni testovi (testovi citotoksičnosti i genotoksičnosti in vitro); 2) druga grupa su sekundarni testovi (ispituju sistemsku toksičnost na životinjama putem intramuskularne ili potkožne implantacije i 3) treća grupa pretklinički ili “usage” testovi (kod kojih se posmatra reakcija tkiva nakon primjene materijala na ciljanim tkivima životinja, odnosno klinički testovi na ljudima). Klinička relevantnost rezultata dobijenih u uslovima in vitro je veoma diskutabilna, ali se njima može znatno smanjiti broj testova na životinjama. Prava ocjena o nekom materijalu se može donijeti tek nakon njegove duže kliničke primjene [2-4].

Kalcijum aluminatni cementi (CAC) su razvijeni početkom 20. vijeka kao hemijski izdržljiviji materijali od Portland cementa. Njihova hidraulička kalcijumska faza obično sadrži 30 do 50 % aluminijuma, dok kod Portland cementa na aluminijum otpada manje od 5 %. Procentualna zastupljenost pojedinih elemenata koji ulaze u sastav CAC-a, u osnovi se može predstaviti na sledeći način:  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (43%);  $\text{CaO}$  (19%);  $\text{H}_2\text{O}$  (15%);  $\text{ZrO}_2$  (19%), dok na ostale sastojke (magnezijum, silicijum, željezo, titan i alkalni oksidi) otpada manje od 10% [5-7].

Kalcijum aluminatni cementi, koji se koriste u biomedicinske svrhe, su modifikacija aluminatnih cemenata, koji se upotrebljavaju u građevinarstvu i izradi kanalizacionih cijevi, zahvaljujući njihovoj otpornosti na kiseline i koroziju, te sposobnosti da izdrže veoma visoke temperature [8].

Zahvaljujući inertnosti, biokompatibilnosti i dovoljnoj jačini kalcijum aluminati se uspješno primjenjuju i u medicini, za izradu ortopedskih implantata [5].

U stomatologiji se pokušalo sa primjenom kalcijum aluminata za direktne restaurativne ispune na bočnim zubima, kod kavita I, II i V klase. Naime, kalcijum aluminat u prahu je inkorporiran u sastav direktnog restaurativnog materijala (DoxaDent; Doxa AB, Uppsala, Sweden, Scandinavia) i glasjonomer cementa (Ceramir C&B, Doxa AB). Materijal je trebalo da posluži kao „biokeramička“ alternativa za amalgam i konvencionalne kompozite. Bazirao je na dva osnovna sastojka:  $\text{Al}_2\text{O}_3$  i  $\text{CaO}$ , uz male primjese  $\text{ZnO}_2$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  i  $\text{SiO}_2$ . Očekivalo se da će direktne restauracije ovim materijalom pokazati trajnost kao komercijalni kompoziti. Međutim, tokom dvogodišnjeg kliničkog praćenja, Doxa nije pokazala klinički uspjeh, vjerovatno zbog inferiornih mehaničkih osobina i teškog rukovanja [9,10].

Ceramir (Ceramir C&B), bioaktivni stomatološki cement, hibridni materijal sastavljen od kalcijum aluminatnog i glasjonomer cementa nije ispunio očekivanja kao materijal za restaurativne ispune, ali je potvrđio pozitivne karakteristike prilikom trajnog cementiranja fiksnih protetskih radova. Ovaj materijal je jednostavan i brzo se priprema, lako se uklanja, posjeduje dobru marginalnu adaptaciju, dobru retenciju uz odsustvo marginalne diskoloracije, ne izaziva iritacije gingive i subjektivnu osjetljivost kod pacijenata, tokom dvogodišnjeg kliničkog praćenja [10].

Kalcijum aluminat uz dodatak rentgen kontrastnog sredstva, pomiješan sa vodom ili fiziološkim rastvorom, dao je endodontski cement sličnih indikacija kao komercijalno dostupni trikalcijum silikatni cementi (EndoBinder, Binderweare, Sao Carlos, SP, Brazil). EndoBinder je razvijen sa namjerom da se očuvaju pozitivna svojstva i klinička primjena MTA, ali bez njegovih negativnih karakteristika. Proizведен je procesom kalcinisanja  $\text{Al}_2\text{O}_3$  i  $\text{CaCO}_3$  na temperaturi između  $1315^\circ\text{C}$  i  $1425^\circ\text{C}$ . Nakon procesa hlađenja i trituračije formiraju se čestice kalcijum aluminata odgovarajuće veličine sa visokim stepenom čistoće,

uz otklanjanje tragova slobodnog MgO i CaO koji su odgovorni za nepoželjno širenje materijala i Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, odgovornog za tamnjenje zuba. Kao kontrastno sredstvo najčešće se dodaje bizmut oksid, koji se pokazao efikasnijim u poređenju sa cink oksidom i cirkonijum oksidom [11,12-14].

Prema rezultatima više studija novijeg datuma EndoBinder je pokazao primjerene biološke i fizičko-hemijske karakteristike, dobru antimikrobnu aktivnost protiv Enterococcus faecalis, Stafilocokus aureusa i Candide albicans, a nakon implantacije u potkožno tkivo pacova uzrokovao je manju inflamatornu reakciju u odnosu na MTA [6,12,13].

CAEC je kalcijum aluminatni cement dizajniran za endodontsku upotrebu, sa osnovnom namjerom da prevaziđe neke nedostatke MTA, uključujući i dugo vrijeme vezivanja ovog cementa. Šira upotreba ovog materijala može biti postignuta dodavanjem aditiva koji ubrzava proces precipitacije i posljedično uzrokuje brže stvrdnjavanje. Ovaj materijal je pokazao odgovarajuće fizičke i mehaničke karakteristike i zadovoljavajuću biokompatibilnost i antibakterijsku aktivnost [12,15-17].

Capasio (Primus Consulting, Bradenton, FL) je eksperimentalni kalcijum aluminosilikatni cement, sastavljen uglavnom od praha kalcijum aluminosilikata, stomatološkog stakla i bizmut oksida kao kontrastnog sredstva, a isporučuje se u vidu vodenog gela. Posjeduje nešto niži pH (10,9) od bijelog MTA (11,6), radno vrijeme od oko 9 minuta i poboljšanu otpornost na kiseline i ispiranje [18-20].

Nedavno Capasio prah je rafiniran i preimenovan u Quick- Set (Primus Consulting Primus). Uklonjen je katjonski surfaktant iz tečne gel komponente, za koji se mislilo da ometa biokompatibilnost. Materijal pokazuje sličan osteogeni i dentinogeni potencijal kao bijeli MTA [21,22].

Uprkos činjenici da je poslednjih desetak godina nešto veći akcenat stavljen na istraživanja kalcijum aluminatnih cemenata, te da su u mnogim studijama dobijeni i dobri rezultati, koji ovaj materijal kvalifikuju kao prihvatljivu opciju za kliničku upotrebu, šira primjena ovih materijala u stomatološkoj praksi svakako zahtijeva dodatna ispitivanja novijeg datuma.

Istraživanja čiji je cilj sinteza novih kalcijum aluminata koji će imati slična fizička i biološka svojstva kao MTA, ali bez njegovih negativnih karakteristika (kratko radno vrijeme

od svega par minuta, dugo vrijeme vezivanja, zamiješani materijal zrnaste, pjeskaste konzistencije, relativno teška klinička manipulacija), još uvijek su aktuelna.

Istovremeno sve je veći uticaj nanotehnologije i nanomaterijala u medicini.

Dugotrajan rad profesora *Jokanovića* i njegovih saradnika rezultirao je nastankom novosintetisanog nanostruktturnog biomaterijala na bazi kalcijum aluminata. Materijal je sintetisan nanotehnologijom, inovativnom kombinacijom hidrotermalne sol-gel metode i metode samosagorjevajućih talasa. Značajno kraće vrijeme vezivanja u odnosu na MTA, bi mogla da bude njegova prednost u uslovima eventualne kliničke primjene, a hemijska priroda materijala i način sinteze bi trebalo da obezbijede zadovoljavajuće biološko ponašanje ovog materijala u živim tkivima.

## 1.1. PREGLED LITERATURE

### 1.1.1. Fizičko-hemijske karakteristike kalcijum aluminatnih sistema

U eri moderne stomatologije, pažnja mnogih istraživača je fokusirana upravo na ispitivanja fizičko-hemijskih karakteristika kalcijum aluminata.

Upotrebu nekog dentalnog materijala u kliničkoj praksi, dobrom dijelom diktiraju njegove mehaničke i fizičko-hemijske karakteristike: snaga veze za tvrda zubna tkiva, vrijeme stvrdnjavanja materijala, pH vrijednost, rentgen kontrasnost, rastvorljivost, otpornost na pritisak, tvrdoća, zatezna čvrstoća, resorpcija vode, dezintegracija.

*Sunnegårdh-Grönberg* i saradnici su sproveli tri studije koje su se bavile proučavanjem fizičko-hemijskih karakteristika kalcijum aluminatnog cementa (CAC)[23-25].

U prvoj studiji (2002.) su ispitivali tvrdoću i otpornost na trošenje DoxaDenta u komparaciji sa četiri hibridna kompozita (RC) -on polyacid-modificirani RC, smolom modifikovanim glasjonomer cementom (RMGI), konvencionalnim glasjonomernim cementom (GIC) i cink fosfatnim cementom. DoxaDent je pokazao veliku tvrdoću (jednaku tvrdoći cink fosfatnog cementa, značajno veću u odnosu na kompozite, ali ipak manju u odnosu na smolom modifikovani glasjonomer cement) i malu otpornost na trošenje [23].

Druga studija ovih autora (2003.) je ispitivala hrapavost površine DoxaDenta namijenjenog za bočne restaurativne ispune, nakon tretmana sa različitim sredstvima za poliranje. Četrdeset osam DoxaDent uzoraka je polirano sa dijamantskim svrdlima na 15,550 ili 27,000 rpm, Sof-Lex diskovima, silikonskim gunicama i univerzalnim polirerima i upoređivano sa amalgamskim uzorcima poliranim silikonskim gunicama. Hrapavost je mjerena pomoću profilometra. Najglatkija površina DoxaDent uzoraka je uočena nakon upotrebe Sof-Lex diska (prosječna hrapavost [Ra] 0.26 um). Dijamantska svrdla pri većim brzinama i polireri su takođe dali dosta dobre rezultate (Ra 0,58-0,72 um). Povećanje hrapavosti je zapaženo pri upotrebni dijamantskih svrdala manjom brzinom (Ra 2.3 um), dok je najglatkiju površinu u ovoj studiji pokazao ispolirani amalgam (Ra 0.17 um) [24].

Treća studija *Sunnegårdh-Grönberga* i saradnika (2003.) se fokusirala na ispitivanje otpornosti na savijanje i modula elastičnosti DoxaDenta u poređenju sa četiri hibridna RC spolyacid-modifikovana RC cementa, RMGI cementom, konvencionalnim GIC i cink fosfatnim cementom. Otpornost na savijanje i modul elastičnosti su testirani prema ISO standardu 4049 i određivani nakon 1 dan, 1 sedmicu i 2 sedmice. Zajedno sa cink fosfatnim cementom, DoxaDent je pokazao najmanju otpornost na savijanje (13-22 MPa), a najveći

modul elastičnosti (17-19 GPa). Najveću otpornost na savijanje su pokazali RC cement i polyacid-modifikovani RC cement (83-136 MPa). Otpornost na savijanje DoxaDenta se sa vremenom značajno smanjivala, dok je modul elastičnosti ostao nepromijenjen [25].

*Hulme* i sar. (2006.) su komparirali postignute rezultate nakon koštane augmentacije 20 ljudskih torakolumbalnih vertebralnih pršljenova PMMA cementom (DePuy Acromed) i bioaktivnim CAC cementom. Nakon mehaničkih testiranja, izvođenih u tri faze (na intaktnim, frakturiranim i vertebralnim pršljenovima augmentiranim cementima), oba cementa su pokazala veoma sličan rezultat u pogledu čvrstoće i krutosti pršljenova. Bioaktivni CAC cement se pokazao kao prihvatljiva opcija za postupak augmentacije kosti, potvrdivši odlične karakteristike ubrizgavanja, poboljšanu rentgen kontrastnost i slična mehanička svojstva PMMA cementu [26].

*Pameijer* i saradnici (2010.) su ispitivali rubno zaptivanje i bakterijsku mikropustljivost kalcijum aluminatnog cementa (Ceramir C&B) u poređenju sa dva komercijalno dostupna cementa: glas-jonomer cementom (Ketac-Cem (KC) , koji je služio kao kontrola i smolom modifikovanim glas-jonomer cementom (Rely X Luting Plus (RX)). 30 premolara je ispreparisano i nasumično podijeljeno u tri grupe. Nakon restauracije pomenutim cementima uzorci su termociklirani (X2000, na temperaturi između 5 i 55 °C, u trajanju od 35 sekundi), a zatim pohranjeni u sterilni fosfatni pufer 7 dana na 37°C. Nakon tog perioda uzorci su izlagani bakterijskom mikrocurenju u dvokomornim aparatima, tokom 60 dana. Nije bilo statistički značajne razlike između grupa cementiranih sa CM i RX dok su obe grupe pokazale znatno manje mikrocurenje ( $P < 0,05$ ) u odnosu na grupu sa KC [27].

Pet godina kasnije, sposobnost bioaktivnog kalcijum aluminatnog cementa (Ceramir Crown & Bridge,Doxa Dental AB, Uppsala, Sweden) da obezbijedi adekvatno rubno zaptivanje je bila i predmet istraživanja preliminarne laboratorijske studije *Jefferiesa SR* i saradnika (2015). U ovoj studiji, kalcijum aluminatni cement je upoređivan sa još 4 stomatološka cementa : konvencionalnim glasjonomer cementom (Fuji I Luting Cement, GC, Tokyo, Japan), konvencionalnim smolom modifikovanim glasjonomercementom (Rely X Luting Cement,3M-ESPE Minneapolis, MN, SAD), konvencionalnim samonagrizajućim cementom (Rely X Unicem Cement, 3M-ESPE) i bioaktivnim kalcijum silikatnim cementom (White ProRoot MTA/Dentsply International, York, PA, USA). Od svježe ekstrahovanih nekarioznih bočnih zuba su najprije načinjeni gleđno-dentinski diskovi (debljine oko 1mm), koji su potom pohranjivani u sterilnoj destilovanoj vodi na temperaturi od 4 °C u periodu od 2 nedelje. Nakon toga, ovi gleđno/dentinski diskovi su postavljeni uz diskove jednog od 5

ispitivanih stomatoloških cemenata, pri čemu su između njih vještački formirane mikropukotine debljine 50- $\mu\text{m}$ . Ovako dobiveni artificijani „jaz sklopovi“ za svaku vrstu ispitivanog cementa su potopljeni u fosfatom puferisani simulator tjelesne tečnosti (STF) na period od 8 mjeseci. U tom periodu je posmatrana okluzija vještački stvorenih mikropukotina, a primjenom mikrokompjuterizovane tomografije analizirano je i prisustvo nataloženih kristala nalik mineralnim depozitima, u istim. Prema njihovim rezultatima, nije bilo dokaza koji bi govorili u prilog marginalne okluzije vještačkih mikropukotina kod tri konvencionalna kontrolna cementa, dok su, nasuprot tome, oba bioaktivna stomatološka cementa pokazala okluziju veštački stvorenih marginalnih pukotina i sposobnost formiranja apatitnih kristala i time potvrđili sposobnost adekvatnog rubnog zaptivanja u simuliranim fiziološkim uslovima [28].

*Emmanuel Silva* i saradnici (2014.) su komparirali bijeli MTA (WMTA) sa endodontskim cementom na bazi kalcijum aluminata (EndoBinder), ispitujući pri tome citotoksičnost, antimikrobnu aktivnost i fizičko-hemiju karakteristike ova dva materijala. EndoBinder je kalcijum aluminatni endodontski cement koji se uglavnom sastoji od  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ( $\geq 68.5\%$ ),  $\text{CaO}$  ( $\leq 31.0\%$ ),  $\text{SiO}_2$  (0,3-0,8%),  $\text{MgO}$  (0,4-0,5%) i  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ( $< 0,3\%$ ), a sam finalni proizvod je rezultat hemijske reakcije:  $\text{CaCO}_3 + \text{Al}_2\text{O}_3 = \text{Ca}(\text{AlO}_2)_2 + \text{CO}_2$ . Od fizičko-hemiju karakteristika provjeravana je pH vrijednost (mjerena u periodu nakon 3, 24, 72 i 168 sati), te rastvorljivost i resorpcija vode. EndoBinder i WMTA su pokazali bazičan pH tokom čitavog perioda trajanja eksperimenta, sa maksimalnom pH vrijednošću nakon 3 sata (EndoBinder 8,96; WMTA 10,22). Kod oba materijala je konstatovan lagani pad pH vrijednosti sa napredovanjem eksperimenta, a WMTA je pokazao statistički značajno višu pH vrijednost nakon svakog evaluacionog perioda ( $P < 0,05$ ). U pogledu rastvorljivosti, EndoBinder je pokazao manju rastvorljivost u odnosu na WMTA ( $P < 0,05$ ), dok u pogledu resorpcije vode nije bilo statistički značajne razlike pri čemu su i EndoBinder i WMTA imali približno iste vrijednosti, povećanja mase od 9,47%, odnosno od 9,17% [12].

Slične rezultate u pogledu pH vrijednosti kalcijum aluminatnih cemenata dala je i studija brazilskih istraživača iz 2013. godine, koja je imala za cilj da ocijeni pH vrijednost, otpuštanje jona Ca i antimikrobnu aktivnost EndoBindera (EB) sa dodatkom tri različita rentgen kontrastna sredstva:  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZnO}$  i  $\text{ZrO}_2$  i to poredi sa MTA. Uzorci testiranih cemenata su uronjeni u 10 ml destilovane i dejonizovane vode na  $37^\circ\text{C}$ , a vrijednosti pH su određivane nakon 2, 4, 12, 24, 48 h; 7, 14 i 28 dana. Kvantifikacija oslobođenih jona Ca je vršena atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom, a antimikrobna aktivnost cemenata

testirana na *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* i *C. Albicans*. MTA je i u ovoj studiji, na kraju evaluacionog perioda, pokazao veću pH vrijednost i nešto veće otpuštanje jona Ca u odnosu na EndoBinder, ali bez statistički značajne razlike. Veću pH vrijednost MTA su objasnili prisustvom kalcijum hlorida u sastavu MTA cementa, koji se koristi da ubrza vezivanje materijala. Ispoljena antimikrobna aktivnost oba cementa je bila ista, sem u slučaju kada su kao rentgen kontrastna sredstva korišteni ZnO i ZrO<sub>2</sub>, gdje je izostao antimikrobni efekat EB na neke sojeve (*E. coli*, *E. faecalis* i *C. Albicans*) [13].

Superiorne mehaničke i mikrostruktурне karakteristike EndoBindera (EB) u odnosu na MTA potvrđuje i studija *Garcie* i saradnika iz 2011. godine u kojoj je EB pokazao veću tvrdoću i otpornost na pritisak, uz statistički značajnu razliku u odnosu na WMTA(7/21 dana) i veću zateznu čvrstoću sa statistički značajnom razlikom u odnosu na GMTA (7/21 dana) i WMTA (21 dana), primjenom skening elektronske mikroskopije (SEM-a) [29].

Kombinacije EndoBindera sa tri različita kontrasta (EndoBinder+bizmut oksid; EndoBinder+cink oksid; EndoBinder+cirkonijum oksid) pokazuju slično ponašanje kao bijeli i sivi MTA, ispitivanjem rastvorljivosti i dezintegracije. Kombinacija EB+Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> je pokazala najmanji gubitak mase (5,08%), a WMTA najviši (6,65%), ali bez statistički značajne razlike. Prilikom dezintegracije je došlo do oslobađanja nekoliko hemijskih elemenata, uglavnom jona metala. Kod GMTA i EB+Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> je konstatovano oslobađanje Cr, sa statistički značajnom razlikom (P<0,5). Kombinacija EB+ZnO je pokazala najviši nivo otpuštanja Pb, a zatim slijedi WMTA (P<0,5). Takođe kod kombinacije EB+ZnO je zabilježen i najviši nivo otpuštanja As, dok je kod GMTA bio najniži (P<0,5). Količine otpuštenog i As i Pb su bile niže od sigurnosne granice utvrđene standardom ISO 9917-1 [7].

Rendgenska vidljivost je važna fizička osobina cemenata koji se upotrebljavaju u endodontskoj praksi. Iz tog razloga se u sastav cementnih pasti koje se koriste za punjenje kanala korijena zuba dodaju različita rentgen kontrastna sredstva, kako bi se omogućilo razlikovanje materijala od susjednih anatomskih struktura [30].

Prema ISO 6876-7,8 standardu endodontski cementi bi trebali posjedovati rendgensku vidljivost iznad 3,0 mm u odnosu na aluminijumsku skalu [31].

*Aguilar* i saradnici (2011.) su ocjenjivali rendgensku vidljivost novog cementa na bazi kalcijum aluminata (EndoBinder), sa dodatkom tri različita rentgen kontrasta (bizmut oksid, cink oksid ili cirkonijum oksid) i obe verzije MTA (bijeli i sivi), u uzorcima različitih debljina. Rezultati su pokazali da je kod debljih uzoraka cemenata, bila i veća rendgenska

vidljivost. Samo je kalcijum aluminatni cement sa dodatkom bizmut oksida i sivi MTA pokazao adekvatnu rendgensku vidljivost (iznad 3,0 mm od aluminijumske skale), bez obzira na debljinu uzorka. Rentgen kontrastno sredstvo korišteno u oba cementa u ovom slučaju je bizmut oksid (20% po težini), koji ima veći atomski broj ( $Z=83$ ) u odnosu na cirkonijum ( $Z=40$ ) i cink ( $Z=30$ ). Kod kalcijum aluminatnog cementa sa dodatkom cink oksida, potrebna rendgenska vidljivost je postignuta samo na uzorcima debljine 2,0 mm, a kod kalcijum aluminatnog cementa sa dodatkom cirkonijum oksida, na uzorcima debljine 2,5 mm [32].

*Porter* i saradnici (2010.) su upoređivali WMTA sa tri eksperimentalna endodontska cementa Capasiom (Primus Consulting, Bradenton, FL), Ceramicretom-D (Tulsa Dental Specialties/Argonne National Laboratory, Argonne, IL), i Generexom-A (Dentsply Tulsa Dental Specialties, Tulsa, OK) ispitujući pri tome vrijeme vezivanja, RTG kontrasnost, otpornost na pritisak, pH, otpornost materijala na ispiranje i zateznu čvrstoću. Prema njihovim rezultatima Capasio i alternativni materijali su pokazali superiornost u odnosu na WMTA kad je u pitanju otpornost na ispiranje i rukovanje materijalom, zadovoljavajuću RTG vidljivost, dobru otpornost na pritisak (Generex-A > Capasio > WMTA > Ceramicrete-D) i bazičnu pH vrijednost, izuzev Ceramicrete-D koji je pokazao lošije fizičko hemijske karakteristike (slabiju RTG vidljivost, najmanju otpornost na pritisak i kiseo pH). Njihova preporuka je da se nastave dalja ispitivanja Generex-A i Capasio kliničkim studijama [18].

U jednoj vrlo interesantnoj studiji *Oliveira* i saradnici (2010.) su proučavali fizička i hemijska svojstva endodontskog cementa na bazi kalcijum aluminata (Secar-71, Kerneos), sa i bez dodatka raznih aditiva (polimernog raspršivača,  $\text{CaCl}_2$  kao plastifikatora i  $\text{ZnO}$  kao rentgen kontrasta), u odnosu na sivi mineral trioksid agregat Gray-MTA (Angelus). Ispitivano je vrijeme stvrdnjavanja, pH, jonska provodljivost, snaga pritiska, poroznost i distribucija pora. Kalcijum aluminatni cement, bez dodatka aditiva, je pokazao vrijeme stvrdnjavanja od oko 60 min, a u kombinaciji sa  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  kao aditivom, vrijeme vezivanja je bilo kraće za 10 min. Osim toga, dodatak aditiva je poboljšao i njegova druga svojstva, te je materijal pokazao sposobnost oslobođanja  $\text{Ca}^{2+}$  iona, bazičan pH, lakše rukovanje, bolju fluidnost, veću mehaničku čvrstoću (81 MPa) i manju poroznost 4% (sa porama malog promjera 0.25 lm), u odnosu na Gray-MTA Angelus: mehanička čvrstoća 34 MPa, poroznost 28 % (sa porama promjera 2.5 lm) [17].

U skladu sa ovim rezultatima su i rezultati studije *Luza* i *Pandolfellija* iz 2014. godine, koji su ocjenjivali fizičke osobine (otpornost na pritisak, dimenzionalnu stabilnost, poroznost i RTG kontrasnost) kalcijum aluminatnog cementa CAC (Secar-71, Kerneos)

unaprijeđenog dodatkom polimernog raspršivača, na bazi polietilen glikola. Dodatak polimernog raspršivača rezultirao je većim, ali pogodnim, širenjem cementa, povećanom otpornošću na pritisak 73-87 MP nakon 15 dana, manjom poroznošću i zadovoljavajućom rentgen kontrasnošću. Njihov zaključak je da CAC (Secar-71, Kerneos) ,sa dodatim polimernim raspršivačem, ima potencijal za primjenu u endodonciji [33].

Iste godine, *Oliveira* i saradnici proučavaju, takođe, uticaj raznih aditiva (polimernog raspršivača, plastifikatora, cink oksida i bizmut oksida kao rentgen kontrastnih sredstava) na pojedina fizička i mehanička svojstva, te RTG vidljivost kalcijum aluminatnog cementa (CAC). Najveću rendgensku vidljivost je pokazao CAC sa dodatkom  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ , kao kontrasta (25% veću u odnosu na  $\text{ZnO}$ ). Međutim, dodatak veće količine  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  povećava poroznost i smanjuje mehaničku čvrstinu kalcijum aluminatnog cementa, zbog velikog rastojanja između čestica, koje su izduženog oblika. Sa druge strane,  $\text{ZnO}$  posjeduje mnogo finije čestice od  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ , što dovodi do povećanja mehaničke snage CAC, ali rendgenska vidljivost  $\text{ZnO}$  je niža od one predviđene standardima ISO 6876: 2012. Kombinacija 15%  $\text{ZnO}$ :10%  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  je povećala otpornost na pritisak i smanjila poroznost CAC, te se pokazala kao najoptimalnije rješenje da se postigne kompromis između dobrih fizičkih i mehaničkih svojstava i idealna rendgenska vidljivost [34].

Kineski naučnici *Ann* i *Cho* (2014.) su pokušali da povećaju otpornost kalcijum aluminatnog cementa (CAC) na koroziju, na način da su CAC pomiješali sa običnim Portland cementom (OPC), u rasponu od 5% do 15%, kao vezivom. Ovako dobivena mješavina kalcijum aluminatnog cementa CAC je pokazivala značajno veću otpornost na koroziju (preko 3,0% po masi veziva, dok je kod OPC i CAC ova vrijednost oko 0,5%-1,0%) , kraće vrijeme vezivanja , ali i manju otpornost na pritisak (oko 20 MPa, dok je kod OPC oko 30-35 MPa) [35].

Pokušaj kombinacije trikalcijum aluminata ( $\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$ ) sa trikalcijum silikatima ( $\text{Ca}_3\text{SiO}_5$ ), rezultirao je boljim fizičko-hemijskim osobinama (ubrzanim procesom hidratacije, kraćim vremenom stvrdnjavanja, većom otpornošću na pritisak), bioaktivnošću i biokompatibilnošću (stimulativni učinak na rast L929 ćelija) u odnosu na čiste trikalcijumsilikate ( $\text{Ca}_3\text{SiO}_5$ ). To je pokazala studija grupe kineskih naučnika, koji su prah  $\text{Ca}_3\text{SiO}_5$  i  $\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$  (0,5%, 10% i 15%) pomijesali sa destilovanom vodom, a potom ispitali fizičko-hemijske osobine i biokompatibilnost dobijene smješe. Novonastalom kombinacijom vrijeme stvrdnjavanja je sa 110 min smanjeno na 43 min, odnosno ( $P<0,05$ ), a otpornost na pritisak povećana od 6,75-16,20 MPa nakon jednog dana ( $P<0,05$ ) tj. 17,73-29,13 MPa, nakon 28 dana [36].

*Seung-Han Oh* i saradnici (2002.) su proučavali efekte dodavanja litijum fluorida (LiF) i maleinske kiseline (MA) kalcijum aluminatnom cementu (CAC) na fizičko-hemiske karakteristike (vrijeme vezivanja, otpornost na pritisak) i biokompatibilnost CAC-a. Za procjenu fizičko-hemiskih karakteristika su koristili X-ray difrakciju (XRD), dok su Agar test difuzija, tetrazolium bromid (MTT) test i test hemolize primjenjeni za otkrivanje biokompatibilnosti novonastale cementne kompozicije. Prema njihovim rezultatima najprihvativijim za potencijalnu upotrebu se pokazao kalcijum aluminatni cement koji sadrži 0,5 g LiF i 8,75 g MA, jer je posjedovao najkraće vrijeme vezivanja i najveću otpornost na pritisak (111,64+/-7.74 MPa), a u isto vrijeme je bio biokompatibilan, tj. nije uzrokovao hemolizu niti ispoljavao citotoksične efekte [37].

*Engqvist* i saradnici (2004.) su istražili propuštanje svjetlosti kroz biokeramički restaurativni material baziran na kalcijum aluminatu, uzimajući u obzir funkciju vremena (nakon 3, 7, 24, 48, 96, 168, 432, i 672 sata), različite debljine uzoraka materijala (0,5 i 1 mm), talasnu dužinu svjetlosti (300-1100 nm) i dodavanje pigmenata ( $A_2$ ,  $B_2$ , i  $C_2$  boje), u odnosu na komercijalni glasjonomerni cement (Fuji II) i kompozitnu smolu (Tetric Ceram). Rezultat je bio povećano propuštanje svjetlosti kroz kalcijum aluminat sa odmicanjem vremena, od niskih vrijednosti nakon jednog sata, do vrijednosti propuštanja svjetlosti skoro kao kod glasjonomer cementa, nakon sedam dana. Kompozitna smola je imala gotovo dvostruko veću propusnost svjetlosti (32%), u odnosu na kalcijum aluminatni materijal i glasjonomer cement (14-15%). Očekivano, tanji uzorci debljine 0,5 mm prenose svjetlost skoro duplo više od debljih uzoraka, debljine 1 mm. Što se tiče talasne dužine, plavo svetlo je pokazalo nisku prozirnost, dok je kod crvenog svjetla prozirnost bila visoka. Dodatak pigmenata je doprinio dodatnom smanjenju prozirnosti. Kao što je i očekivano, smanjenje je bilo veće za tamnije nijanse [38].

EndoBinder formira snažniju vezu sa dentinom u poređenju sa MTA, ta razlika je statistički značajna u odnosu na WMTA ( $P<0,05$ ), odnosno bez statističke značajnosti u odnosu na GMTA. Ovo je pokazala studija Garcia i saradnika iz 2014. godine koja je rađena na 30 ekstrahovanih humanih gornjih molara, na kojima su urađene hemisekcije, te nakon opsežne pripreme uzoraka, ispitana snaga veze endodontskih cemenata sa dentinom, primjenom univerzalnog uređaja za testiranje (EMIC-DL, São José dos Pinhais, PR,Brazil) [14].

Materijali zasnovani na kalcijum aluminatnim sistemima su pokazali uporediv rezultat sa komercijalnim kalcijum-silikatnim cementom (MTA Angelus, Londrina, Brazil) u studiji

*Josipović i saradnika* 2017. Ovi autori su testom penetracije boje ispitali marginalnu mikropustljivost novosintetisanih nanomaterijala na bazi kalcijum aluminata i MTA 6 mjeseci nakon njihove aplikacije u interradikularne perforacije ekstrahovanih zuba. Studija je obuhvatila 36 ekstrahovanih ljudskih molara. Prodor boje je analiziran primjenom svjetlosnog mikroskopa sa uvećanjem od 30x (Leica DM 2000, a dobijeni rezultat je statistički analiziran korišćenjem jednosmernog ANOVA testa. Najmanja srednja penetracija (mm) je izmjerena za MTA (1,40), dok su zabilježene nešto veće vrijednosti marginalne penetracije za kalcijum aluminatne cemente (1,73), ali bez statistički značajne razlike [39].

Primjena kalcijum aluminata kao materijala za trajno cementiranje se pokazala uspješnom prema rezultatima studije *Jefferiesa* i saradnika (2012.) koji su novi bioaktivni stomatološki cement (Ceramir C&B, ranije XeraCem), hibridni materijal sastavljen od kalcijum aluminatnog i glasjonomer cementa, upotrijebili za trajno cementiranje kod 17 pacijenata (38 protetskih krunica, 6 fiksnih mostova, 2 fiksne udlage). Ocjenjivali su karakteristike cementa tokom same pripreme: rukovanje cementom, radno vrijeme, jednostavnost uklanjanja cementa, kao i nakon cementiranja: rubno zatvaranje, marginalna diskoloracija, prisustvo sekundarnog karijesa, stanje gingive, osjetljivost zuba, primjenom vizualne analogne skale (VAS). 15 od 17 ispitanih se odazvalo na ispitivanje nakon godinu dana, a 13 pacijenata nakon 2 godine. Sama priprema, odnosno miješanje cementa, se pokazala veoma jednostavnom i prihvatljivom. Sve restauracije su imale dobru adheziju nakon cementiranja. Marginalni integritet svih restauracija / nadogradnji nakon 2 godine je ocijenjen "alfa" kategorijom. Average VAS rezultat za osjetljivost zuba je smanjen sa 7,63 mm na početku do 0,44 mm nakon 6 mjeseci, 0,20 mm nakon 1 godine i 0,00 mm nakon 2 godine. Gingivalni indeks pokazuje da je upala gingive smanjena sa 0,56 mm na početku do 0,11 mm nakon 6 mjeseci, 0,16 mm nakon 1-godine, a 0,21 mm nakon 2 godine. Nakon dvije godine nije došlo do gubitka (rascementiranja) niti jedne restauracije, nije bilo marginalne diskoloracije, ni sekundarnog karijesa, a pacijenti su negirali i subjektivnu osjetljivost [10].

Nasuprot ovim studijama, studije koje svjedoče o pokušaju primjene kalcijum aluminata za direktne restaurativne ispune, nisu potvratile pozitivne fizičko-hemijske i mehaničke osobine ovih materijala.

*Sunnegårdh-Grönberg* i saradnici (2004.) su u svojoj studiji potvrdili da Doxadent ima bolju adheziju za dentin u odnosu na kompozit Tetric Ceram/Syntac TC/SS (72%:49%), dok je njegova veza sa gleđi slabija, od veze koju ostvaruje kompozit TC/SS (84%:93%). Do

ovih rezultata su došli primjenom skening elektronske mikroskopije, kvantitativnom analizom 16 kavita II klase, restaurisanih pomenutim materijalima. Slabiju marginalnu adaptaciju na gled i veću sklonost dimenzionalnim promjenama Doxadenta, objašnjavaju širenjem kalcijum aluminatnog cementa [40].

*Berglund* i saradnici (2006.) ne preporučuju kliničku primjenu Doxadenta, kalcijum aluminata razvijenog sa namjerom da posluži kao alternativa dentalnom amalgamu i kompozitu za ispune u bočnoj regiji. Doxadent je pokazao slabiju dimenzionalnu stabilnost u odnosu na dva testirana kompozitna materijala InTen-S i Esthet-X, na 360 uzoraka, u vlažnoj i suvoj sredini. U suvoj sredini, kod Doxadent uzoraka konstatovano je povećanje zapremine od 2,0% i težine od 5,5%, a u vlažnoj sredini povećanje zapremine 4,1 % i težine 6,3%. Zapremina kompozita je povećana svega 0,8% ili manje, u suvoj i vlažnoj sredini, dok je povećanje u težini za Inten-S iznosilo 1,2% u vlažnoj sredini, a 0,6% u suvoj sredini, odnosno za Esthet-X 0,7% u vlažnoj sredini, a 0,2% u suvoj sredini [41].

U skladu sa ovim rezultatima su i rezultati dvije prijašnje studije *Loofa* i saradnika (2003. i 2005.), koje su pokazale inferiore mehaničke osobine kalcijum aluminata (Doxa Certex Uppsala, Sweden, Scandinavia) u odnosu na kompozit (Tetric Ceram) glasjonomer cement (Fuji II) i amalgam, kao i studija Dijkena i saradnika (2003.) u kojoj su, nakon dvogodišnjeg kliničkog praćenja 120 direktnih ispuna II klase restaurisanih kalcijum aluminatom (Doxa Certex Uppsala, Sweden, Scandinavia) i kompozitnom smolom (Tetric Ceram), bolje kliničke performanse i trajnost, pokazali ispunii restaurisani kompozitom [9,42,43].

Upotreba kalcijum aluminatnog cementa (Doxa Certex, Uppsala, Sweden) u restauraciji kavita V klase, takođe se pokazala neprihvatljivom. Nakon trogodišnjeg kliničkog praćenja 119 restauracija ocjenjivanih u skladu sa blago modifikovanim kriterijima USPHS nakon 6 mjeseci, 1, 2 i 3 godine, rezultat je bio 32% potpuno ili djelimično izgubljenih restauracija sa kalcijum aluminatnim cementom, u odnosu na 5% izgubljenih restauracija sa kompozitom (RC; Tetric Ceram) [44].

Svakako ne treba zanemariti ni sve veći uticaj nanotehnologije u svim oblastima, pa tako i u području biomedicinskih nauka. Propustljivi porozni nanomaterijali imaju široku primjenu na polju inžinjeringa [45].

Nedavno je predstavljen novi sistem poroznog kalcijum aluminatnog / fosfatnog (CAP) nanokompozita. Novi CAP nanokompoziti imaju jedinstvenu trodimenzionalnu nanostrukturu sa gusto raspoređenim, međusobno povezanim nanoporama veličine 200-500 nm i pokazuju odličnu propustljivost tečnosti i adsorpciju. Poroznost je od 19% do 40%. Snaga savijanja i otpornost na pritisak su 40,3 MPa i 195 MPa. CAP nanokompoziti su visokopropusni, tako da kapljica vode može potpuno prodrijeti za 10 sekundi. S obzirom na nanočestice porozne strukture, dobru propusnost/ adsorpciju i izvanredna mehanička svojstva, CAP nanokompoziti imaju veliki potencijal za aplikacije u hemijskom i biomedicinskom inženjeringu [45].

### 1.1.2. Biološka aktivnost materijala na bazi kalcijum aluminata

Biokompatibilnost je esencijalna osobina svakog materijala koji se koristi u stomatologiji, a podrazumijeva sposobnost materijala da nakon aplikacije obavlja određenu funkciju u organizmu, ne izazivajući pri tome neželjeni odgovor tkiva domaćina [46].

Testovi za ispitivanje biokompatibilnosti služe za detekciju sastojaka materijala koji bi mogli da uzrokuju povrede ili oštećenja na tkivima usne duplje ili organizma uopšte. Neželjena reakcija tkiva može biti posljedica toksičnosti primjenjenog materijala, ali i drugih faktora, kao što je akumulacija infektivnog materijala. Testovi biokompatibilnosti se realizuju u *in vitro* i *in vivo* uslovima [47].

Savremeni aspekt ispitivanja biokompatibilnosti stomatoloških materijala podrazumijeva:

- 1) *testiranje materijala u laboratorijskim uslovima na kulturama ćelija, tkiva ili organa.*
- 2) *eksperimente na životinjama, sa ciljem da se simuliraju uslovi u organizmu čovjeka.*
- 3) *kliničke testove na ljudima, koji podrazumijevaju različite testove primjene materijala u kliničkim uslovima* [4].

Prilikom primjene nekog testa za ispitivanje biokompatibilnosti, prioritet je mogućnost ponavljanja testa, kao i komparacija dobijenih rezultata sa drugim laboratorijama [2,3,48].

Faris i saradnici (2006.) su provjeravali bioaktivnost tri cementa namijenjena za ortopedsku primjenu: kalcijum fosfatnog cementa (Norian SRS), eksperimentalnog kalcijum silikatnog cementa i eksperimentalnog kalcijum aluminatnog cementa. Uzorci sa cementima su pohranjeni u fiziološki rastvor puferovan fosfatom (PBS) na temperaturi od 37 ° C, tokom 1h, 24 h, 7 dana i 30 dana, a nakon toga su podvrgavani analizi. Primjenom SEM-a, X-Ray difrakcije (TF-XRD) i energijom disperzivne spektroskopije (EDS) je potvrđeno formiranje

apatita na površini sva tri ispitivana materijala, odnosno svi materijali su pokazali biološku aktivnost u uslovima in vitro [49].

In vitro studija *Loofa* i sar. (2008.) se bavila ispitivanjem bioaktivnosti dva eksperimentalna cementa na bazi kalcijum aluminata (CA) u poređenju sa glasjonomercementom (GIC). Pri tome, jedna od formulacija CA je bio hibrid između CA i GIC. Uzorci ispitivanih materijala su potopljeni u fosfatni puferisani fiziološki rastvor i pohranjeni na 37 °C na vremenske periode : 1h, 1 dan, 7 dana i 4 sedmice. Nakon skladištenja su podvrgnuti analizi (X-ray difrakcija (GI-XRD), skening elektronska mikroskopija (SEM) i X-ray fotoelektronska spektroskopija (XPS), kako bi se ustavilo da li je došlo do formiranja površinskog sloja hidroksiapatita. Oba kalcijum aluminatna cementa su pokazala bioaktivnost, za razliku od GJC čija biokativnost je izostala tokom perioda testiranja. Najveći stepen bioaktivnosti je pokazao čisti kalcijum aluminatni cement, gdje je relativno debeli sloj hidroksiapatita formiran već nakon 24 časa [50].

U sličnoj studiji *Engstrand* i sar. (2012.) su provjerili bioaktivnost kalcijum aluminatnog cementa (Ceramir Crown & Bridge). Diskove izrađene od pomenutog cementa su uranjali u ljudsku pljuvačku i fiziološki rastvor puferovan fosfatom (PBS) tokom 7 dana, a potom ih sušili i analizirali. Analitičke metode koje su korištene u cilju provjere formiranja HA na površini su: X-ray difrakcija (GI-XRD), skening elektronska mikroskopija (SEM) i X-ray fotoelektronska spektroskopija (XPS). Njihovi rezultati su pokazali da je do formiranja HA došlo i na površini uzoraka uskladištenih u pljuvački i na uzorcima pohranjenim u PBS. Zaključili su da bi ovo pozitivno svojstvo Ceramira moglo biti od pomoći u sprečavanju nastanka sekundarnog karijesa.[51].

*Carmo SS* i sar. (2018.) su takođe dokazali sposobnost nekoliko formulacija kalcijum aluminatnih cementa (CACb) uporedivu sa Biodentinom i MTA da formiraju apatitne kristale na svojoj površini, nakon kontakta sa PBS ili dejonizovanom vodom tokom 14 dana. Površine cemenata su analizirane pomoću SEM, EDS-X i FTIR [52].

Interesantna je studija *Birda* i saradnika (2012.) koja je ispitivala sposobnost penetracije kalcijum aluminatnog cementa Capasia (Primus Consulting, Bradenton, FL) u dentinske tubule, u komparaciji sa mineral trioksid agregatom (MTA), ali i sposobnost ovih cemenata da dovedu do formiranja apatitnih kristala na svojoj površini, prilikom pohranjivanja u sintetičkoj tjelesnoj tečnosti (STF). Za pristupne kavitete je upotrijebljeno 30 intaktnih prednjih humanih zuba. Svi kanali korijena zuba su obrađeni i obturisani sa Capasiom i MTA, a potom pohranjeni na 4 sedmice u STF. Na 1, 2, i 3 mm od površine su urađeni presjeci zuba, koji su potom posmatrani pod elektronskim mikroskopom sa ciljem

određivanja dubine penetracije materijala u tubule (SEM). Nasuprot Capasiu, čija je penetracija u dentinske tubule uočena na svim nivoima, nije konstatovan prođor MTA u dentinske tubule niti na jednom nivou. Oba cementa su pokazala sposobnost formiranja apatitnih kristala, koji po strukturi odgovaraju hidroksiapatitu što potvrđuju SEM, EDXA i XRD analize) [19].

Godinu dana kasnije, *Oliveira* i saradnici (2013.) su ocijenili bioaktivnost eksperimentalnog kalcijum aluminatnog cementa (CAEC), koji u svom sastavu sadrži aditive za poboljšanje karakteristika rukovanja, ubrzavanje procesa stvrdnjavanja i povećanje mehaničke otpornosti, u poređenju sa MTA. Površina cementa je dovedena u kontakt sa simulatorom telesnih tečnosti (SBF, Kokubo i Rigo), a analizirana je SEM mikroskopijom. Autor je primijetio da i MTA i CAEC pokazuju biološku aktivnost u kontaktu sa SBF, ali da MTA cement otpušta više jona kalcijuma i promoviše viši pH u odnosu na eksperimentalni cement na bazi kalcijum aluminata. Ovo se objašnjava činjenicom da  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{OH}^-$  joni otpušteni iz MTA, uglavnom zbog disocijacije kalcijum hidroksida reaguju sa jonima fosfora iz solucije KSBF ,što je rezultiralo precipitacijom kalcijum fosfata na površini MTA cementa. Ova faza je slična sastavu neorganske komponente kostiju, te dolazi do biološke integracije i stvaranja hemijske veze između kostiju i površine apatita. Za CAEC optimalnije uslove za precipitaciju kalcijum fosfata stvara kontakt sa RSBF solucijom [53].

Isti autori, dvije godine kasnije, primjenjuju identičnu metodologiju, dovodeći u kontakt površinu 4 različita uzorka kalcijum aluminatnih cemenata sa simulatorom tjelesnih tečnosti (SBF, Kokubo i Rigo), a potom ih podvrgavaju analizi primjenom SEM, EDX i XRD tehnike. Kalcijum aluminatni cementi uključeni u ovo istraživanje su proizvedeni procesom kalcinisanja  $\text{CaO}$  i  $\text{Al}_2\text{O}_3$  u električnoj peći na visokim temperaturama i podijeljeni su u 4 grupe: CA( $\text{CaO} + \text{Al}_2\text{O}_3 \rightarrow \text{CaAl}_2\text{O}_4$ ); CA2( $\text{CaO} + 2\text{Al}_2\text{O}_3 \rightarrow \text{CaAl}_4\text{O}_7$ ); C3K ( $3\text{CaO} + \text{Al}_2\text{O}_3 \rightarrow \text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$ ); C12A7 ( $12\text{ CaO} + 7\text{ Al}_2\text{O}_3 \rightarrow \text{Ca}_{12}\text{Al}_{14}\text{O}_{33}$ ). U kontaktu površine CAC cemenata sa KSBF nije došlo do taloženja kalcijum fosfata, a oslobođanje  $\text{OH}^-$  jona je bilo nedovoljno da se poveća pH vrijednost i poboljša KSBF 's supersaturacija. Nasuprot tome, kontakt CAC cemenata sa RSBF je rezultirao višom pH vrijednosti i posljedičnom precipitacijom magnezijum fosfata na površinama svih CAC uzoraka, dok je samo za uzorce CA2 cementa konstatovana precipitacija kalcijum fosfata i hidroksiapatita. Zahvaljujući sposobnosti da stimuliše taloženje hidroksiapatita u kontaktu sa SBF, CA2 cement se pokazao najpogodnijim za biomedicinsku primjenu, uz preporuku za dalnjim ispitivanjima [54].

Studija Engqvista i saradnika (2004.) je u *in vivo* uslovima istraživala bioaktivnost kalcijum aluminatnog cementa namijenjenog za restauracije zuba. Na umnjacima su okluzalno ispreparisani kaviteti I klase, koji su potom restaurisani kalcijum aluminatnim cementom. Nakon 4 nedelje zubi su podvrgavani ekstrakciji i urađeni su presjeci zuba koji su potom posmatrani skening elektronskom mikroskopijom (SEM), fokusnom jonskom mikroskopijom (FIB) i prenos elektronskom mikroskopijom (TEM). Kako bi se analizirala distribucija elemenata na spoju zuba sa ispunom korišteni su STEM i EDX. Rezultati su pokazali da se jaka veza materijala za punjenje i zuba, bez mikropukotina, može naći čak i na visokim uvećanjima. Zona širine 100-200 nm uz povećano prisustvo kiseonika je otkrivena u gledi, uz sam ispun. Zona je bila gušća od ostatka gledi. EDX analizom je ustanovljeno formiranje apatita *in situ* [38].

Inicijalno sagledavanje biokompatibilnosti stomatoloških materijala najčešće se obavlja kroz testove citotoksičnosti. Ispitivani biološki sistemi mogu biti: kulture tkiva i organa, ćelijske kulture i organele. Za *in vitro* ispitivanja toksičnosti stomatoloških materijala koriste se jednoslojne kulture ćelija, trodimenzionalni (3D) modeli oralne mukoze dobijeni tkivnim inžinjeringom, permanentne ćelijske linije (fibroblastne, epitelne, osteoblastne, osteoklastne, odontoblastne, tumorske) i primarne ćelijske linije, dobijene biopsijom oralne sluzokože, pulpe, parodonta ili iz periferne krvi, ustanovljene u samoj laboratoriji [55, 56].

Kontakt između ćelijske kulture i ispitivanog materijala se ostvaruje direktnim i indirektnim putem i posredstvom ekstrakata. U slučaju direktnog kontakta, citotoksičnost se mjeri stopom ćelijske smrti u funkciji vremena, ekspozicije i udaljenosti od uzorka koji mora biti u čvrstom agregatnom stanju. Indirektni kontakt ćelija i materijala podrazumijeva upotrebu propustljivog intermedijuma, najčešće sintetičkog filtera ili dentinske membrane. Ovaj metod ne uslovljava agregatno stanje materijala, pa on može biti u čvrstom, polutečnom ili tečnom stanju. Ipak, najčešće primenjivana metoda ispitivanja citotoksičnosti različitih stomatoloških materijala (restaurativni materijali, dentalni cementi, amalgami, akrilati za bazu zubne proteze i dentalni adhezivi) je posredstvom ekstrakata, tj. ekstrahovanjem oslobođenih komponenti rastvaračem: ćelijski medijum, destilovana voda, fiziološki rastvor i puferisani rastvori soli [56,57].

Biološka reakcija ćelija može da se opiše morfološki ili kvanitativnom analizom. Za jednostavnija istraživanja potencijalne toksičnosti stomatoloških materijala koriste se metode koje se baziraju na oštećenju ćelijske membrane i ispitivanju stepena ćelijske vijabilnosti i proliferacije (agar i filter difuzioni test, almar plavo, tripan plavo, neutral crveno, LDH i

MTT test, propidijum jodid test, testovi inkorporacije radioizotopa, kao što su  $^{3}\text{H}$ -timidin i bromo dezoksouridin. U cilju istraživanja mehanizma toksične aktivnosti ispitivanog materijala koriste se nešto komplikovaniji testovi, bazirani na ćelijskim funkcijama (mjerjenje količine proteina zapaljenja i proteina indikatora ćelijskog stresa Heat-Shock proteina (HSPs), test determinacije glutationa, određivanje tipa ćelijske smrti i dr.) [58].

#### 1.1.2.1. Ispitivanje biokompatibilnosti kalcijum aluminatnih sistema u in vitro studijama

*Franz* i sar. (2006.) su upoređivali citotoksične efekte kalcijum aluminatnog cementa (DoxaDent) sa nekoliko direktnih restaurativnih materijala: tri kompozita (QuiXfil, Tetric Ceram, Filtek Supreme), cink fosfatnim cementom (Harvard Cement) i glas jonomer cementom (Ketac Molarna), primjenom metode protočne citometrije na ćelijskoj liniji fibroblasta (L-929). Među svježim uzorcima materijala najnižu citotoksičnost je pokazao kalcijum aluminatni cement (DoxaDent) i kompozit QuiXfil, dok je glas jonomer cement Ketac Molarna ispoljio najveći stepen citotoksičnosti. Nakon 7 dana preinkubacije cink fosfatni cement (Harvard Cement) i kompozitni materijal Filtek Supreme su pokazali viši stepen citotoksičnosti u odnosu na ostale materijale (Pb/0.005) [59].

U jednoj opsežnoj studiji *Pameijer* i sar. (2008.) su potvrdili biokompatibilnost kalcijum aluminatnog cementa Ceramir® Crown & Bridge (ranije XeraCem™). Njihova studija je uključivala in vitro ispitivanja: ispitivanje citotoksičnosti, ispitivanje mutagenosti primjenom Amesovog testa (testa reverzibilne mutacije) i in vivo ispitivanja: test senzibilizacije na koži zamoraca i procjena reakcije pulpe majmuna (*Rhesus macaques*) nakon cementiranja inleja V klase Ceramir C & B cementom. Prema rezultatima njihove studije Ceramir C & B nije ispoljio mutagenost, dok je citotoksični efekat cementa bio neznatan. Ovaj kalcijum aluminatni cement nije izazivao iritacije ni senzibilizaciju kože zamoraca niti u jednom slučaju, dok, uz izuzetak jednog uzorka kod koga je konstatovana upala, prilikom cementiranja inleja V klase ovim cementom nisu pronađeni znakovi inflamacije pulpe nakon 30 i nakon 85 dana [60].

Studija na kulturi ćelija, u kojoj je kalcijum aluminatni cement CAC postavljen u direktni kontakt sa osteoblastima na 10 dana je dala dobre rezultate, CAC je prouzrokovao povećanje broja ćelija (ustanovljeno nakon Trypan plavog bojenja), veću ćelijsku održivost (MTT test) i veću aktivnost alkalne fosfataze (ALP) u odnosu na MTA [16].

Utvrđivanje biokompatibilnosti i osteogenog potencijala novije generacije endodontskih materijala Generex A i Generex B (kalcijum silikatnih cemenati), Capasia (kalcijum-aluminatni- silikatni cement) i Ceramicrete-D (zasnovanog na magnezijum fosfatu) u poređenju sa MTA, na primarnim osteoblastima (uzetim od pacova Calvaria soja) bavili su se *Washington* i sar. (2011.). Trypan plavo bojenje je korišteno za procjenu vitalnosti ćelija 1.-6. dana. Mineralizacioni potencijal je ocijenjen skening elektronском mikroskopijom (tražilo se prisustvo nodula). Generex A je, jedini materijal iz ispitivane novije generacije endodontskih materijala koji je, pokazao osteogeni potencijal i podržao primarni rast osteoblasta, uz već potvrđeni osteogeni potencijal MTA. Nije bilo razlike u mineralizaciji i formiranju nodula između testiranih materijala [21].

Godinu dana kasnije, dokazan je i dentinogeni potencijal kalcijum aluminatnih cemenata Quick-set (Primus Consulting, Bradenton, FL) kao kod WMTA (Dentsply Tulsa Dental Specialities, Tulsa, OK), na ćelijskoj liniji nalik odontoblastima MDPC-23, izvedenoj iz dentalne papile pacova Murina soja. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid test je korišten za utvrđivanje efekata cemenata na metaboličku aktivnost mitohondrija, a protočna citometrija i konfokalna skening laserska mikroskopija za utvrđivanje efekata cemenata na ćelijsku smrt. Nakon prve sedmice Quick-Set i WMTA su pokazali veću citotoksičnost od teflon negativne kontrole ( $P<.05$ ), a izložene ćelije više apoptoza/nekroza. ( $P<0,5$ ). Nakon druge sedmice oba cementa su bila biokompatibilna kao teflon, a izložene ćelije su pokazale minimalne apoptoze/nekroze [22].

EndoBinder (Binderware, São Carlos, SP, Brazil) nije pokazao citotoksičan efekat prilikom direktnog kontakta sa fibroblastima, u istraživanju koje su realizovali *Silva* i sar. (2012.). Cilj im je bio da utvrde citotoksičnost (primjenom MTT testa) i ekspresiju matriksne metaloproteinaze (MMP-2 i MMP-9) kod tri materijala: EndoBindera, MTA Angelus, Londrina, PR, Brazil) i kalcijum hidroksida (Biodinamica, Ibirapuera, PR, Brazil), na ćelijskoj liniji 3T3 fibroblasta. Nakon 24 sata fibroblasti, koji su bili u direktnom kontaktu sa kalcijum hidroksidom su pokazali znatno veću ekspresiju MMP-2, u odnosu na ćelije koje su bile u kontaktu sa EndoBinderom i MTA ( $P<0,05$ ). Inače, matriksna metaloproteinaza-2 je enzim kome se pripisuje važna uloga u nastanku hronične upale pulpe i periapikalnog tkiva. U pogledu citotoksičnosti, nije bilo značajne razlike između EndoBindera i MTA, ali je konstatovana značajno manja ćelijska održivost 3T3 fibroblasta, koji su bili u direktnom kontaktu sa kalcijumom hidroksidom ( $P<0,05$ ) [61].

*Clafshenkel WP* i saradnici (2012.) su sprovedli interesantno istraživanje u kome su ispitivali mogućnost primjene kalcijum aluminatnog skafolda sa dodatkom melatonina i plazme bogate trombocitima (PRP) kao koštanog autotransplantata. Melatonin i plazma bogata trombocitima su poznati po osteoinduktivnim svojstvima, pa su očekivanja bila da CA-Mel skafoldi pokažu dobru sposobnost regeneracije i osobine slične prirodnoj kosti. Biokompatibilnost CA i CA-Mel skafolda je testirana u uslovima *in vitro* (provjerom citotoksičnosti na kulturi NIH3T3 fibroblasta) i *in vivo* (implantacijom skafolda kod 33 Sprague–Dawley pacova). Prema njihovim rezultatima CA-Mel skafoldi su potvrdili biokompatibilnost i pokazali bolju adheziju, veću ćelijsku održivost i proliferaciju osteoblasta u poređenju sa CA skafoldima, odnosno potvrdili osteokonduktivni i osteoinduktivni efekat nakon 3 i nakon 6 mjeseci [62].

Zanimljiva je studija grupe kineskih naučnika koji su ispitivali bioaktivnost, biokompatibilnost i neke fizičko-hemijske karakteristike trikalcijum aluminatnih cemenata. U istraživanje su bile uključene tri eksperimentalne grupe sastavljene od uzoraka proizvedenih sol-gel metodom (označene kao PSC-91, PSC-73, i PSC-55, što odgovara molarnim odnosima od 9/1, 7/3, i 5/5), dok je kao negativna kontrola korištena grupa sastavljena od uzoraka MTA. Evaluirani su: vrijeme vezivanja, pH, otpornost na pritisak, bioaktivnost, biokompatibilnost (ispitivanjem citotoksičnosti pomoću laktat dehidrogenaze i rađen (WST-1) kit test za ispitivanje ćelijske održivosti). Mineralizacija je ocijenjena pomoću alizarin-crveno S bojenja. Prema njihovim rezultatima početno vrijeme vezivanja za PSC-73 i PSC-55 je bilo u rasponu između 15 i 25 min; te vrijednosti su bile značajno ( $p < 0,05$ , ANOVA i post-hoc test) niže od onih dobivenih za MTA (165 min) i PSC-91 (80,5 min). Svi PSC cementi su pokazali bioaktivnost nakon potapanja u simulator tjelesne tečnosti. Takođe svi testirani cementi, su potvrdili biokompatibilnost, istu kao negativna kontrola (MTA cement), osim PSC-55, koji je pokazao blagu citotoksičnost. Zaključili su da je PSC-91 povoljan materijal za terapiju vitalne pulpe jer pokazuje optimalnu otpornost na pritisak, kratko vrijeme vezivanja i visok stepen biokompatibilnosti i biološke aktivnosti [63].

Biološka svojstva kalcijum aluminatnog cementa CAC+, bila su i predmet izučavanja jedne vrlo obimne *in vitro* studije iz 2017. godine. *Castro* i saradnici su istražili uticaj CAC + na osteoblaste indirektnim kontaktom ispitivanog materijala i ćelija, primjenom Transwellove® membrane, polazeći od pretpostavke da ne postoji statistički značajna razlika u osteogenom odgovoru ćelija, između CAC + i MTA. Za procjenu citotoksičnosti rađen je MTT test, gdje je nakon jednog i nakon 7 dana, ćelijska održivost bila veća u CAC +

kulturama ćelija u poređenju sa MTA kulturama, a i CAC + kulture i MTA kulture ćelija su imale niže vrijednosti ćelijske održivosti u odnosu na kontrolu. CAC + kultura je pokazala veću ekspresiju osteoblastnih markera : vezanog faktora transkripcije 2 (RUNX2), osterixa (OSX), koštanog sijaloproteina (BSP) i osteokalcina (OC) u odnosu na MTA, 7.-og i 10-og dana. Najviši nivo ekspresije gena konstatovan je 7-og dana kod kontrolne kulture ćelija, dok je 10.-og dana bio najviši za CAC + kulture. ( $p<0,05$ ). Kada je u pitanju efekat cemenata na aktivnost alkalne fosfataze i mineralizaciju ekstracelularnog matriksa, 10-og dana, CAC+kulture su pokazale najviše nivo ALP aktivnosti, a zatim slijedi kontrola i MTA grupe. Iako je mineralizacija matriksa otkrivena u svim grupama, depoziti kalcijuma su nasumično distribuirani kod kontrolne kulture, dok su za MTA kulture i CAC + kulture oni otkriveni samo na periferiji. Autori su zaključili da bi CAC + mogao biti obećavajući cement u terapiji reparacije koštanih defekata periapeksne regije i preporučili provjeru ovih rezultata in vivo studijama [64].

Kalcijum aluminatni cement (CAC  $C_1$ ), dobiven dodatkom vodenog rastvora LiCl kalcijum aluminatnom cementu (CAC) se pokazao kao bioaktivran materijal, koji ne uzrokuje hemolizu, ne ispoljava citotoksične efekte, ima zadovoljavajuću otpornost na pritisak i skraćeno vrijeme vezivanja, te je potencijalni kandidat za biomedicinske aplikacije, prema mišljenju *Gutiérrez* i saradnika [65].

*Soares DG* i sar. (2016.) su realizovali interesantno istraživanje u kome su testirali uticaj biomembrane (BM) sastavljene od matrice citosan/kolagena sa ugrađenim mikročesticama kalcijum-aluminatnog cementa na humane ćelije zubne pulpe. Kao negativna kontrola je služio inertni materijal polistiren. Citokompatibilnost je ocijenjena nakon 1, 7, 14 i 28 dana u kulturi. Mjerena je aktivnost alkalne fosfataze (ALP), ukupna proizvodnja proteina, ekspresija gena za DMP-1/DSPP i taloženje mineralizovanih nodula. Ćelije zubne pulpe koje su bile u kontaktu sa biomembranom su pokazale veću sposobnost proliferacije ćelija nalik odontoblastima u odnosu na kontrolu. Kontakt BM sa ćelijama je izazvao intenzivniju ALP aktivnost, višu proizvodnju proteina u 14 dana, te veće ekspresije gena DSPP i DMP-1 nakon 28 dana, što je dovelo do taloženja od oko pet puta više mineralizovanih nodula u odnosu na kontrolu [66].

*Oliveira IR* i saradnici (2017.) su potvrdili da mješavine kalcijum aluminatnih cemenata CAC (sa kolagenom, cirkonijumom, cink oksidom, trikalcijum fosfatom, hidroksiapatitom i kolagenom) pokazuju veliki potencijal za primjenu u odontologiji i

ortopediji u poređenju sa komercijalnim proizvodima za primjenu u stomatologiji (MTA, glasjonomer cement Vidrion) i ortopediji (PMMA) Ovi istaživači su ispitali citotoksičnost cementnih kompozicija na osteoblastima ,u uslovima *in vitro* , primjenom MTT testa za procjenu ćelijske vijabilnosti i mjeranjem aktivnosti alkalne fosfataze. CAC mješavine su pokazale veću aktivnost alkalne fosfataze u poređenju sa kontrolom. U pogledu preživljavanja osteoblastnih ćelija, mješavine CAC su pokazali veću ćelijsku održivost u odnosu na komercijalne proizvode i to CAC sa kolagenom ( $1.59 \pm 0.04$ ), cink oksidom ( $1.58 \pm 0.01$ ) i cirkonijumom ( $1.55 \pm 0.02$ ) uz statistički značajnu razliku u odnosu na PMMA ( $p<0,001$ ). Sem toga ispitali su i bioaktivnost kalcijum aluminatnih cementnih mješavina. Uzorci cemenata koji su prethodno tretirani rastvorom natrijum silikata su potapani u simulator tjelesne tečnosti (SBF), a potom je primjenom SEM-a, rentgenske analize (EDX) i konfokalne ramanske spektroskopije procijenjena sposobnost formiranja apatita . Rezultati su pokazali da je na površinama svih uzoraka CAC mješavina došlo do precipitacije kalcijuma i fosfora uz posljedično formiranje kalcijum fosfata, a konstatovano je i obrazovanje homogenog sloja apatita [67].

#### 1.1.2.2. Ispitivanje biokompatibilnosti kalcijum aluminatnih sistema u *in vivo* uslovima

**In vivo testovi** biokompatibilnosti podrazumijevaju eksperimentalna istraživanja na životinjama ili na pacijentima koji su dobrovoljno pristali na tu saradnju (zubi indikovani za ekstrakciju iz ortodontskih ili parodontoloških razloga). Skoro da nema vrste i podvrste životinjskoga svijeta na kojoj se nije obavljalo neko naučno istraživanje. Ipak, kad su u pitanju stomatološka istraživanja prednost se daje pacovima. Prvi pisani trag o eksperimentisanju pacovima potiče iz sredine XIX vijeka, kada je *Philipeaux* izučavao na koji način adrenaloktomija utiče na albino pacove [68]. Prvi pacovi uzgojeni za potrebe medicinskih ispitivanja su bili na Wistar institutu u Filadelfiji [69,70]. Iako danas postoji više stotina čistokrvnih i oko pedeset ukrštenih sojeva pacova, u stomatološkim eksperimentima najviše se upotrebljavaju sojevi *Wistar* i *Sprague-Dawley* [70].

Eksperimentalna istraživanja biokompatibilnosti na malim laboratorijskim životinjama se vrše primjenom potkožne implantacije, alergijskim testovima i ispitivanjima akutne i hronične sistemske toksičnosti stomatološkog materijala. Efikasnost testova na životinjama je veća u odnosu na *in vitro* istraživanja. Sa druge strane, ovi testovi su upitne etičnosti, dosta su skupi, a i teško je pratiti kontrolne varijabile [70].

*Aguilar* i sar. (2012.) su potvrdili biokompatibilnost i bolju reakciju tkiva kod primjene kalcijum aluminatnog cementa EndoBindera u odnosu na GMTA, nakon potkožne implantacije ovih materijala u tkivo pacova. Studija je sprovedena na 15 pacova, kod svakog su načinjene po 2 incizije na potkožnom tkivu leđa, te izvršena potkožna implantacija polietilenskih tubica sa testiranim materijalima. Životinje (po 5 pacova) su žrtvovane u 3 opservaciona perioda: nakon 7, 21 i 42 dana. Nakon 42 dana, EndoBinder nije prouzrokovao inflamatornu reakciju, dok je na mjestu primjene GMTA konstatovano prisustvo blage inflamatorne reakcije, koja govori u prilog hroničnom zapaljenju [71].

*Garcia* i sar. (2014.) u sličnoj studiji, upoređuju biokompatibilnost EndoBindera sa mineralnim trioksid agregatom i kalcijum hidroksidom, takođe, nakon potkožne implantacije. Polietilenske cjevčice sa ispitivanim cementima su implantirane u dorzalno potkožno tkivo 30 pacova. Nakon eksperimentalnog perioda od 7, 30, i 90 dana, pacovi su žrtvovani, uzeti su uzorci kože sa cjevčicama za patohistološku analizu. Analizirani su prisustvo upalnih medijatora i citokina. EndoBinder nije prouzrokovao inflamatornu reakciju nakon 90 dana, a sličan rezultat su pokazali i mineraltrioksid agregat i kalcijum hidroksid. Debljina fibrozne kapsule je značajno povećana tokom perioda praćenja ( $P<.05$ ). Što se tiče upalnih medijatora, prisustvo Ptges<sub>2</sub> i Il-10 je konstatovano samo nakon 7 i nakon 30 dana, bez statistički značajne razlike među eksperimentalnim grupama [6].

Godinu dana kasnije, u zanimljivoj studiji *Garcia* i sar. (2015.) proučavaju reparaciju koštanih defekata nakon primjene kalcijum aluminatnog cementa (EndoBinder), mineral trioksid agregata (MTA), i kalcijum hidroksida. Nakon pripreme, cementi su ubaćeni u mehanički stvorene koštane defekte (veličine 3.3 mm) u desnoj i lijevoj tibiji 30 štakora Wistar soja. U kontrolnoj grupi, koštani defekti su ispunjeni ugruškom krvi samih životinja. Nakon vremenskih intervala od 7, 30, i 90 dana rađena je biopsija kosti ( $n = 5$ ). Odgovor koštanog tkiva, stvoren u kontaktu sa materijalima je analiziran pomoću mikroskopa. Tokom eksperimentalnog perioda u svim grupama je uočeno značajno povećanje procenta novoformiranog koštanog tkiva. Za EndoBinder i MTA (30 i 90 dana), procenat novoformiranog koštanog tkiva je bio statistički značajno veći od onog u kontrolnoj grupi ( $P<0,5$ ), ali vrlo sličan procentu novoformiranog koštanog tkiva nakon primjene kalcijum hidroksida ( $P>0,05$ ). Zaključili su da kalcijum aluminatni cement (EndoBinder) pokazuje slično ponašanje kao MTA, te favorizuje potpuni oporavak kosti nakon 3 mjeseca [72].

*Palmquist* i saradnici (2009.) su u svojoj studiji komparirali osteointegraciju kobalt hrom (CoCr) implantata bez premaza, u odnosu na kobalt hrom implantate sa premazom kalcijum aluminata. Implantati cilindričnog dizajna sa piramidalnom površinskom strukturu

su aplicirani u udove novozelandskih bijelih zečeva. Poslije 6 nedelja, zečevi su žrtvovani, a uzorci su podvrgnuti histološkoj analizi i histomorfometriji. CoCr implantati sa kalcijum-aluminatnim premazom su rezultirali znatno većim stepenom koštanog kontakta, u odnosu na nativne CoCr implantate [73].

Romeo McGowan i saradnici (2012.) su u uslovima *in vivo* potvrdili biokompatibilnost, osteokonduktivnost i osteoinduktivnost kalcijum aluminatnih melatonin skafolda (CA-Mel) nakon implantacije u kalvarijumske defekte kod ženki ovariekтомisanih pacova. Potvrđeni su znaci tkivne inkapsulacije, biodegradacija kao i znaci regeneracije kosti nakon 3 i nakon 6 mjeseci od implantacije skafolda (fluorohromskim bojenjem). Sem toga, uradili su i ispitivanja u *in vitro* uslovima i dokazali da CA-Mel skafoldi u poređenju sa CA skafoldima povećavaju adheziju, održivost i proliferaciju ćelija normalnih ljudskih osteoblasta, ali ne i fibroblasta NIH3T3 [74].

Miljković ND i saradnici (2009.) su par godina ranije u sličnoj studiji došli do nešto drugačijih rezultata. Kalcijum aluminat (CaAl), CaAl modifikovan arginin-glicin-aspartičnom kiselinom i beta-trikalcijum fosfat (TCP) su implantirali u kalvarijumske defekte pacova. Procenat novoformirane kosti i osteointegracije su određivani primjenom 3 različite metode: radiografije, mikrokompjuterizovane tomografije i histološke analize. Nakon 4 sedmice, nije utvrđeno postojanje novoformirane kosti niti znaci osteointegracije u kostima lobanje tretiranim sa CaAl ili CaAl-modifikovanim arginin-glicin-aspartičnom kiselinom, dok su debele fibrozne kapsule bile vidljive oko cijelog obima implantata u obema ispitivanim grupama. U beta-TCP grupi je primjećena neovaskularizacija implantata, što je u skladu sa ranom fazom formiranja nove kosti. Osim toga, u beta-TCP grupi su nakon 4 sedmice bili prisutni i znaci osteointegracije implantata. Nije bilo reakcije mekog tkiva oko implantata beta-TCP. Zapažanja ovih autora ukazuju na to da su potrebni specifičniji peptidi adhezije za aktiviranje bioinertnog CaAl implantata i promovisanje formiranja kostiju u kraniofacijalnom skeletu [75].

Kalcijum-aluminatni cementi su pokazali mali afinitet za rast bakterija, nisku toksičnost, i imunogenost kada se koriste kao restaurativni materijali, ali nisu testirani *in vivo* u postupcima pulpotomije. Prva studija te vrste sprovedena je u septembru 2014. godine na pulpi pacova. Kalcijum aluminatni cement (Quick-Set) je testiran sa 2 mineral triksid agregata, ProRoot MTA i MTA Plus. Ovi cementi su primjenjivani nakon pulpotomije, a kontrola su bili pacovi kod kojih nije rađena pulpotomija, ili pacovi kod kojih nakon urađene pulpotomije nisu primjenjivani ispitivani cementi. Prisustvo inflamacije je određivano kvantifikacijom proinflamatornih citokina, interleukina (IL) -1 $\beta$  i IL-1 $\alpha$  u pulpi tretiranih

zuba, a histološka analiza rađena nakon 30 i nakon 60 dana od postavke cemenata (parametri koji su analizirani su stvaranje dentinskog mosta, prisustvo bakterija i vitalitet pulpe). Nociceptivni odgovor je procjenjivan mjerenjem dužine trajanja obroka pacova. Prema rezultatima ove studije koncentracije IL-1 $\beta$  i IL-1 $\alpha$  su smanjene kod zuba sa cementima, ali nije bilo značajne razlike između 3 cementa. Dentinski most je otkriven nakon 30 i nakon 60 dana kod primjene svakog od 3 cementa, a i svi zubi su ostali vitalni nakon 60 dana. Trajanje obroka je značajno skraćeno nakon postavljanja cemenata, što ukazuje na nociceptivni odgovor, ali nije bilo razlike između materijala. Kalcijum aluminatni cementi su u ovoj studiji pokazali slične osobine mineral trioksid agregatima i potvrdili mogućnost primjene nakon pulpotoromije [76].

*Radović i sar.* (2017.) su u vrlo interesantnoj studiji novijeg datuma dokazali da novi nanostrukturni cement na bazi kalcijum aluminata ima povoljan terapijski efekat u postupku direktnog prekrivanja pulpe ovaca. Istraživanje je sprovedeno na 10 zuba dvije ovce (*Ovis ovaca*). Nakon preparacije kaviteta V klase na bukalnim površinama ovih zuba izvršeno je direktno prekrivanje eksponirane pulpe novim kalcijum aluminatnim cementom, koji je sintetisan na Institutu za nuklearna istraživanja u Vinči i sadrži kalcijum aluminat, kalcit i barijum sulfat u odnosu 1:2:2. Svi kaviteti su potom restaurisani glasjonomer cementom. Period opservacije je bio 28 dana nakon čega su životinje eutanizirane, a preparati podvrgnuti histološkoj analizi. Histološka analiza je pokazala da je dentinski most formiran na gotovo svim uzorcima zuba (izuzev u jednom uzorku). Konstatovano je blago do umjerenog zapaljenje pulpe. U većini uzoraka je zapažena neoangiogeneza sa proliferacijom postojećih krvnih sudova. Zaključili su da nanostrukturni materijal zasnovan na kalcijum aluminatnom cementu pokazuje dobar potencijal za prekrivanje pulpe, uz preporuku za dalnjim istraživanjima biološkog efekta ovog cementa na pulpu i parodontalna tkiva [77].

#### 1.1.3. Primjena materijala na bazi kalcijum silikata u stomatologiji

Kalcijum silikatni cementi spadaju u najviše istraživane materijale današnjice. Najpoznatiji komercijalni kalcijum silikatni cement je Mineral trioksid agregat (MTA).

MTA je razvijen iz Portland cementa (PC) i proizvodi koji su danas dostupni na tržištu u svom sastavu sadrže 50-80% PC-a. Dostupan je na tržištu kao dvokomponentni

sistem u obliku praha i tečnosti, ili u obliku dvije paste. Za razliku od Portland cementa, MTA cementi imaju duže radno vrijeme, ne sadrže teške metale ni toksične spojeve i imaju manje čestice. Hemijski sastav MTA-a čine: dikalcijum silikat, trikalcijum silikat, trikalcijum aluminat, tetrakalcijum aluminofeđit, kalcijum sulfat dehidrat, bizmut oksid, a u tragovima su prisutni: silicijum oksid, kalcijum oksid, magnezijum oksid, kalcijum i natrijum sulfat. Kalcijum sulfat dihidrat i tetrakalcijumaluminofeđit utiču na vrijeme stvrdnjavanja. Zahvaljujući prisustvu bizmut oksida materijal je rentgenkontrastan i njegov udio u materijalu zavisi od proizvođača [78].

Postoje dva tipa MTA-a, bijeli (engl. White MTA, WMTA) i sivi (engl. Gray MTA, GMTA). WMTA ima finije čestice homogenije strukture, veličine od 1 do 30  $\mu\text{m}$ , za razliku od GMTA-a čije su čestice veličine od 1 do 10  $\mu\text{m}$  [79]. Glavna razlika između ova dva tipa MTA, je veća koncentracija oksida gvožđa u Grey MTA, koji je, prema nalazima nekih studija, glavni uzrok prebojenosti stomatoloških tkiva [6]. MTA se stvrdnjava reakcijom hidratacije. S obzirom da je reakcija vezivanja hidratacija, u samom materijalu mora biti prisutna dovoljna količina vode, ali i oko njega, što ga čini naročito pogodnim materijalom za rad u ustima. Kad se primjenjuje u kombinaciji pasta/pasta, prilikom pripreme se istisnu jednakе količine obe paste, dok se u kombinacij prah/voda priprema u omjeru 3:1[80]. Reakcija vezivanja materijala se odvija u nekoliko faza. Početna faza je hidratacija dikalcijum i trikalcijum silikata pri čemu se kao rezultat stvara kalcijum hidroksid i hidrirani oblik kalcijum silikata. Oni formiraju koloidnu gel masu u kojoj nadalje minerali otopljeni u vodi i njihovi hidrirani produkti stvaraju mrežu kristala. Između kristala je amorfna struktura prožeta porama kroz koje prolazi slobodna voda. U osnovi kristalne strukture su međusobno isprepletani kubični i igličasti kristali, pri čemu igličasti kristali stvaraju ograničene linearne nakupine, koje ispunjavaju prostore između kubičnih kristala [80]. Početna faza vezivanja se završava nakon 3-4 sata, dok konačno sazrijevanje strukture i otpornost prema lomu, materijal postiže nakon dužeg vremena (do 3 nedelje) [81].

Sluyk i sar. (1998.) su mišljenja da bi vrijeme miješanja prilikom pripreme materijala trebalo biti kraće od četiri minute zbog mogućnosti dehidratacije [81]. MTA je biokompatibilan i bioinduktiv materijal i prema različitim istraživanjima, to je zasluga otpuštanja jona kalcijuma iz strukture MTA-a i formiranja kristala kalcijuma na površini dentina, te aktivacije enzimskih i prekursorskih sistema u organizmu koji su odgovorni za povećanje ćelijske aktivnosti i reparacije [81-83]. Prema istraživanju Wu-a i sar. bioinduktivnost i biokompatibilnost su posljedica stvaranja mineralnog sloja između GMTA-

a i zubnog tkiva [84]. Istraživanja pokazuju kako WMTA djeluje na osteogeni fenotip s indukcijom aktivnosti alkalne fosfataze i produkcije osteonidogena, osteonektina i osteopontina [85]. Upoređivanjem rezultata dobivenih istraživanjima koja svjedoče o uticaju MTA-a, amalgama, ZOE pasti, smola i kalcijum hidroksida na kosti parodonta, došlo se do zaključka kako jedino MTA djeluje induktivno na metabolizam ćelija, podstiče cementogenezu, osteogenezu i proliferaciju svih ćelija, ne izazivajući pri tome upalni odgovor organizma [86-88].

Preporuka je da se nakon aplikacije MTA preko njega postavi podloga glasjonomer cementa bez nagrizanja površine, kako bi se izbjegao kontakt koncentrovane slobodne poliakrilne kiseline i MTA-a. Kiseline poput poliakrilne ili ortofosforne, koje su u upotrebi za pripremu površine tvrdih zubnih tkiva, ulaze u strukturu MTA-a i otapaju kristale povećavajući poroznost [89,90]. Ako postoji potreba treba postaviti kompozitni ispun direktno na MTA i to najmanje 96 sati nakon postavljanja MTA-a, jer ortofosforna kiselina znatno narušava njegovu strukturu [91]. *Torabinejad* i *Chivian* preporučuju postavljanje kuglice vate namočene u sterilnu vodu na površinu MTA-a u slučaju upotrebe materijala za prekrivanje pulpe, retrogradno punjenje korijenskih kanala ili zatvaranje jatrogenih perforacija [91]. Kuglicu vate treba odstraniti nakon 24 sata, kako ne bi došlo do prevelikog vezivanja vode, koja će umanjiti pritisnu čvrstoću tokom 72 sata od postavljanja [92].

MTA posjeduje izvanredno rubno zatvaranje, zahvaljujući ekspanziji prilikom stvrdnjavanja, ali i otpuštanju jona kalcijuma sa posljedičnom precipitacijom kalcijum hidroksida i hidroksiapatita na svojoj površini. U poređenju sa amalgamom, Super EBA-om i IRM-om koji su prouzrokovali nastanak rubne pukotine veličine od 3,8 do 14,9  $\mu\text{m}$ , MTA nije pokazao sklonost nastanku rubnih pukotina [93].

Kalcijum silikatni cementi su našli široku primjenu u svim granama stomatologije, a pokazali su i neke pozitivne karakteristike, koje im omogućavaju potencijalnu primjenu u ortopedskoj hirurgiji, za reparaciju koštanih defekata. U prilog tome govori in vitro istraživanje, u kome je bijeli Portland cement u kontaktu sa simuliranom tjelesnom tečnošću (SBF), tokom 7 dana, pokazao veću precipitaciju hidroksiapatita na svojoj površini. Pretpostavlja se da ovaj sloj hidroksiapatita predstavlja osnovu za povezivanje i proliferaciju koštanih ćelija in vivo i da će vjerovatno povećati stopu formiranja novog koštanog tkiva [94].

Indikacije za primjenu MTA su: fos rut, prekrivanje pulpe u svrhu apeksogeneze kod zuba s nezavršenim rastom korijena, očuvanja vitaliteta pulpe kod zuba sa završenim rastom

korijena, apeksifikacija kod mladih trajnih zuba kod kojih je došlo do odumiranja pulpe, retrogradno punjenje kanala korijena zuba prilikom apikotomije, zatvaranje otvorenih furkacija, popunjavanje defekata uzrokovanih internom ili eksternom resorpcijom i punjenje korijenskih kanala [95].

MTA ima neke poznate nedostatke, kao što su: dugo vrijeme vezivanja, kratko radno vrijeme, relativno teška klinička manipulacija, visoka cijena, i potencijalna diskoloracija. Poslednjih godina sintetisane su i brojne nove formulacije materijala na bazi kalcijum silikata, nalik MTA, djelimično izmijenjenog hemijskog sastava [95].

**Bijeli MTA (WMTA)** se smatra prvom poboljšanom verzijom MTA. WMTA je uveden sa ciljem prevazilaženja potencijalne diskoloracije uzrokovane primjenom GMTA. Osnovna razlika između ove dvije varijante MTA, je isključenje željeza iz sastava bijelog MTA [96-99].

**MTA Angelus**, kalcijum silikatni cement, kod koga je uklonjen gips i prema specifikaciji vrijeme vezivanja 10-15 minuta kraće u odnosu na ProRoot. MTA *Angelus* se pokazao veoma uspješnim u liječenju internih resorpcija i fos ruta [99,100].

**MTA Plus** je nova komercijalna verzija MTA, kraćeg vremena vezivanja i sa manjom veličinom čestica u odnosu na ProRoot, kod koga polovina čestica ne prelazi 1  $\mu\text{m}$  [101].

**MTA Bio**, bijela verzija kalcijum silikatnog cementa. Po sastavu je sličan bijelom MTA Angelusu. Sinteza ovog cementa se odvija u posebno kontrolisanim laboratorijskim uslovima kako bi se izbjegao uticaj neželjenih zagađivača, posebno arsena. Indikacije za primjenu MTA Bio su identične MTA, materijal stimuliše biominerizaciju i pokazuje malu citotoksičnost [102-104].

**Bioagregat**- prvi komercijalni nanostruktturni cement na bazi trikalcijum silikata. Sadrži oko 41% trikalcijum silikata, a kao kontrastno sredstvo u njegov sastav ulazi tantal oksid [105-107]. Materijal je pokazao biokompatibilnost uporedivu sa MTA, a prema rezultatima jedne studije ne djeluje toksično na ljudsku pulpu i ćelije periodontalnog ligamenta [108]. Ipak, treba biti pažljiv kad se koristi u terapiji direktnog prekrivanja eksponirane pulpe, ili kad se aplicira na vrlo tanak preostali sloj dentina, kako bi se spriječila eventualno moguća bakterijska kontaminacija, jer Bioagregat nema antibakterijsko dejstvo na Lactobacillus, što je potvrđeno studijom Yalcina i sar [109].

**Biodentin** kao i MTA, predstavlja trikalcijum silikatni cement, s tim što za razliku od MTA sadrži cirkonijum oksid kao rentgen kontrastno sredstvo i ne sadrži trikalcijum aluminate. Dodatak 15% kalcijum karbonata u njegov sastav poboljšao je mikrostrukturu i olakšao rukovanje cementom. Tečnost cementa sačinjavaju kalcijum hlorid, voda i hidrosolubilni polimer, koji je odgovoran za nepovoljnu osobinu-ispiranje Biodentina. Osim toga, nedostatak ovog cementa je i slabija rentgen kontrasnost u odnosu na druge kalcijum silikatne cemente, s obzirom da umjesto bizmut oksida, sadrži cirkonijum oksid kao kontrast [110-113]. Korišten je u različitim studijama kao sredstvo za prekrivanje pulpe [114,115] kod pulpotorije [116] za retrogradno punjenje kanala korijena zuba [117].

U jednoj interesantnoj skorašnjoj studiji *Chalas* i sar. (2015.) potvrđuju obećavajući bioaktivni potencijal Biodentina i MTA plus. Analizom dentinskih diskova načinjenih od humanih zuba i prethodno ispunjenih ispitivanim materijalima, pomoću semielektronske mikroskopije, EDS-a i Raman spektroskopije upoređuju hemijske reakcije između materijala i dentina. Dobiveni rezultati su otkrili razlike u elementarnom sastavu između materijala. Uzorci Biodentina sadrže definitivno više kalcijuma i malo više kiseonika, dok je nivo sadržaja ugljenika uporediv. Biodentin je pokazao veću aktivnost u dentinu, sa više kristalnih formacija u sastavu i boljim kontrastom između svijetlih i tamnih kristala, kao i međupovršinski sloj veće širine (53 um) u odnosu na MTA + (18 um). Mikroskopskom analizom je utvrđeno bolje kanalno zaptivanje u odnosu na MTA+, gdje se vidjela fragmentarna granica između materijala i dentina. Raman spektroskopija je istraživačima omogućila i uvid u hemijske karakteristike dentina, Biodentina i MTA +. Rezultati su pokazali da uzorkovani dentin sadrži apatit, Biodentin sadrži trikalcijum silikate, a oba materijala sadrže kalcit [118].

#### 1.1.3.1. Studije biokompatibilnosti kalcijum silikatnih cemenata

Biokompatibilnost kalcijum silikatnih cemenata je bila predmet brojnih istraživanja na ćelijskim kulturama [119-122] i eksperimentalnim životinjama [123-136].

Većina ovih istraživanja se bazirala na komparaciji kalcijum silikata sa kalcijum hidroksidom [136-139] ili sa drugim kalcijum silikatnim cementima [140-145].

Uporedno sa popularizacijom kalcijum aluminatnih cemenata poslednju deceniju, povećao se i broj studija koje su fokusirane na proučavanje biokompatibilnosti i fizičko-hemijskih svojstava ovih materijala u komparaciji sa, dobro poznatim, kalcijum silikatnim cementima.

*Emmanuel Silva* i saradnici (2014.) su u svojoj studiji komparirali bijeli MTA (WMTA) sa endodontskim cementom na bazi kalcijum aluminata (EndoBinder), ispitujući pri tome citotoksičnost, antimikrobnu aktivnost i fizičko-hemijske karakteristike ova dva materijala (pH, rastvorljivost, resorpciju vode). Citotoksičnost je ispitivana na fibroblastima, na ćelijskoj liniji 3T3, primjenom tri testa za ispitivanje citotoksičnosti: XTT, NR (neutral red) i CVDE. Antimikrobna aktivnost je utvrđivana protiv *Enterococcus faecalis*, *Stafilocokus aureusa* i *Candida albicans*, primjenom agar difuzione metode, a od fizičko-hemijskih karakteristika je određivan pH (mjerен u periodu nakon 3, 24, 72 i 168 sata, te rastvorljivost i resorpcija vode. Prema njihovim rezultatima, ni EndoBinder ni WMTA nisu pokazali citotoksičnost, u 3 pomenuta testa za mjerjenje ćelijske vijabilnosti. Oba ispitivana materijala djeluju inhibitorno na testirane mikrobiološke uzročnike. EndoBinder i WMTA su pokazali alkalan pH tokom čitavog perioda trajanja eksperimenta, sa maksimalnom vrijednošću pH nakon evaluacionog perioda od 3 sata (EndoBinder 8,96; WMTA 10,22). Kod oba materijala je konstatovan lagani pad pH vrijednosti napredovanjem eksperimenta, a WMTA je pokazao statistički značajno višu pH vrijednost nakon svih evaluacionih perioda ( $P<0,5$ ). U pogledu rastvorljivosti, EndoBinder je pokazao manju rastvorljivost u odnosu na WMTA ( $P<0,5$ ), dok u pogledu resorpcije vode nije bilo statistički značajne razlike, te su i EndoBinder i WMTA imali približno iste vrijednosti povećanje mase od 9,47%, odnosno od 9,17% [12].

Studija *Ashraf A. Eida* i saradnika (2013.) je potvrdila slična osteogena/dentinogena svojstva eksperimentalnog kalcijum aluminosilikatnog cementa (Quick-set) sa kalcijum silikatnim cementom (WMTA) i zaključila da ovaj cement može biti potencijalna zamjena za komercijalno dostupne trikalcijum silikatne cemente. Za evaluaciju promjena u mRNA, odnosno praćenje ekspresije gena povezane sa osteogenom/dentinogenom diferencijacijom i mineralizacijom, proizvodnjom alkalne fosfataze i mineralizacijom ekstracelularnog matriksa (Alizarin crveno S bojenje) je korištena ćelijska linija nalik odontoblastima (MDPC-23), pacova Murina soja. Kao negativna kontrola su korišteni diskovi od teflona. Kada je u pitanju ekspresija gena (RUNX2, OCN, BSP, i DMP1), nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih cemenata u odnosu na negativnu kontrolu.

Aktivnost alkalne fosfataze se ne razlikuje značajno nakon 7 dana i nakon 15 dana između kultura ćelija sa Quick-set i WMTA, ali je značajno veća ( $P<0,5$ ) u poređenju sa negativnom kontrolom u obema sedmicama. Sem toga, Quick-set i WMTA su pokazali i značajno veću sposobnost mineralizacije ekstracelularnog matriksa ( $P<0,01$ ), u odnosu na negativnu kontrolu [5].

*Li-na-Niu* i sar. (2015.) su upoređivali ćelijski odgovor matičnih ćelija ljudske pulpe (hDPSCs) na primjenu eksperimentalnog kalcijum aluminatnog cementa (Quick SET2) i komercijalno dostupnog kalcijum silikatnog cementa (white mineral trioksid agregat; WMTA). Kao pozitivna kontrola je služio cink oksid-eugenol cement. Za procjenu ćelijske održivosti i proliferacije je primijenjeno 6 različitih testova (za ispitivanje integriteta plazma membrane, curenja citosolnih enzima, aktivnosti kaspaze-3, za rane apoptoze, oksidativni stres, metaboličke aktivnosti mitohondrija (MTT) i intracelularnog sadržaja DNK). Rezultati su pokazali da su i Quick-Set2 i WMTA u prvih 24 h ispoljavali citotoksične efekte na hDPSCs ćelije, s tim da je Quick-Set2 bio relativno manje citotoksičan od WMTA u ovoj fazi. Nakon dva ciklusa starenja, profili citotoksičnosti dva hidraulična cementa se nisu značajno razlikovali i oba cementa su pokazala mnogo slabiju citotoksičnost u poređenju sa pozitivnom kontrolom (cink oksid-eugenol cementom) [146].

Proučavanjem biokompatibilnosti kalcijum silikatnih i kalcijum aluminatnih cemenata se bavila i grupa brazilskeh naučnika predvođena *Claudijom Huck* (2017). Oni su ispitivali citotoksičnost kalcijum aluminatnog cementa (EndoBindera) sa dodatkom različitih rentgen kontrastnih sredstava :  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZnO}$  ili  $\text{ZrO}_2$ , poredeći ga sa kalcijum silikatnim cementom Mineralnim trioksid agregatom (WMTA). U skladu sa ISO standardom 10993-12:2012, po 0,2 g svakog cementa je postavljeno u transwell pregrade i kultivisano 24 časa u 1 ml kulture ćelijskog medijuma (DMEM). Za potrebe ovog istraživanja, je primijenjena ćelijska linija MDPC-23, nalik odontoblastima, a citotoksičnost je procjenjivana upotrebom MTT testa, mjeranjem aktivnosti alkalne fosfataze (ALP), mjeranjem ukupne proizvodnje proteina i posmatranjem ćelijske morfologije (Skening elektronском mikroskopijом-SEM). Osnovane su sljedeće grupe (n=6): NC-negativna kontrola (bez tretmana); EB-EndoBinder bez rentgen kontrasta; EBBO-EndoBinder+ $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ; EBZnO-EndoBinder+ $\text{ZnO}$ ; EBZrO-EndoBinder+ $\text{ZrO}_2$  i WMTA-Bijeli MTA. Podaci su podvrgni statističkoj analizi (Kruskal-Wallis test, nivo značajnosti=5%). Ćelije koje su bile izložene različitim verzijama EndoBindera su pokazale blago smanjenje vitalnosti, nešto slabiju ukupnu proizvodnju proteina i nešto manju aktivnost alkalne fosfataze, u poređenju sa negativnom kontrolom i bijelim MTA, ali bez statistički

značajne razlike. Takođe, nije bilo značajnijih promjena ni kad je u pitanju ćelijska morfologija. Prema rezultatima ovog istraživanja, kalcijum aluminatni cement EndoBinder kao i kalcijum silikatni cement WMTA nije ispoljio negativan uticaj na metabolizam ćelija nalik odontoblastima, tj potvrdio je citokompatibilnost, bez obzira na dodatak različitih rentgen kontrastnih sredstava [147].

Kineski istraživači *Lio* i saradnici (2012.) su se fokusirali na proučavanje činjenice na koji način se dodatak različitih količina trikalcijum aluminata ( $\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$ , C3A), kalcijum silikatnom cementu, odražava na njegovu biokompatibilnost i fizičko-hemijske karakteristike. Rezultati njihovog istraživanja su pokazali da se najboljom i najprihvatljivijom, pokazala kombinacija sa dodatkom trikalcijum aluminata u količini od 5 do 10 %, jer je ova kombinacija potvrdila bioaktivnost i biokompatibilnost (primjenom MTT testa na ćelijskoj liniji L929), pokazala stimulativni efekat na rast ćelija i stoga se u budućnosti može smatrati potencijalnim cementom za endodontsku primjenu. Osim toga, dodavanje trikalcijum aluminata u kalcijum silikatni cement je doprinijelo i pozitivnijim fizičko-hemijskim svojstvima materijala, poboljšalo je otpornost na pritisak, ali i skratilo ukupno vrijeme vezivanja cementa [148].

Zanimljivo istraživanje o biokompatibilnosti kalcijum aluminatnog cementa Quick-Set (Avalon Biomed Inc, Bradenton, FL) u komparaciji sa već poznatim kalcijum silikatnim cementom White ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental specijaliteti, Tulsa, OK), rađeno na premolarima Beagle pasa, su realizovali *Kohout* i saradnici (2015.) Na 42 donja premolara Beagle pasa su urađeni pristupni kaviteti i potom, očišćeni, oblikovani i opturisani kanali korijena zuba sa Quick-set ili bijelim MTA. Odmah potom su, na istim zubima, urađene osteotomije i apikotomije. Psi su žrtvovani nakon 90 dana, a zubi i okolna tkiva su uklonjeni i pripremljeni za histološki analizu. Kao parametri za procjenu biokompatibilnosti pomenutih cemenata su korišteni: prisustvo inflamacije u području apeksa, formiranje novog cementa, formiranje periodontalnih ligamenata i kvalitet kosti. Nakon 3 mjeseca, Quick-Set i bijeli ProRoot MTA su pokazali podjednake efekte: odličan kvalitet kosti, formiranje novog cementa na površini materijala, regeneraciju parodontalnog ligamenta. Jedina značajna razlika je u intenzitetu inflamatornog odgovora, koji je bio izraženiji u Quick-Set grupi [149].

U studijama koje su biokompatibilnost ispitivale, primjenom metodologije potkožne implantacije polietilenskih tubica na leđima pacova, kalcijum silikatni i kalcijum aluminatni cementi su pokazivali ili identične rezultate [6], ili su kalcijum aluminati imali za nijansu veći

stepen biokompatibilnosti tj. potpuno odsustvo inflamatornog odgovora, dok je na mjestu primjene kalcijum silikata konstatovano prisustvo blage inflamatorne reakcije [71].

## **2. RADNA HIPOTEZA**

1. Nanomaterijali na bazi kalcijum kalcijum aluminata ne ispoljavaju toksične efekte na ćelije živog tkiva.
2. Nanomaterijali na bazi kalcijum aluminata imaju povoljan efekat na reparatorne sposobnosti pulpe

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

**OSNOVNI CILJ:** Ispitati biokompatibilnost nanostrukturnih biomaterijala na bazi kalcijum aluminata u in vitro i in vivo uslovima.

Za postizanje osnovnog cilja istraživanja, definisani su sljedeći bliži ciljevi i zadaci:

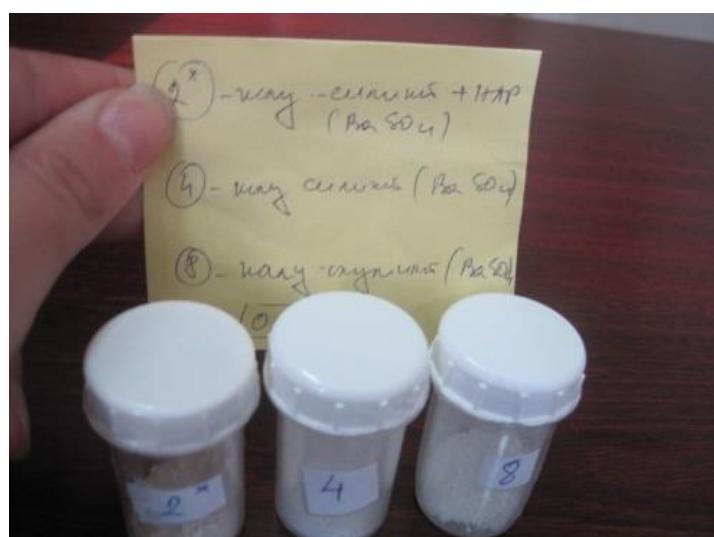
#### **BLIŽI CILJEVI ISTRAŽIVANJA:**

1. Ispitati biokompatibilnost nanostrukturnog biomaterijala na bazi kalcijum aluminata u in vitro uslovima, primenom MTT testa na humanim plućnim fibroblastima (MRC-5).
2. Ispitati biokompatibilnost nanostrukturnog biomaterijala na bazi kalcijum aluminata u in vitro uslovima, primenom Komet testa na humanim plućnim fibroblastima (MRC5).
3. Ispitati biokompatibilnost nanostrukturnog biomaterijala na bazi kalcijum aluminata u in vivo uslovima, na eksperimentalnim životinjama, implantacijom materijala u potkožno tkivo pacova.
4. Ispitati biokompatibilnost nanostrukturnog biomaterijala na bazi kalcijum aluminata nakon direktnog prekrivanja eksponirane pulpe pacova (in vivo testovi).

#### 4.MATERIJAL I METOD RADA

Istraživanje je realizovano u 4 faze: ispitivanje citotoksičnosti materijala- *in vitro* studija, ispitivanje genotoksičnosti materijala- *in vitro* studija, ispitivanje biokompatibilnosti materijala implantacijom u potkožno tkivo pacova- *in vivo* studija i ispitivanje biokompatibilnosti materijala u *in vivo* uslovima nakon direktnog prekrivanja eksponirane pulpe pacova.

Ispitivan je novosintetisani nanomaterijal na bazi kalcijum aluminata. Kao kontrolni materijal je korišten bijeli MTA (MTA Angelus®).



Slika 1. Testirani materijali

Proces sinteze novih kalcijum aluminatnih sistema po metodi Jokanovića i saradnika

Za sintezu aktivnog kalcijum aluminatnog sistema bilo je neophodno prvo sintetisati pojedinačne komponente: kalcijum aluminat ( $\text{CaOAl}_2\text{O}_3$ ), kalcijum karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) i monociklični  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  ili  $\text{BaSO}_4$  (kao rentgen kontrast).

Kalcijum aluminatna faza je sintetisana korištenjem  $\text{CaCl}_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , a aluminatna sol ( $\text{AlOOH}$ ) je dobivena hidrotermalnim tretmanom. Trialuminijum-dva-butoksid je rastvoren u mješavini etanola i vode (u omjeru 1:4). Ova mješavina se potom zagrijavala na  $85^\circ\text{C}$ , uz energično miješanje. Nakon 2 sata zagrijavanja, rastvor se hladio na sobnoj temperaturi, dodavala se  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Ovako dobiven rastvor se mijesao sa stohiometrijskom količinom  $\text{CaCl}_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Germany) i prenosio u autoklav, gdje je ostajao narednih 5 sati pri

temparaturi od 150 °C i pritisku 5 bara. Dobiveni gel se sušio na 150 °C, radi isparavanja vode.

Kalcijum hlorid tetrahidrat ( $\text{CaCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) je korišten kao prekursor u sintezi kalcijum karbonata. Količina od 5 mmol  $\text{CaCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  je rastvorena u 50 ml etilen glikola (Sigma-Aldrich) dejstvom ultrazvuka na 40°C (Elmasonic S30H). Potom je 10 mmol  $\text{NaHCO}_3$  dispergovano u 50 ml etilen glikola kap po kap, tokom 30 min uz mehaničko miješanje. Dobivena disperzija je potom zagrijavana 30 min na 40°C. Kalcijum karbonat je potom izdvojen iz mutnog rastvora centifugiranjem (3.4 g, 30 min), ispiran nekoliko puta u mješavini vode i etanola (1:4) i na kraju, samo u vodi. Sulfonil duodecil sulfat (0.5%) se dodavao kao antiglomeraciono sredstvo. Dobijene nanočestice su potom izlagane dejству ultrazvuka 30 min, uz snažno mehaničko miješanje tokom 5 sati. Ovako dobijen prah , nakon sušenja na 120 °C tokom 5 sati, se zagrijavao na 500°C jedan sat, kako bi se dobila kalcijum karbonatna faza.

Monociklični  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  je proizveden kalcinacijom  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  (Kemika, Croatia) na 450°C, tokom 20 sati. Ova procedura je izvedena sa ciljem da se dobije stabilna tetragonalna  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  faza, zasićena kiseonikom. Pored  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ,  $\text{BaSO}_4$  je takođe korišten kao kontrastno sredstvo.

Novi kalcijum aluminat nazvan ALBO-MCCA se dobio miješanjem  $\text{CaCO}_3$  i  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  ili  $\text{BaSO}_4$  sa kalcijum aluminatnom fazom u omjeru 2:2:1. Ova mješavina se miješala sa vodom (voda:prah 1:2), da se dobije konzistencija paste.

## 4.1. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI KALCIJUM ALUMINATNIH SISTEMA

Ispitivanje citotoksičnosti materijala je rađeno na kulturi ćelija u uslovima *in vitro*, upotreboom MTT reagensa (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), na Institutu za Onkologiju u Beogradu, u skladu sa preporukama međunarodnog ISO standarda (ISO 10993-5:2009, Part 5: Test for cytotoxicity: in vitro method).

### 4.1.1 Testirani materijali

Ispitivana je citotoksičnost nanomaterijala na bazi kalcijum aluminatnih sistema (CA), kalcijumsilikatnih sistema (CS) i mješavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS). Kao kontrolni materijali je korišten bijeli MTA (MTA Angelus®).

#### 4.1.1.1 Priprema ispitivanih cemenata

Stok ekstrakti ispitivanih cemenata su pripremljeni u kompletnoj hranljivoj podlozi inkubiranjem 100 mg svakog cementa u 1 mL hranljive podloge tokom 24 h na 37 °C. Ekstrakti su potom centrifugirani i filtrirani (0,20 µm), te razblaživani hranljivom podlogom do odgovarajućih radnih koncentracija. Korišćena hranljiva podloga je RPMI 1640 medijum u koji je dodato 3 mmol/L L-glutamina, 100 mg/mL streptomicina, 100 IU/mL penicillina, 10 % FCS-a i 25 mM Hepesa, podešenog na pH vrijednost 7.2 bikarbonatnim rastvorom.

#### 4.1.2. Hranljiva podloga i reagensi

RPMI 1640 medijum sa i bez fenol reda, L-glutamin, penicilin/streptomicin, HEPES i MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) su nabavljeni od „Sigma Chemicals Co“. Serum fetalnog govečeta (FCS) je dobijen iz „Veterinarskog zavoda“ (Novi Sad). Neposredno prije upotrebe, MTT je bio rastvoren u PBS-u pH vrijednosti 7,2 u koncentraciji od 5 mg/ml i filtriran kroz Millipore filter (0,20 µm).

#### 4.1.3. Ćelijska linija

U radu je korištena normalna ćelijska linija nabavljena od ATCC-a (American Type Culture Collection) i to MRC-5 (normalni humani fibroblasti pluća). Ćelije su gajene u jednoslojnoj kulturi, u kompletном hranljivom medijumu, na temperaturi 37 °C u vazduhu obogaćenom sa 5% CO<sub>2</sub> i zasićenom vodenom parom.

#### 4.1.4. Određivanje intenziteta citotoksičnog dejstva ispitivanih cemenata

Citotoksično dejstvo agenasa može biti direktno kada se indukuje direktna smrt ćelije ili indirektno kada se indukuje reproduktivna ćelijska smrt, kada je ćelija živa, ali se ne umnožava. Citotoksično dejstvo ispitivanih tetaoksana je procijenjeno indirektnim putem, preko određivanja preživljavanja ciljnih ćelija, nakon njihovog rasta u prisustvu tih agenasa.

Preživljavanje ćelija (S-engl. *Survival*) je procjenjivano kao odnos broja preživjelih ćelija u uzorku tretiranom ispitivanim agensom (N<sub>L</sub>) i broja ćelija u kontrolnom uzorku u kome su ćelije rasle samo u prisustvu hranljive podloge (N<sub>K</sub>). Obično se izražava u procentima (S %).

$$S (\%) = (N_L/N_K) \cdot 100$$

Iz ovako dobijenih vrijednosti načinjen je dijagram koji predstavlja procenat preživljavanja ćelija u funkciji koncentracije ispitivanih jedinjenja. Iz tog dijagrama se određuje mjera intenziteta citotoksičnog dejstva nekog jedinjenja koja je karakteristična za svako jedinjenje, **IC<sub>50</sub> vrijednost**. IC<sub>50</sub> se definiše kao ona koncentracija koja snižava preživljavanja ciljnih ćelija na 50 % u odnosu na kontrolni uzorak. IC<sub>50</sub> je obrnuto srazmerna intenzitetu citotoksičnog dejstva nekog jedinjenja. IC<sub>50</sub> dobijena na osnovu izmjerениh preživljavanja ćelija je mera i direktne i indirektne-reprodukтивne toksičnosti.

##### 4.1.4.1. Tretman ćelija (određivanje ćelijskog preživljavanja)

MRC-5 ćelije su sađene u mikrotitarske ploče sa 96 otvora sa ravnim dnom (5000 ćelija po otvoru u 50 µl podloge), a 20 h kasnije, nakon ćelijske adherencije pet različitih koncentracija ispitivanih ekstrakata su dodate u otvore ploča, kako bi finalne koncentracije bile u opsegu od 4,7-75 mg/mL. Po dodavanju ekstrakata ćelije su inkubirane 72 h na temperaturi 37 °C u vazduhu, zasićenom vodenom parom i 5 % CO<sub>2</sub>. Po isteku 72 h ćelije su fotografisane na invertnom mikroskopu, a zatim je u otvore ploča dodato po 10 µl rastvora

MTT-a (5 mg/ml u PBS-u). Uslijedila je inkubacija ćelija 4 h, a zatim je redukcija MTT-a u obojeni formazan prekinuta dodavanjem 100 µl 10% SDS-a.

Apsorbanca je mjerena na 570 nm, 24 h kasnije. S obzirom da je apsorbanca novonastalog formazana direktno srazmjerna broju živih ćelija, da bi dobili preživljavanje ćelija (S%), A uzorka sa ćelijama tretiranih različitim koncentracijama ispitivanih tetraoksana (A<sub>L</sub>), podijeljena je apsorbancom kontrolnih netretiranih ćelija (A<sub>K</sub>) i potom je ta vrijednost pomnožena sa 100. Apsorbanca blanka je uvijek oduzeta od apsorbance odgovarajućeg uzorka.

$$S(\%) = (A_L/A_K) \cdot 100$$

Pri čemu je:

**A<sub>L</sub> - Apsorbanca uzorka u kome su ćelije rasle u prisustvu ispitivanih ekstrakata**

**A<sub>K</sub> - Apsorbanca kontrolnih ćelija.**

Srednje vrednosti i standardne devijacije rezultata MTT testa su rađene u Microsoft Excel-u.

## 4.2. ISPITIVANJE GENOTOKSIČNOSTI KALCIJUM ALUMINATNIH SISTEMA

Ovaj dio istraživanja je, takođe, realizovan na Institutu za onkologiju u Beogradu. Primijenjen je Komet test, u skladu sa preporukom međunarodnog standarda ISO/DIS 10993-3 (Test for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity). U radu je korištena normalna ćelijska linija nabavljena od ATCC-a (American Type Culture Collection) i to MRC-5 (normalni humani fibroblasti pluća). Ćelije su gajene u jednoslojnoj kulturi, u kompletном hranljivom medijumu, na temperaturi 37 °C u vazduhu obogaćenom sa 5% CO<sub>2</sub> i zasićenom vodenom parom. Komet test ili elektroforeza pojedinačnih ćelija u agaroznom gelu je brz i osjetljiv metod za ispitivanje integriteta DNK na nivou pojedinačne ćelije. Predstavlja tehniku za brzu detekciju oštećenja i praćenje reparacije u molekulu DNK. Upotrebljava se na svim tipovima ćelija, osim eritrocita, a najčešće se testira na limfocitima periferne krvi.

U praksi se izvode neutralna i alkalna verzija komet testa. Za potrebe našeg istraživanja smo primijenili alkalnu verziju, pridržavajući se protokola prema Singhu i sar. (1988).

### 4.2.1. Testirani materijali

Ispitivali smo genotoksičnost kalcijum aluminatnih sistema (CA) i mješavine hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS).

### 4.2.2. Priprema reagenasa

#### **Reagensi:**

Dinatrijum EDTA

Etidijum Bromid

PBS (Ca++, Mg++ free)

Natrijum hlorid (NaCl)

Natrijum hidroksid (NaOH)

Triton X-100

Trizma Baza

#### **Procedura:**

1. Pufer za lizu: za 1000 mL: 2.5 M NaCl

146.1 g

100 mM EDTA 37.2 g

10 mM Trizma baza      1.2 g

Svi sastojci su dodati u 700 mL destilovane H<sub>2</sub>O . Nakon što smo promiješali ovako dobivenu smješu, dodato je ~8 mg NaOH i ostavljeno oko 20 min kako bi došlo do rastvaranja. pH vrijednost je podešena na 10, korišćenjem koncentrovane HCl, a potom je izvršeno dopunjavanje sa destilovanom H<sub>2</sub>O do 990 mL. Uslijedilo je čuvanje na sobnoj temperaturi.

**Finalni pufer za lizu:** Dodat je svježi 1% Triton X-100 koji je ostavljen u frižideru 30 minuta prije tretiranja uzorka na slajdovima..

## **2. Pufer za elektroforezu (300 mM NaOH / 1 mM EDTA):**

### **Stok rastvori:**

1. 10 N NaOH (200 g/500 mL dH<sub>2</sub>O)
2. 200 mM EDTA (14.89 g/200 mL dH<sub>2</sub>O, pH 10)

Čuvali su se na sobnoj temperaturi.

Za 1X pufer (kojeg smo pripremali svježeg prije svake elektroforeze): po 1 litru, je dodavano 30 mL NaOH i 5.0 mL EDTA, dopunjavano do 1000 mL uz energično miješanje. Prije upotrebe smo obavezno provjeravali pH pufera koji je morao biti >13.

**3. Pufer za neutralizaciju:** 0.4 M Tris - 48.5 g je dodato u ~800 mL destilovane H<sub>2</sub>O, pH vrijednost je podešena na 7.5 pomoću koncentrovane (>10 M) HCl: q.s. do 1000 mL sa destilovanom H<sub>2</sub>O i sve je čuvano na sobnoj temperaturi.

## **4. Rastvor za bojenje:**

Etidijum Bromid (EtBr; 10X stok - 20 µg/mL): dodato je 10 mg u 50

mL destilovane H<sub>2</sub>O i držano na sobnoj temperaturi. Za 1X stok – pomiješano je 1 mL 10X stoka sa 9 mL destilovane H<sub>2</sub>O.

Sa EtBr-om je rukovano sa posebnom dozom opreza, s obzirom da je poznati kancerogen.

#### 4.2.3. Priprema slajdova za SCGE/Komet test

Materijal:

Normalna tačkasta agaroza (NMA)  
Low Melting Point agaroza (LMPA)  
Metanol  
Pokrovna stakalca (No. 1, 24 x 60 mm)  
Mikrocentrifugirajuće cjevčice  
Mikropipetor  
Mikroskopski slajdovi  
Mikro gel elektroforeza (MGE) slajdovi  
Koplin tegle (neprozirne)  
Aparatura za horizontalnu gel elektroforezu  
Elektroforeza Power Supply

#### Priprema slajdova

1. Najprije su pripremljeni 1% (500 mg u 50ml PBS) i 0.5% LMPA (250 mg u 50 ml PBS) i 1.0% NMA (500 mg u 50 ml u Milli Q vodi). Usljedilo je njihovo zagrijavanje u mikrotalasnoj pećnici skoro do ključanja, do rastvaranja agaroze.
2. Uzorci LMPA od po 5 mL su čuvani u frižideru, do momenta upotrebe kada je vršeno njihovo otapanje u mikrotalasnoj pećnici. Nakon toga, ovi uzorci su smještani u vodeno kupatilo na 37 °C , do postizanja stabilizacije temperature.
3. Slajdovi su potapani u metanol, a potom smo prelazili preko plamenika sa ciljem da se uklone eventualni ostaci ulja i prašine.

4. Dok je agarozna bila topla, slajdovi su uranjani do trećine šlifovanog dijela i lagano izvađeni. Obrisali smo njihovu donju stranu, kako bi se uklonila agarozna, postavljali ih na ravnu površinu , kako bi se osušili i potom ih čuvali na sobnoj temperaturi.

#### 4.2.4. Tretman ćelija

#### Ćelijska kultura (monoslojna kultura)

Komet test je rađen na ćelijskoj liniji MRC-5 (normalnim humanim fibroblastima pluća). Neposredno nakon uklanjanja medijuma, izvršeno je dodavanje 0,005% tripsina (visoka koncentracija tripsina povećava oštećenja DNK). Ćelije su držane na temperaturi od 37 °C, 5 minuta, dok nije došlo do njihovog odvajanja, odnosno odljepljivanja od podloge. Potom je izvršeno dodavanje medijuma sa FCS-om, kako bi se zaustavilo enzimsko dejstvo tripsina i podešena gustina na 1x10<sup>6</sup> ćelija po mL.

5–10 µl ćelija je miješano sa 75 mL LMPA , a dalji rad je nastavljen po protokolu za Komet test.

#### 4.2.5. Elektroforeza mikrogel slajdova

Elektroforeza je realizovana u alkalnim uslovima (pH>13). Sproveden je sljedeći postupak:

- Inkubacija 2 sata na 4 °C , a potom lagano vađenje slajdova iz pufera za lizu i njihova postavka u kadicu, što bliže , jednog do drugog.
- Punjenje rezervoara kadice svježim puferom za elektroforezu, tako da tečnost potpuno pokriva slajdove.
- Ostavljanje slajdova na 20 minuta u alkalnom puferu za elektroforezu , što je dovelo do odvijanja DNK na mestima alkalnih labilnih oštećenja.
- Podešen je napon na ~0.74 V/cm i struja na 300 i puštena elektroforeza u trajanju od 30 minuta.
- Nakon isključivanja napona, slajdovi su lagano izvađeni i koso položeni u kadicu za neutralizaciju. Pipetom je nanošen pufer za neutralizaciju i ostavljan na 5 minuta. Zatim je uslijedilo ponavljanje neutralizacije, jos dva puta.

- Slajdovi su bojeni sa 80 µL 1X etidijum bromidom. Boja je ostavljana 5 minuta, a nakon toga su slajdovi uranjani u hladnu destilovanu vodu, sa ciljem odstranjivanja viška boje. Potom je na slajd postavljena pokrovna pločica i odmah urađen scoring.
- Slajdovi su ocijeđeni , držani 20 min u ledenom 100% etanolu, osušeni na vazduhu i čuvani na suvom mjestu.
- Slajdovi su rehidrirani hladnom destilovanom vodom i obojeni etidijum bromidom, kao u koraku 6. Poslije scoringa je uklonjena pokrovna pločica, slajd ispran u 100% alkoholu , osušen i sačuvan za arhivu.

Koraci 1-4 su rađeni pod prigušenim žutim svjetлом, da bi se sprečilo oštećenje DNK od strane bijelog fluorescentnog svjetla.

#### 4.2.6. Evaluacija DNK oštećenja

Za vizuelizaciju DNK oštećenja je upotrijebljen 40x objektiv na fluorescentnom mikroskopu.

Iako su mnogi sistemi za analizu slike pogodni za kvantifikaciju SCGE podataka mi smo koristili Komet 5 image analysis softver (Kinetic Imaging, Ltd. Liverpool, UK) povezan sa CCD kamerom u cilju kvantitativne i kvalitativne procjene DNK oštećenja, mjerenjem dužine migracije DNK i procenta migrirane DNK. Generalno, 50-100 nasumično izabranih ćelija je analizirano po uzorku.

#### 4.2.7. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu rezultata Komet testa je korišten Comet Assay IV (Perceptive Instruments).

## **4.3. ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI KALCIJUM ALUMINATNIH SISTEMA IMPLANTACIJOM U POTKOŽNO TKIVO: IN VIVO STUDIJA**

Ovaj dio istraživanja je sproveden nakon odobrenja Etičkog odbora Univerzitetskog kliničkog centra iz Banja Luke, broj 01-9-192.2/15, Bosna i Hercegovina.

Eksperiment je realizovan u Vivarijumu Prirodno matematičkog fakulteta, Univerziteta u Banjaluci i u Laboratoriji Zavoda za patologiju, Kliničkog centra Banjaluka.

### **4.3.1. Eksperimentalne životinje**

Animalni model su bili pacovi *Wistar* soja (18 pacova, starosti 10-11 sedmica, prosječne težine 190-280 g.). Čitav period trajanja eksperimenta, pacovi su imali slobodan pristup hrani i vodi, 12-to časovnu smjenu svjetla i mraka, temperatura vazduha se kretala 20-23°C, a vlažnost 60%±10%.

#### **4.3.1.1. Raspoređivanje pacova po grupama**

18 pacova je podijeljeno u dvije eksperimentalne grupe, koje smo označili kao I i II, u svakoj grupi po 9 pacova.

U grupi I su sa desne strane implantirane polietilenske tubice do pola ispunjene kalcijum aluminatom (CA), a sa lijeve strane tubice sa MTA.

U grupi II su sa desne strane postavljane polietilenske tubice sa kalcijum silikat hidroksiapatitom (HA-CS), dok su sa lijeve strane takođe bile tubice sa MTA.

Po 6 pacova (3 iz obe grupe) smo žrtvovali u tri opservaciona perioda: nakon 7, nakon 15 i nakon 30 dana.

### **4.3.2. Testirani materijali**

Ispitivani su nanomaterijali na bazi kalcijum aluminatnih sistema (CA) i komparirali ih sa mješavinom hidroksiapatita i kalcijumsilikatnih sistema (HA-CS), a kao pozitivna kontrola je korišten bijeli Mineral Trioksid Agregat (MTA Angelus®).

#### 4.3.3. Postupak rada

Rađena je potkožna implantacija polietilenskih tubica (dužine 10 mm, unutrašnjeg promjera 1mm), do polovine ispunjenih testiranim materijalima (CA, CS-HAP, MTA), a od polovine praznim. Prazna polovina cjevčice je predstavljala negativnu kontrolu. Postavljene su po dvije tubice na leđima svakog pacova, i to, sa desne strane cjevčica sa testiranim materijalom, a sa lijeve strane kičmenog stuba cjevčica sa MTA (pozitivna kontrola). Cjevčice su bile orjentisane tako da je materijal uvijek bio okrenut prema glavi, a prazni dio cjevčice prema repu.

Prije samog hirurškog zahvata, pacovi su uvedeni u opštu anesteziju. Doza anestetika je određivana prema tjelesnoj težini pacova, koja je izmjerena za svakog pacova pojedinačno. Za anesteziranje pacova smo upotrijebili Ketamin 90 mg/kg tjelesne težine (Ketamine Hydrochloride Injection USP) Rotexmedica-Germany u kombinaciji sa Ksilazinom 5 mg/kg telesne težine (2% Xylazin, Cp Pharma, Bergdorf, Germany), što nam je obezbijedilo trajanje anestezije oko sat vremena.

##### 4.3.3.1 Hirurška intervencija

Poslije uvođenja pacova u opštu anesteziju je uslijedio hirurški zahvat, izveden od strane iskusnog veterinara sa dugogodišnjom uspješnom praksom. Najprije je izvršena priprema operativnog polja, dezinfekcijom kože na leđima pacova, 10 % rastvorom povidon jodida, a potom i brijanje kože. U smjeru glava-rep veterinar je načinio inciziju hirurškim skalpelom (Surgical Disposable Scalpels, BRAUN, Aesculap AG & Co.Tuttlingen, Germany), a zatim, tupom disekcijom, desno i lijevo od kičmenog stuba, formirao dva džepa dubine od oko 1,5 cm. U ovako obrazovane džepove je sterilnom pincetom postavio sterilne polietilenske tubice, prethodno ispunjene svježe zamiješanim testiranim materijalima.

Nakon toga je uslijedilo šivenje rane. Primijenjen je pojedinačni čvorasti šav (igla za šivenje 6007L/R7, UNIMED S.A.,SWISS MADE) i neresorptivni najlonski konac. (No.USP6/0-2,Shandong Sinorgmed Co., Ltd China).



Slika 2. Pripremljeno operativno polje sa načinjenom incizijom



Slika 3. Implantiranje tubice sa ispitivanim materijalom u potkožno tkivo pacova

Postoperativno, životinje su bile smještene po jedna u kavezu u kontrolisanoj sredini, sa kontrolisanom ishranom i dnevnom profesionalnom njegom. Na smještanje po jednog pacova u kavezu postoperativno, je odlučeno iz mjera predostrožnosti, uzimajući u obzir činjenicu da su pacovi Wistar soja hanibali.

Kontrola zdravstvenog stanja je vršena tri puta dnevno u toku opservacionog perioda. Po 6 životinja, u svakom opservacionom periodu, je žrtvovano nakon 7, 15, i 30 dana. U tu svrhu smo upotrijebili intravensku injekciju Pentobarbitola (Pentobarbital sodium salt 100mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)



Slika 4. Polietilenska tubica u potkožnom tkivu pacova

Ispreparisano potkožno tkivo, zajedno sa tubicama, je potopljeno u 10% formalin i dostavljano laboratoriji Zavoda za patologiju, Kliničkog centra u Banjaluci.

#### 4.3.3.2. Histološka analiza

U laboratoriji je urađena obrada tkiva za histološku analizu. Za histološku analizu iz svake životinje je uzimano po 4 uzorka:

- tkivo oko cjevčice sa testiranim materijalom
- tkivo oko prazne cjevčice (negativna kontrola materijala)
- tkivo oko cjevčice sa MTA (pozitivna kontrola)
- tkivo oko prazne cjevčice (negativna kontrola MTA)

Nakon toga je izvršeno fiksiranje tivnih isječaka zajedno sa polietilenskim tubicama u 10% puferisanom formalinu.

Usljedilo je uklanjanje polietilenskih tubica i priprema tkiva za svjetlosnu mikroskopiju (dehidrataciju tkiva u seriji alkohola rastuće koncentracije; prosvetljavanje u ksilolu i kalupljenje u parafinu, te bojenje parafinskih isječaka (4 µm debljine) hematoksilin-eozinom (HE).



Slika 5.a) i b) Uzorci potkožnog tkiva sa polietilenskim tubicama

Analiza preparata je rađena na svetlosnom mikroskopu (Olympus BX-51, Japan), od strane iskusnog patologa, koji nije učestvovao u uzorkovanju materijala. Na taj način smo željeli da izbjegnemo bilo kakav vid pristrasnosti. Prema međunarodnim standardima (ISO 10993-6. Biological evaluation of medical devices-Part 6: Test for lokal effect after implantation) je procjenjivana lokalna reakcija u tkivu gde je prethodno bio implantiran materijal.

Parametri koji su analizirani su: zapaljenska reakcija, vaskularna kongestija, fibrozna kapsula i očuvanje integriteta vezivnog tkiva.

### ***Zapaljenska reakcija***

- 0 – bez zapaljenja (nema inflamatornih ćelija)
- 1 – minimalna (inflamatornih ćelija <25)
- 2 – blaga reakcija (26-50 inflamatornih ćelija)
- 3 – umerena reakcija (51-100 inflamatornih ćelija)
- 4 – izrazita reakcija (>100 inflamatornih ćelija)

### ***Vaskularna kongestija***

- 0 – odsutna
- 1 – minimalna
- 2 – blaga
- 3 – umerena

4 – izrazita, sa pucanjem krvnog suda

### ***Fibrozna kapsula***

0 – nema kapsule

1 – minimalna kapsula

2 – tanka kapsula

3 – umereno debela kapsula

4 – debela kapsula

### ***Očuvanje integriteta vezivnog tkiva***

0 – kompletno očuvanje

1 – minimalna narušenost strukture

2 – blaga narušenost strukture

3 – umjerena narušenost strukture

4 – nekroza

#### **4.3.4. Statistička obrada podataka**

Za statističku analizu dobijenih rezultata potkožne implantacije je korišten parametrijski Dunn's test koji je modifikacija Tukey's testa i koristi se kada imamo grupe podataka sa veoma sličnim vrijednostima i kada imamo malo vrijednosti u okviru jedne grupe, a pri tome imamo tri ili više parametara, te Vilkoksonov neparametrijski test za zavisne uzorke.

#### **4.4. ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI KALCIJUM ALUMINATNIH SISTEMA NAKON DIREKTNOG PREKRIVANJA PULPE**

U ovom dijelu eksperimenta, kao animalni model, takođe, su nam poslužili pacovi Wistar soja. Glavni razlog zbog koga smo se opredijelili za ove eksperimentalne životinje je sličnost između njihovih i ljudskih molara. Sem toga, oni ne mogu povraćati i stoga se koriste kao čest početni model za brojna ispitivanja toksičnosti i kancerogenosti stomatoloških materijala. Nadalje, pacovi imaju dobre reproduktivne sposobnosti i dobro se uzgajaju u laboratorijskim uslovima.

U studiju je uključeno 18 laboratorijskih pacova soja *Wistar*, tj. 36 prvih gornjih molara i 36 drugih gornjih molara. Studija je sprovedena u vivarijumu Prirodno-matematičkog fakulteta u Banjaluci (odobreno od strane Dekana Prirodno-matematičkog fakulteta), a nakon dobivanja saglasnosti Etičkog odbora Univerzitetskog kliničkog centra iz Banja Luke, broj 01-9-192.2/15, Bosna i Hercegovina.

##### **4.4.1. Uslovi eksperimenta**

Životinje su bile stare 10-11 sedmica i prosječne težine 190-280 g. Tokom eksperimenta, svim pacovima je bio obezbijeden slobodan pristup hrani i vodi, 12-to časovna smjena svjetla i mraka, temperatura vazduha se kretala 20-23°C, dok je vlažnost vazduha iznosila  $60\% \pm 10\%$ .

Prije same stomatološke procedure pacove smo anestezirali, uvođenjem u opštu anesteziju. Doza anestetika je određivana prema tjelesnoj težini pacova, koja je izmjerena za svakog pacova pojedinačno. Za anesteziranje pacova smo upotrijebili Ketamin u dozi od 50 mg/kg tjelesne težine (Ketamine Hydrochloride Injection USP) Rotexmedica-Germany.



Slika 7. Wistar pacov, prije uvođenja u anesteziju



Slika 8. Sterilna svrdla za tehnički mikromotor

#### 4.4.1.1. Eksperimentalne grupe

Pacovi su podijeljeni u dvije eksperimentalne grupe, označene kao **A i B**, po 9 pacova u svakoj grupi.

**U grupi A**, na otvorenu pulpu gornjih molara sa desne strane smo postavljali kalcijum aluminat (CA), a sa lijeve MTA.

**U grupi B**, na otvorenu pulpu gornjih molara sa desne strane je apliciran kalcijum silikat (CS), dok je sa lijeve strane u prvi gornji lijevi molar postavljen kalcijum silikat hidroksiapatit (HA-CS), a u drugi gornji lijevi molar MTA.

- 6 pacova, po 3 iz svake grupe je žrtvovano 7–og dana od direktnog prekrivanja pulpe (tri kod kojih je DPP urađeno sa kalcijum aluminatom sa desne strane i MTA sa lijeve strane i tri kod kojih je DPP urađeno sa kalcijum silikatom sa desne strane, a sa lijeve strane gornje vilice jedan molar prekriven sa CSHAP, a drugi sa MTA).
- 6 pacova, po 3 iz svake grupe je žrtvovano 15–og dana od direktnog prekrivanja pulpe (tri kod kojih je DPP urađeno sa kalcijum aluminatom sa desne strane i MTA sa lijeve strane i tri kod kojih je DPP urađeno sa kalcijum silikatom sa desne strane, a sa lijeve strane gornje vilice jedan molar prekriven sa CSHAP, a drugi sa MTA)
- preostalih 6 pacova, po 3 iz svake grupe je žrtvovano 30-og dana od direktnog prekrivanja pulpe.



Slika 9. Određivanje tjelesne težine pacova

#### 4.4.2. Terapijski postupak direktnog prekrivanje pulpe sa kalcijum aluminatom

Neposredno prije početka rada zubi su očišćeni od mekih naslaga mehanički malom četkicom, a potom dezinfikovani chlorhexidin digluconatom (0.1% Chlorhexamed-Fluid, GlaxoSmithK, Buhl, Germany). Zbog otežanog pristupa i smanjene vidljivosti molara pacova, koristili smo luku (magnification: X4.5, Zeiss, Germany). Pacovi imaju veoma specifično zubalo u anatomo-morfološkom smislu. Sprijeda su pozicionirani sjekutići, zatim velika dijastema, pa tri molara, postavljena daleko iza sjekutića, što je naš stomatološki rad učinilo zahtjevnijim i izazovnijim. Stoga smo u radu angažovali tim saradnika u koji je bio uključen iskusni veterinar, koji je anestezirao pacove i dao nam osnovne smjernice o najboljem pristupu zubima, oralni hirurg, endodont i dva asistenta koja su bila podijeljena u 2 grupe i vršila pripremu/miješanje ispitivanih materijala.

Nakon preparacije kaviteta na okluzalnoj površini nekarioznih prvih i drugih gornjih molara (i na lijevoj i na desnoj strani), je urađena trepanacija krova kavuma pulpe i postavljen jedan od testiranih materijala za direktno prekrivanje, po načinu prethodno opisanom. Kaviteti su restaurisani kompozitom (Tetric Ceram, Ivoclar Vivadent, Schaan Lichtenstein).



Slika 10. Trepanacija kavuma pulpe



Slika 11. Polimerizacija kompozita

Za preparaciju je korišten tehnički mikromotor i okruglo svrdlo ISO 008, naravno uz stalno vodeno hlađenje. Perforacija na krovu kavuma je urađena oštom stomatološkom sondom. Po pojavi krvarenja, pulpalnu krv smo uklonili sterilnim papirnim apoenima, a kavitet isprali fiziološkim rastvorom, kako bi uklonili eventualne ostatke krvi i dentinsku prašinu.

Nakon sprovedene preparacije kaviteta, kako je već ranije gore navedeno, aplicirano je sredstvo za direktno prekrivanje, a kaviteti restaurisani kompozitom.

#### 4.4.3. Žrtvovanje životinja

Životinje su žrtvovane intravenskom injekcijom pentobarbitola. Prema planu studije, žrtvovanje životinja je urađeno u tri navrata:

- 7-og dana: - 6 pacova po 3 iz svake grupe (tri kod kojih je DPP urađeno sa kalcijum aluminatom sa desne strane i MTT sa lijeve strane i tri kod kojih je DPP urađeno sa kalcijum silikatom sa desne strane, a sa lijeve strane kalcijum silikatom hidroksiapatitom u prvom, a mineraltrioksid agregatom na drugom molaru gornje vilice).
- 15 -og dana – 6 pacova, po 3 iz svake grupe (tri kod kojih je DPP urađeno sa kalcijum aluminatom sa desne strane i MTT sa lijeve strane i tri kod kojih je DPP urađeno sa kalcijum silikatom sa desne strane, a sa lijeve strane kalcijum silikatom hidroksiapatitom u prvom, a mineraltrioksid agregatom na drugom molaru gornje vilice).
- 30-og dana -preostalih 6 pacova, po 3 iz svake grupe.
- odvajanje gornjih vilica hirurškim skalpelom i makazama (dekapitulacija)
- njihovo pohranjivanje u 10% neutralnom puferovanom formalinu



Slika 12. Dekapitulacija

Uslijedilo je dostavljanje materijala laboratoriji Zavoda za patologiju, Kliničkog centra u Banjaluci i njegova priprema za patohistološku analizu.

#### 4.4.4. Patohistološka analiza

Priprema materijala je započela dekalcifikacijom viličnih kostiju u EDTA (etilen-diamino-tetraciklin-acetat) u trajanju od 3 sata, nakon čega su presjeci pulpe kalupljeni u parafinske blokove. Rezanje je vršeno mikrotomom (na svakih 4 µm).

Bojenje presjeka je urađeno metodom hematoksilin-eozin. Kvalitativna kvantifikacija mikroskopskih preparata je obavljena od strane patologa, koji nije zaposlenik laboratorije u kojoj je rađena priprema preparata za mikroskopiranje, kako bi rezultati bili bez bilo kakvog subjektivnog uticaja. U te svrhe, patolog je upotrijebio svjetlosni mikroskop.

Analizirano je:

1. odsustvo bakterija
2. prisustvo bakterija u 1/3 pulpe zuba
3. prisustvo bakterija u 2/3 pulpe zuba
4. difuzno prisustvo bakterija u pulpi

Nadalje, ocjenjivan je inflamatorni odgovor pulpe, upotrebom sljedeće skale:

1. odsustvo zapaljenja tj. nijedna ili nekoliko raštrkanih upalnih ćelija
2. prisustvo malog broja polimorfonuklearnih leukocita
3. prisustvo velikog broja polimorfonuklearnih leukocita
4. nekroza

Uzimano je u obzir i ***formiranje dentinskog mosta*** na kraju opservacionog perioda, kao jedan od mogućih pokazatelja uspješnosti terapije.

#### 4.4.5. Statistička analiza

Za statističku analizu dobijenih rezultata direktnog prekrivanja pulpe pacova *Wistar* soja je korišten neparametrijski Wilkoksonov test za zavisne uzorke.

## 5. REZULTATI

### 5.1. REZULTATI ISPITIVANJA CITOTOKSIČNOSTI KALCIJUM ALUMINATNIH SISTEMA PRIMJENOM MTT TESTA

Citotoksična aktivnost ispitivanih cemenata prema MRC-5 ćelijama (normalnim humanim fibroblastima pluća) je određena u uslovima *in vitro*, MTT testom.

Rezultati ispitivanja citotoksičnosti materijala su prikazani tabelama 1 i 2 kao i slikom 13.

Citotoksičnost eluata kalcijum aluminatnog cementa CA , kalcijum silikatnog cementa CS, kalcijum silikatnog hidroksiapatita CS-HA i mineraltrioksid agregata (MTA Angelus) je testirana u pet opadajućih koncentracija 66,7 mg/ml, 33,3 mg/ml, 16,7 mg/ml, 8,3 mg/ml i 4,2 mg/ml.

Tabela 1. Koncentracije ispitivanih cemenata koje indukuju pad u preživljavanju ( $IC_{50}$ )  
MRC-5 ćelija

	I	II	III	Av	$IC_{50}$ [mg/mL]	Sd
Kalcijum silikat hidroksiapatit	41,28	49,35	49,27	46,6	±	4,6
Mineraltrioksid agregat	>66,7	>66,7	>66,7	>66,7	±	
Kalcijum silikat	>66,7	>66,7	>66,7	>66,7	±	
Kalcijum aluminat	>66,7	>66,7	>66,7	>66,7	±	

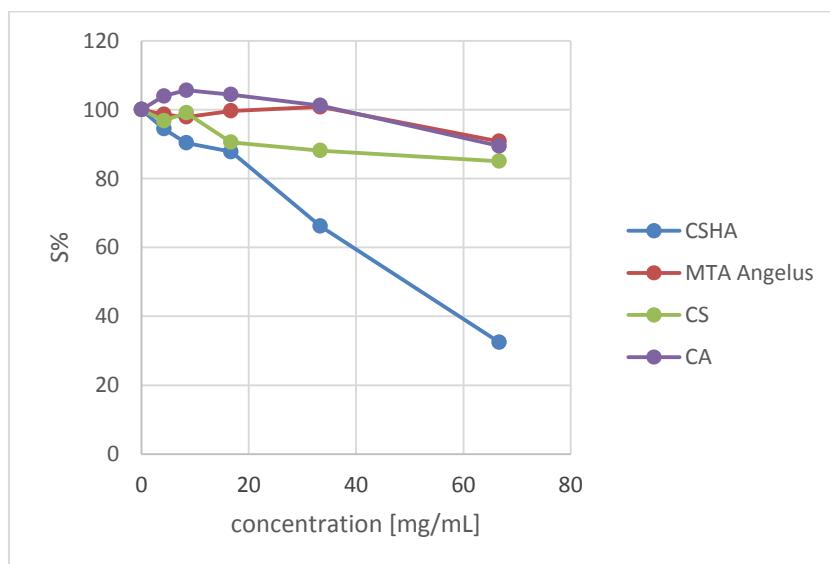
Sve testirane koncentracije kalcijum aluminata CA, kalcijum silikata CS i mineraltrioksid agregata MTA su rezultirale visokim preživljavanjem ćelija u kulturi. Najsnažnije citotoksično dejstvo je ispoljio CS-HA sa  $IC_{50}=41,28$  nakon prvog ciklusa testiranja;  $IC_{50}=49,35$  nakon drugog ciklusa; odnosno  $IC_{50}=49,27$  nakon trećeg ponavljanja MTT testa.

Tabela 2. Preživljavanje MRC-5 ćelija poslije 72 h kontinuiranog djelovanja eluata ispitivanih cemenata.

c [mg/mL]	Kalcijum siliikat hidroksiapatit	MTA Angelus	Kalcijum silikat	Kalcijum aluminat
0,0	100,0	100,0	100,0	100,0
4,2	94,4	98,6	96,8	103,9
8,3	90,3	97,9	99,1	105,6
16,7	87,8	99,6	90,6	104,4
33,3	66,2	100,8	88,1	101,2
66,7	32,5	90,8	85,1	89,5

Kalcijum aluminat CA, kalcijum silikat CS i MTA nisu ispoljili citotoksične efekte, te je konstatovan veoma visok procenat preživljavanja ćelija i pri najvećoj primjenjenoj koncentraciji ovih materijala (66,7 mg/mL): za CA 89,5 %, za CS 85,1%, a za MTA 90,8 %. (tabela 2, slika 13)

U skladu sa očekivanjima, utvrđena je zavisnost citotoksičnog efekta CS-HA od primijenjene koncentracije ovog materijala. Najveći procenat preživljavanja ćelija (94,4%) je konstatovan pri najmanjoj primjenjenoj koncentraciji materijala (4,2 mg/mL), dok je najmanji procenat preživljavanja ćelija (32,5 %) konstatovan pri najvećoj primjenjenoj koncentraciji ovog cementa (66,7 mg/mL).



Slika 13. Preživljavanje MRC-5 ćelija poslije 72h kontinuiranog djelovanja eluata ispitivanih cemenata.

## 5.2 REZULTATI ISPITIVANJA GENOTOKSIČNOSTI KALCIJUM ALUMINATNIH SISTEMA PRIMJENOM KOMET TESTA

Primjenom alkalne verzije Komet testa na ćelijskoj liniji MRC-5 (normalnim humanim fibroblastima pluća) ispitivan je genotoksični potencijal kalcijum aluminatnog cementa CA i kalcijum silikat hidroksiapatita CS-HA, materijala koji je jedini ispoljio citotoksičnu aktivnost prilikom prethodno urađenog MTT testa za procjenu potencijalne citotoksičnosti materijala.

Rezultati su prikazani na tabeli 3 i slici 14.

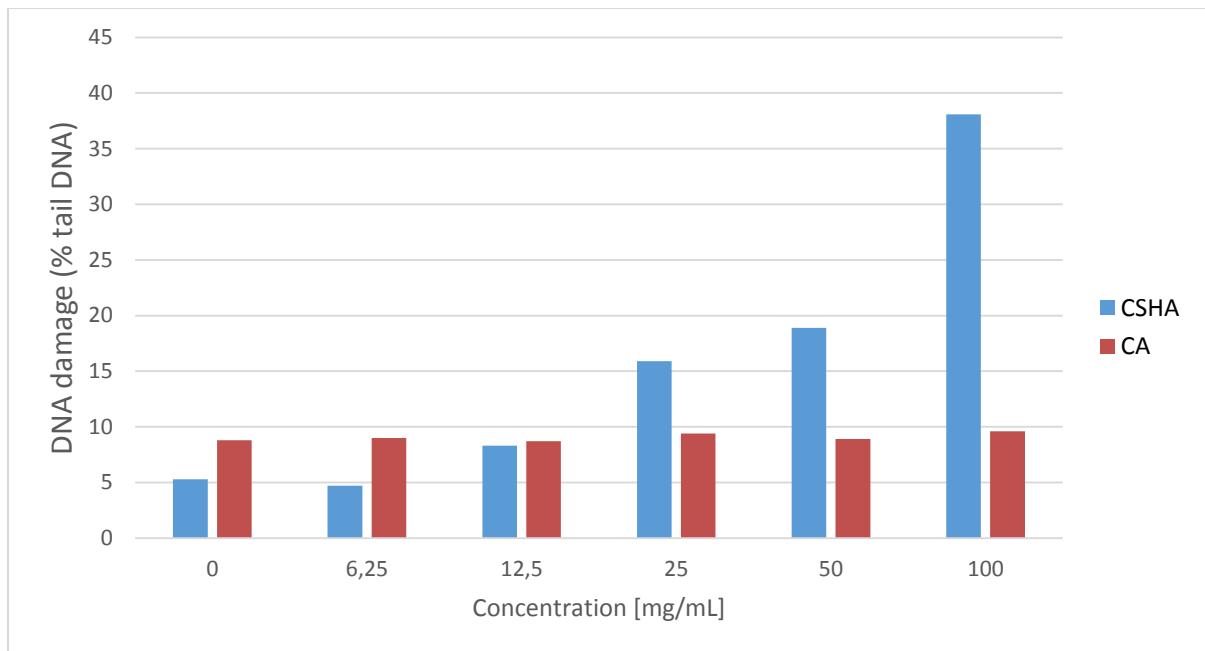
Tabela 3. DNK oštećenje (% DNK u repu komete)

C(mg/mL)	CS-HA	CA
0	5,3	8,8
6,25	4,7	9
12,5	8,3	8,7
25	15,9	9,4
50	18,9	8,9
100	38,1	9,6

Ekstrakt kalcijum aluminatnog cementa CA nije ispoljio genotoksični efekat, to jest, procenat oštećenja DNK i pri najvećoj primjenjenoj koncentraciji cementa je iznosio 9,6 % i ostao na nivou netretiranih kontrolnih ćelija.

Ekstrakt kalcijum silikatnog hidroksiapatitnog cementa CS-HA je pokazao genotoksični potencijal pri koncentracijama  $\geq 12,5 \text{ mg/mL}$  (tabela 3,slika 14.)

Kod kalcijum silikatnog hidroksiapatita CS-HA najveći procenat DNK oštećenja od 38,1 % je zabilježen pri najvećoj primjenjenoj koncentraciji materijala (100 mg/mL), dok je najmanji procenat DNK oštećenja od 4,7 % konstatovan pri koncentraciji CS-HA od 6,25 mg/mL. (tabela 3,slika 14).



Slika 14. Procenat DNK oštećenja (% DNK u repu komete) u zavisnosti od primijenjene koncentracije materijala

### **5.3. REZULTATI ISPITIVANJA POTKOŽNE IMPLANTACIJE POLIETILENSKIH TUBICA KOD PACOVA WISTAR SOJA**

U ovom dijelu su prikazani rezultati ispitivanja potkožne implantacije polietilenskih tubica ispunjenih nanostrukturnim biomaterijalima na bazi kalcijum aluminata i kalcijum silikat hidroksiapatita. MTA je služio kao pozitivna kontrola, a prazne polovine cjevčica su predstavljale negativnu kontrolu.

Istraživanje je sprovedeno nakon odobrenja Etičkog odbora Univerzitetskog kliničkog centra iz Banja Luke, broj 01-9-192.2/15, Bosna i Hercegovina.

Potkožni implantati su rađeni kod 18 pacova soja Wistar starosti 10-11 sedmica i prosječne težine 190-280 g.

Postoperativni tok kod svih životinja je protekao bez komplikacija, propraćen urednim zarastanjem rana.

Po završetku svakog od tri evaluaciona perioda (7,15,30 dana), za patohistološku analizu je bilo dostupno po 6 pacova, koliko je bilo i predviđeno dizajnom studije.

Parametri koji su uzimani u razmatranje prilikom patohistološke analize bili su: zapaljenska reakcija, vaskularna kongestija, prisustvo kapsule i očuvanje integriteta vezivnog tkiva.

Rezultati potkožne implantacije su prikazani u tabelama 4-9 i slikama 15-30.

### 5.3.1 Rezultati histološke analize nakon 7 dana

Rezultati su prikazani tabelama 4 i 5 i slikama 15-18.

Tabela 4. Rezultati histološke analize u opservacionom periodu od 7 dana

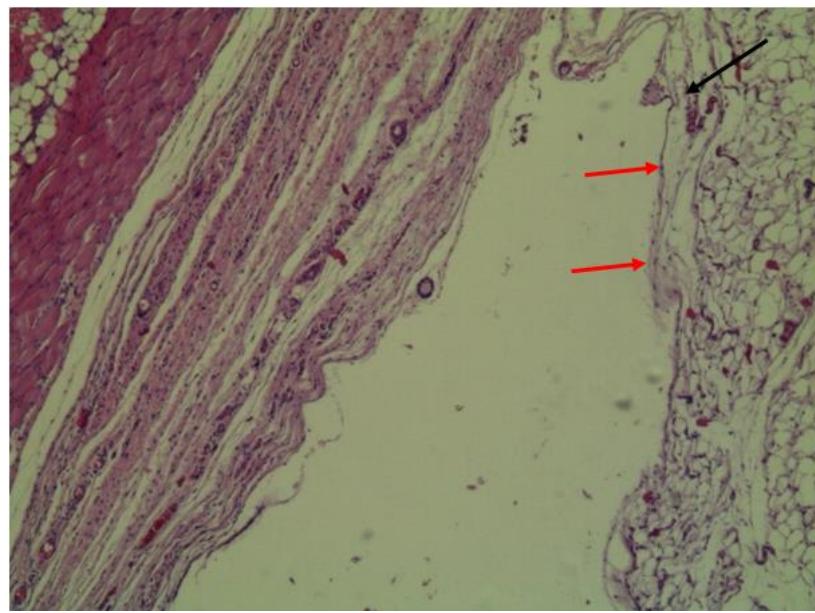
REAKCIJA	Kalcijum aluminat	Kalcijum silikat hidroksipatit	MTA
Zapaljenska reakcija			
0 - odsutna 1 - minimalno < 25 ćelija 2 - blaga 26 - 50 ćelija 3 - umerena 51 - 100 ćelija 4 - izrazita > 100 ćelija	3	3	3,7
Vaskularna kongestija			
0 - odsutno 1 - minimalno 2 - blaga 3 - umerena 4 - izrazita, sa pucanjem krvnog suda	3	3,3	3,7
Kapsula			
0 - odsutna 1 - minimalna 2 - tanka 3 - umereno debela 4 - debela	1	0,7	0,3
Očuvanje integriteta vezivnog tkiva			
0 - kompletno 1 - minimalna narušenost strukture 2 - blaga narušenost strukture 3 - umerena narušenost strukture 4 - nekroza	3	3	3

Patohistološkom analizom poslije 7 dana je kod kalcijum aluminata CA i kalcijum silikat hidroksipatita CSHA zabilježena umjerena inflamatorna reakcija (ocjena 3), dok je kod MTA zabilježena umjerena do izražena inflamatorna reakcija (ocjena 3,7) sa statistički značajnom razlikom između CA i MTA ( $p=0,2781$ ), kao i između CA i CS ( $p=0,2781$ ). Umjerena inflamacija je bila praćena i umjerenom vaskularnom kongestijom kod materijala CA (ocjena 3) i materijala CSHA (ocjena 3,3). Nakon implantacije MTA je uočena umjerena do izražena vaskularna kongestija (ocjena 3,7). Kod svih ispitivanih materijala je registrovana umjerena narušenost strukture vezivnog tkiva, dok je fibrozna kapsula nakon implantacije materijala CA bila minimalna (ocjena 1). Minimalna (ocjena 0,7) ili odsutna (ocjena 0,3) je registrovana nakon implantacije materijala CSHA i MTA (slike 15-17). Razlika u vaskularnoj kongestiji i debljini fibrozne kapsule nakon implantacije materijala CA u odnosu na MTA je bila statistički značajna ( $p=0,5567$ ).

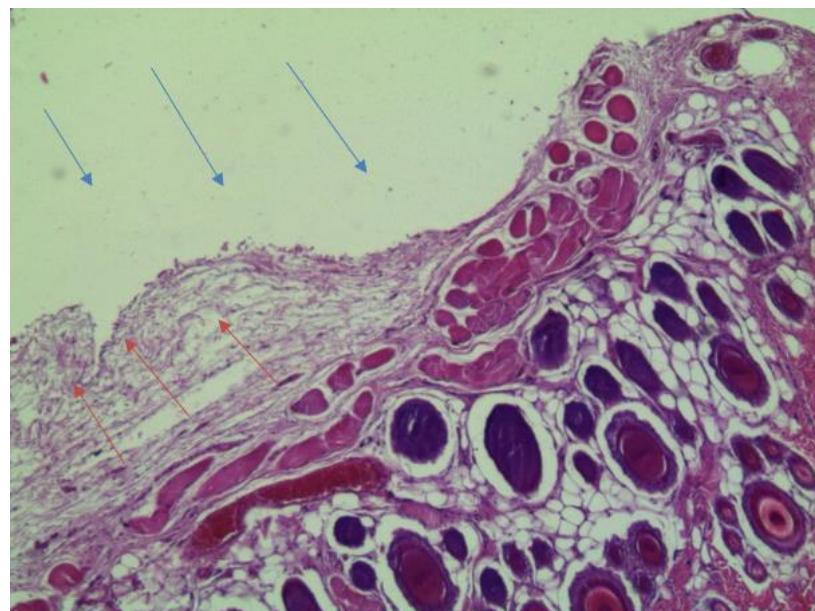
Tabela 5. Rezultati histološke analize za kontrolne uzorke u opservacionom periodu od 7 dana.

REAKCIJA	KONTROLA		
	Kalcijum aluminat	Kalcijum silikat hidroksipatit	MTA
Zapaljenska reakcija			
0 - odsutna			
1 - minimalno < 25 ćelija			
2 - blaga 26 - 50 ćelija	3	3,3	3,3
3 - umerena 51 - 100 ćelija			
4 - izrazita > 100 ćelija			
Vaskularna kongestija			
0 - odsutno			
1 - minimalno			
2 - blaga	3,3	3,3	3,5
3 - umerena			
4 - izrazita, sa pucanjem krvnog suda			
Kapsula			
0 - odsutna			
1 - minimalna			
2 - tanka	0	0,7	0,2
3 - umereno debela			
4 - debela			
Očuvanje integriteta vezivnog tkiva			
0 - kompletno			
1 - minimalna narušenost strukture			
2 - blaga narušenost strukture	3	3	2,8
3 - umerena narušenost strukture			
4 - nekroza			

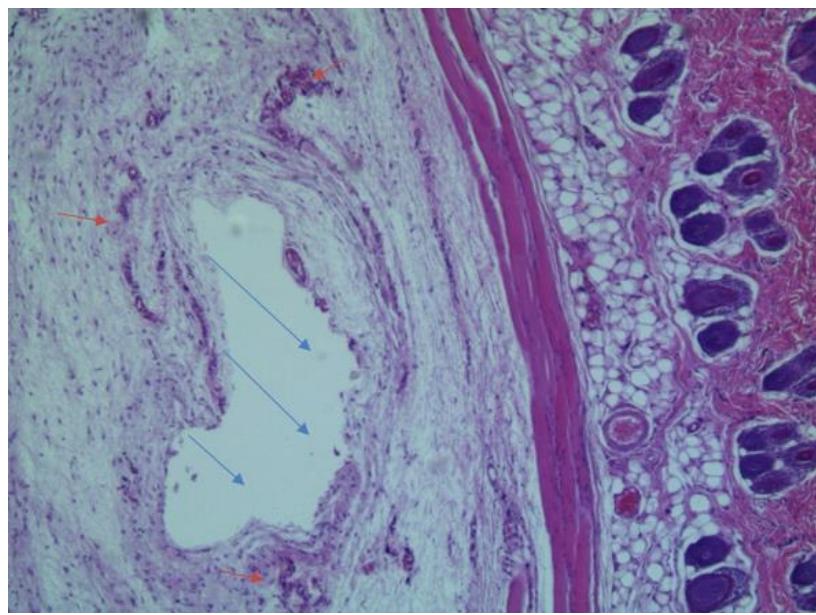
Kod kontrolnih preparata, 7 dana nakon potkožne implantacije je konstatovano prisustvo zapaljenske reakcije umjerenog intenziteta, te po jedan slučaj izražene inflamatorne reakcije (kontrole materijala CA i MTA). Krvni sudovi su pokazivali znake umjerene vaskularne kongestije, koja je bila nešto izraženija kod kontrole MTA. Kod svih kontrolnih preparata je uočena umjereni narušenost strukture vezivnog tkiva, izuzev jednog slučaja (MTA) sa blagom narušenosti strukture vezivnog tkiva (ocjena 2). Fibrozna kapsula je bila odsutna kod svih preparata kontrole CA, te kod većine preparata kontrole MTA, izuzev u jednom slučaju. Kod kontrole materijala CSHA je zabilježena nježna tanka kapsula u 2 slučaja (ocjena 1), te potpuno odsustvo kapsule u 1 uzorku (ocjena 0). (slika 18)



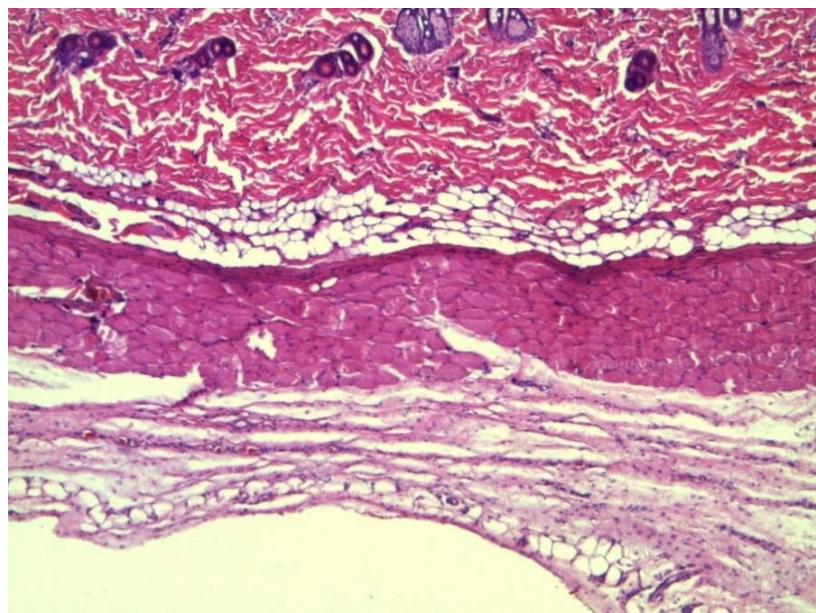
Slika 15. Materijal CA u eksperimentalnom periodu od 7 dana. Na mikrofotografiji se uočava defekt (od cjevčice) sa veoma tankom kapsulom i umjerenom vaskularnom kongestijom (venska kongestija-crne strelice, kapsula-crvene strelice) (HE, x100)



Slika 16. Materijal CS-HA u eksperimentalnom periodu od 7 dana. Na mikrofotografiji fibrozna kapsula nije prisutna, vidljiv dio defekta od cjevčice u dermisu bez prisustva krvnih sudova i upalnog infiltrata u koži uz defekt (defekt od cjevčice-plave strelice, koža uz defekt od cjevčice-crvene strelice) (HE, x200)



Slika 17. Materijal MTA u eksperimentalnom periodu od 7 dana. Na mikrofotografiji se uočava defekt (od cjevčice) bez prisutne vezivne kapsule, sa rijetkim kapilarnim krvnim sudovima i pojedinačnim upalnim ćelijama u koži uz defekt od cjevčice (defekt od cjevčice- plave strelice, kapilarni krvni sudovi u koži uz defekt od cjevčice- crvene strelice) (HE, x100).



Slika 18. Negativna kontrola (prazna cjevčica) u eksperimentalnom periodu od 7 dana obavijena veoma tankom kapsulom (HEx200).

### 5.3.2. Rezultati histološke analize nakon 15 dana

Rezultati su prikazani tabelama 6 i 7 i slikama 19-22.

Tabela 6. Rezultati histološke analize u opservacionom periodu od 15 dana

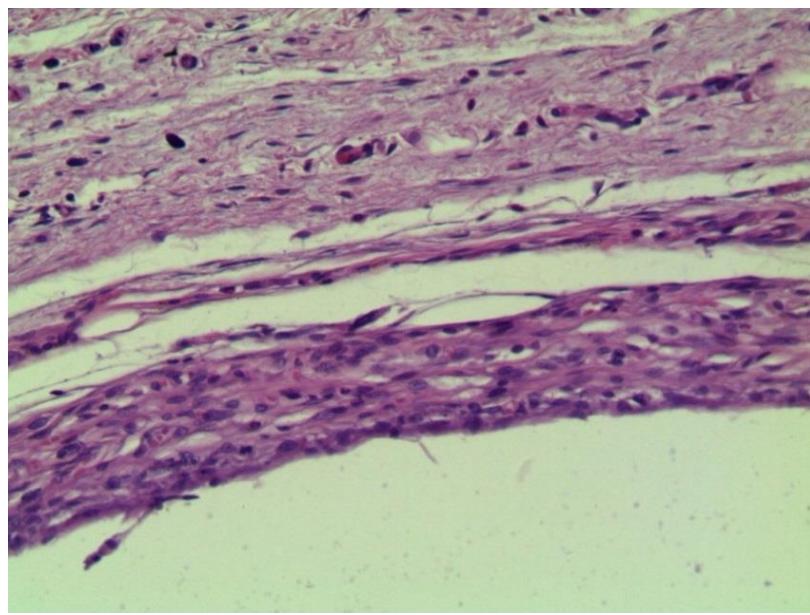
REAKCIJA	Kalcijum aluminat	Kalcijum silikat hidroksiapitit	MTA
<b>Zapaljenska reakcija</b>			
0 - odsutna 1 - minimalno < 25 ćelija 2 - blaga 26 - 50 ćelija 3 - umerena 51 - 100 ćelija 4 - izrazita > 100 ćelija	2	2	2
<b>Vaskularna kongestija</b>			
0 - odsutno 1 - minimalno 2 - blaga 3 - umerena 4 - izrazita, sa pucanjem krvnog suda	2	2,7	2,7
<b>Kapsula</b>			
0 - odsutna 1 - minimalna 2 - tanka 3 - umereno debela 4 - debela	2,3	2,3	2,2
<b>Očuvanje integriteta vezivnog tkiva</b>			
0 - kompletno 1 - minimalna narušenost strukture 2 - blaga narušenost strukture 3 - umerena narušenost strukture 4 - nekroza	2	2	2

Patohistološkom analizom poslije 15 dana na mjestu implantacije svih ispitivanih materijala je uočena blaga zapaljenska reakcija, tanka ili umjereno debela fibrozna kapsula (slike 19-21) i blaga narušenost strukture vezivnog tkiva (ocjena 2). Vaskularna kongestija je okarakterisana kao blaga (ocjena 2) kod materijala CA, odnosno kao umjerena ili blaga za CSHA i MTA, sa statistički značajnom razlikom između CA i CSHA ( $p=0,2974$ ) kao i između CA i MTA ( $p=0,2974$ ).

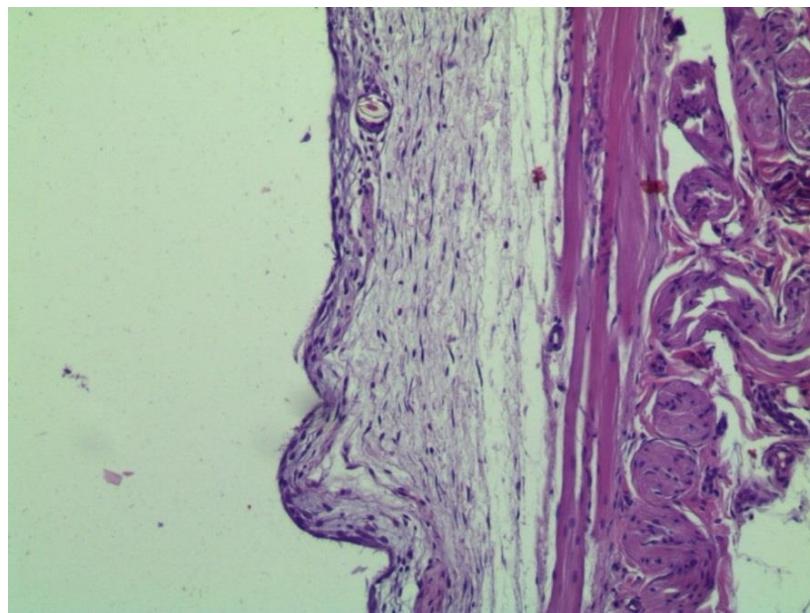
Tabela 7. Rezultati histološke analize za kontrolne uzorke u opservacionom periodu od 15 dana.

REAKCIJA	KONTROLA		
	Kalcijum aluminat	Kalcijum silikat hidroksiapatit	MTA
Zapaljenska reakcija			
0 - odsutna 1 - minimalno < 25 ćelija 2 - blaga 26 - 50 ćelija 3 - umjerena 51 - 100 ćelija 4 - izrazita > 100 ćelija	3	2	2,3
Vaskularna kongestija			
0 - odsutno 1 - minimalno 2 - blaga 3 - umjerena 4 - izrazita, sa pucanjem krvnog suda	2,7	2,3	2,3
Kapsula			
0 - odsutna 1 - minimalna 2 - tanka 3 - umereno debela 4 - debela	2	2	2
Očuvanje integriteta vezivnog tkiva			
0 - kompletno 1 - minimalna narušenost strukture 2 - blaga narušenost strukture 3 - umjerena narušenost strukture 4 - nekroza	2	2	2

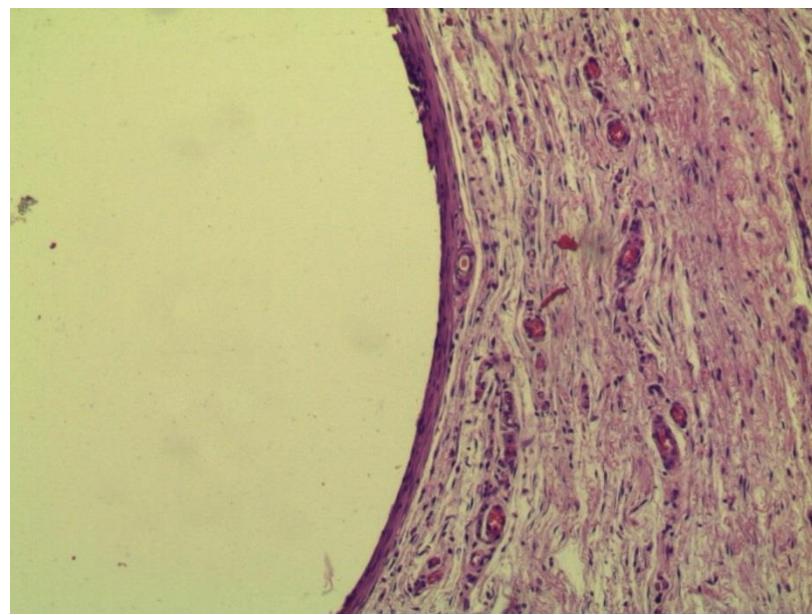
Kod kontrolnih preparata nakon 15 dana, najslabiji inflamatorni odgovor je zabilježen kod kontrole CSHA (ocjena 2), dok su kontrolni preparati za CA ocijenjeni ocjenom 3 (umerena zapaljenska reakcija), a za MTA ocjenom 2,3 (blaga do umjerena zapaljenska reakcija). Kod svih kontrolnih preparata konstatovana je blaga narušenost strukture rastresitog vezivnog tkiva (ocjena 2), koju je pratilo obrazovanje tanke fibrozne kapsule (ocjena 2). Vaskularna kongestija je bila podjednako izražena kod kontrole CSHA i MTA (ocjena 2,3), dok je kod kontrole CA ocijenjena ocjenom 2,7.(slika 22).



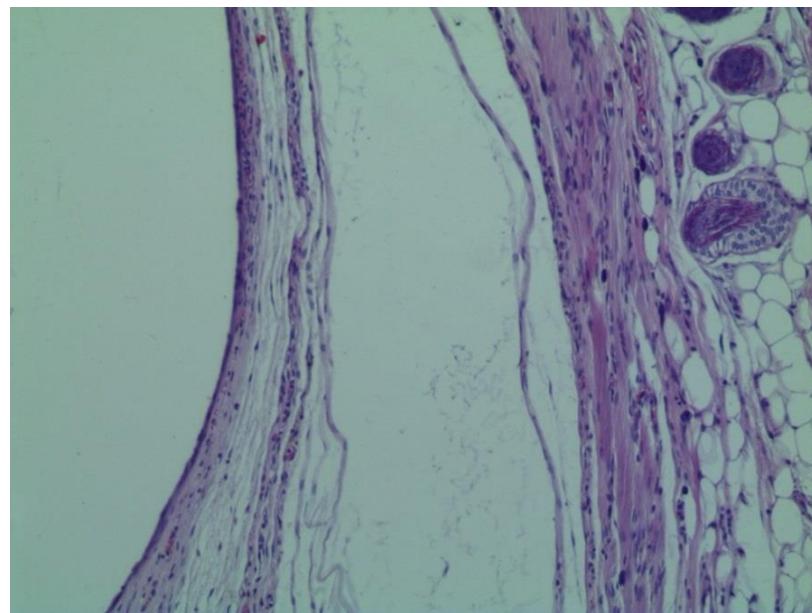
Slika 19. Materijal CA u eksperimentalnom periodu od 15 dana. Na mikrofotografiji se uočava umjereno debela kapsula i blaga vaskularna kongestija i blaga inflamacija (HE x400).



Slika 20. Materijal CS-HA u eksperimentalnom periodu od 15 dana. Na mikrofotografiji se uočava tanka kapsula i blaga zapaljenska reakcija. Prisutni su limfociti i rijetki plazmociti, što govori u prilog hroničnoj zapaljenskoj reakciji.(HE x200)



Slika 21. Materijal MTA u eksperimentalnom periodu od 15 dana. Na mikrofotografiji se uočava umjereno debela kapsula i umjerena vaskularna kongestija (HE x200).



Slika 22. Negativna kontrola (prazna cjevčica) u eksperimentalnom periodu od 15 dana. Na mikrofotografiji se uočava tanka kapsula i blaga vaskularna kongestija i blaga inflamacija (HE x200).

### 5.3.3. Rezultati histološke analize nakon 30 dana

Rezultati su prikazani tabelama 8 i 9 i slikama 23-30.

Tabela 8. Rezultati histološke analize u opservacionom periodu od 30 dana

REAKCIJA	Kalcijum aluminat	Kalcijum silikat hidroksipatit	MTA
Zapaljenska reakcija			
0 - odsutna 1 - minimalno < 25 ćelija 2 - blaga 26 - 50 ćelija 3 - umerena 51 - 100 ćelija 4 - izrazita > 100 ćelija	0,7	0,7	1
Vaskularna kongestija			
0 - odsutno 1 - minimalno 2 - blaga 3 - umerena 4 - izrazita, sa pucanjem krvnog suda	0,7	0,7	0,8
Kapsula			
0 - odsutna 1 - minimalna 2 - tanka 3 - umereno debela 4 - debela	4	3,3	3,5
Očuvanje integriteta vezivnog tkiva			
0 - kompletno 1 - minimalna narušenost strukture 2 - blaga narušenost strukture 3 - umerena narušenost strukture 4 - nekroza	1	0,7	0,7

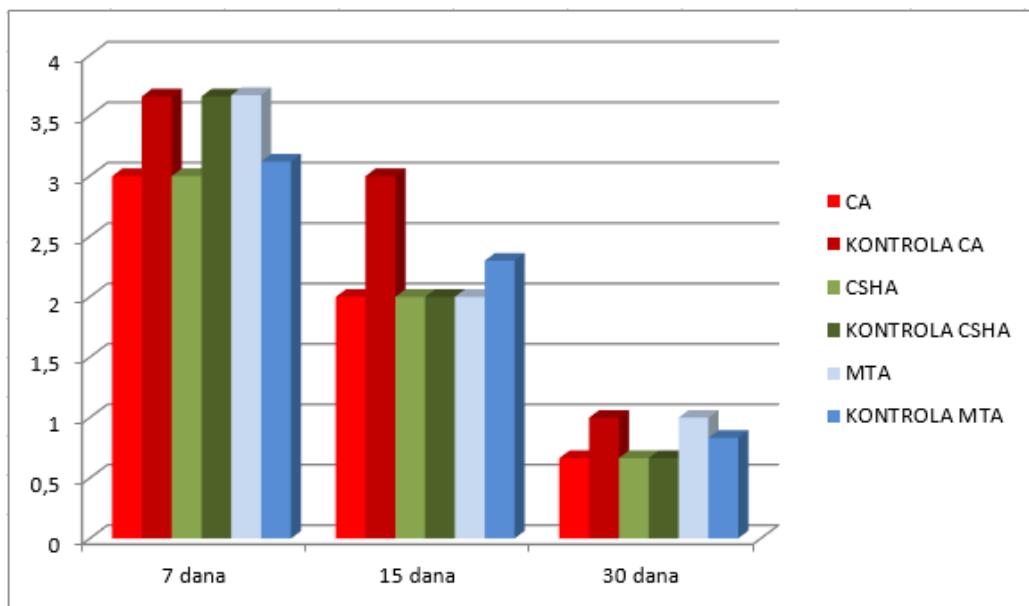
Na kraju evaluacionog perioda od 30 dana dobijen je identičan inflamatorni odgovor rastresitog vezivnog tkiva na mjestu implantacije CA i CSHA (ocjena 0,7), dok je na mjestu implantacije MTA registrovana minimalna zapaljenska reakcija (ocjena 1). Konstatovano je formiranje debele ili umjereno debele fibrozne kapsule (slike), koja je bila najdeblja kod CA (ocjena 4). Na mjestu implantacije CA je registrovana minimalna narušenost strukture vezivnog tkiva (ocjena 1), dok je ista bila minimalna ili odsutna na mjestu implantacije CSHA i MTA (ocjena 0,7) Statistički značajne razlike između analiziranih parametara nije bilo.

Tabela 9. Rezultati histološke analize za kontrolne uzorke u opservacionom periodu od 30 dana.

REAKCIJA	KONTROLA		
	Kalcijum aluminat	Kalcijum silikat hidroksiapatit	MTA
Zapaljenska reakcija			
0 - odsutna 1 - minimalno < 25 ćelija 2 - blaga 26 - 50 ćelija 3 - umerena 51 - 100 ćelija 4 - izrazita > 100 ćelija	1	0,7	0,7
Vaskularna kongestija			
0 - odsutno 1 - minimalno 2 - blaga 3 - umerena 4 - izrazita, sa pucanjem krvnog suda	1	0,7	0,7
Kapsula			
0 - odsutna 1 - minimalna 2 - tanka 3 - umereno debela 4 - debela	3	3	3,2
Očuvanje integriteta vezivnog tkiva			
0 - kompletno 1 - minimalna narušenost strukture 2 - blaga narušenost strukture 3 - umerena narušenost strukture 4 - nekroza	1	0,7	0,7

Kod kontrolnih preparata nakon 30 dana, slabiji inflamatorni odgovor, manja vaskularna kongestija i bolji integrutet veziva su uočeni kod kontrolnih uzoraka CSHA i MTA (ocjena 0,7), u odnosu na kontrolu CA (ocjena 1). Formirana je umjereno debela ili debela fibrozna kapsula (slika), najdeblja kod kontrole materijala MTA (ocjena 3,2), dok je kod kontrole CA i CSHA ocijenjena ocjenom 3.

Grafikonima 23-26 je prikazana statistička analiza ispitivanih parametara (zapaljenska reakcija, vaskularna kongestija, fibrozna kapsula, očuvanje integriteta vezivnog tkiva) između materijala CA, CSHA i MTA i njihovih kontrola.



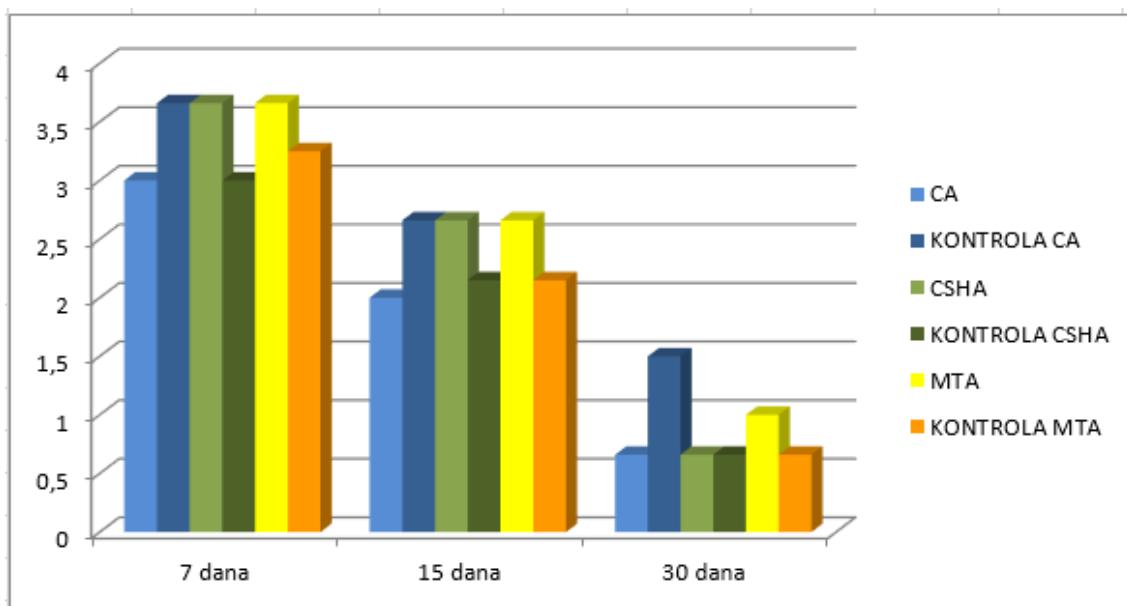
Slika 23.Grafički prikaz zapaljenske reakcije ispitivanih materijala u odnosu na kontrolu

Grafikon jasno prikazuje da je zapaljenska reakcija i kod ispitivanih materijala i njihovih kontrola bila najizraženija nakon 7 dana, dok nakon 15 dana i nakon 30 dana dolazi do pada u intenzitetu zapaljenske reakcije.

Analizom dobijenih rezultata ,7 dana nakon potkožne implantacije, je zabilježena najveća razlika u zapaljenskoj reakciji između ispitivanih materijala i njihovih kontrola. Izraženija zapaljenska reakcija je uočena kod kontrolnih uzoraka u odnosu na CA, kao i kod kontrole u odnosu na CSHA, sa statistički značajnom razlikom ( $p=0,2781$ ). Sa druge strane, MTA je u prvih 7 dana implantacije pokazao veću zapaljensku reakciju u odnosu na kontrolu, uz statistički značajnu razliku ( $p=0,2781$ ). (slika 23)

U drugom opservacionom periodu, 15 dana nakon potkožne implantacije, izraženija zapaljenska reakcija je registrovana jedino kod kontrolnih uzoraka u odnosu na CA. Razlika je bila statistički značajna ( $p=0,5656$ ).

Nakon 30 dana nije bilo statistički značajne razlike u dobijenim vrijednostima zapaljenske reakcije ispitivanih materijala i njihovih kontrola.



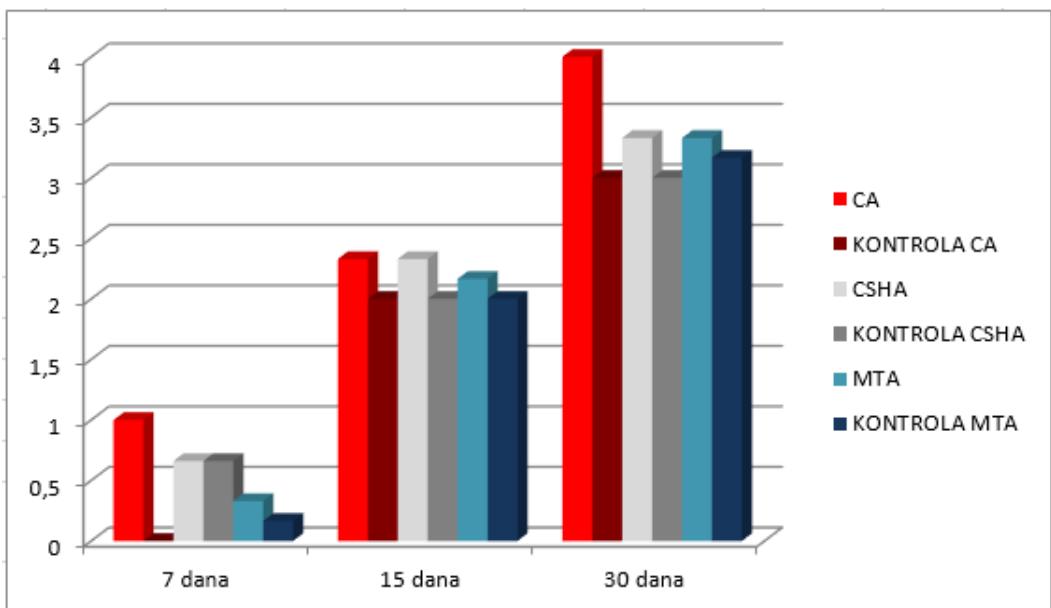
Slika 24. Grafički prikaz vaskularne kongestije ispitivanih materijala u odnosu na kontrolu

Grafikon jasno prikazuje da je vaskularna kongestija i kod ispitivanih materijala i njihovih kontrola najizraženija nakon 7 dana, smanjuje se nakon 15 dana, a nakon 30 je minimalna ili odsutna.

Analizom dobijenih rezultata ,7 dana nakon potkožne implantacije je uočena izraženija vaskularna kongestija kod kontrolnih uzoraka u odnosu na CA ( $p=0,5656$ ). Sa druge strane, vaskularna kongestija je bila izraženija kod CSHA u odnosu na kontrolu ( $p=0,3333$ ), kao i kod MTA u odnosu na njegovu kontrolu ( $p=0,3434$ ).

U drugom opservacionom periodu, 15 dana nakon potkožne implantacije rezultati vaskularne kongestije su bili slični onima nakon 7 dana. Registrovana je izraženija vaskularna kongestija kod kontrole u odnosu na CA, sa statistički značajnom razlikom ( $p=0,1888$ ). Vaskularna kongestija je bila izraženija kod CSHA u odnosu na kontrolu sa statistički značajnom razlikom ( $p=0,1184$ ), kao i kod MTA u odnosu na kontrolu ( $p=0,1888$ ).

Nakon 30 dana razlika u vaskularnoj kongestiji je bila statistički značajna jedino kod CA u odnosu na njegovu kontrolu ( $p=0,1185$ ). I u ovom slučaju izraženija vaskularna kongestija je zabilježena kod kontrole CA.



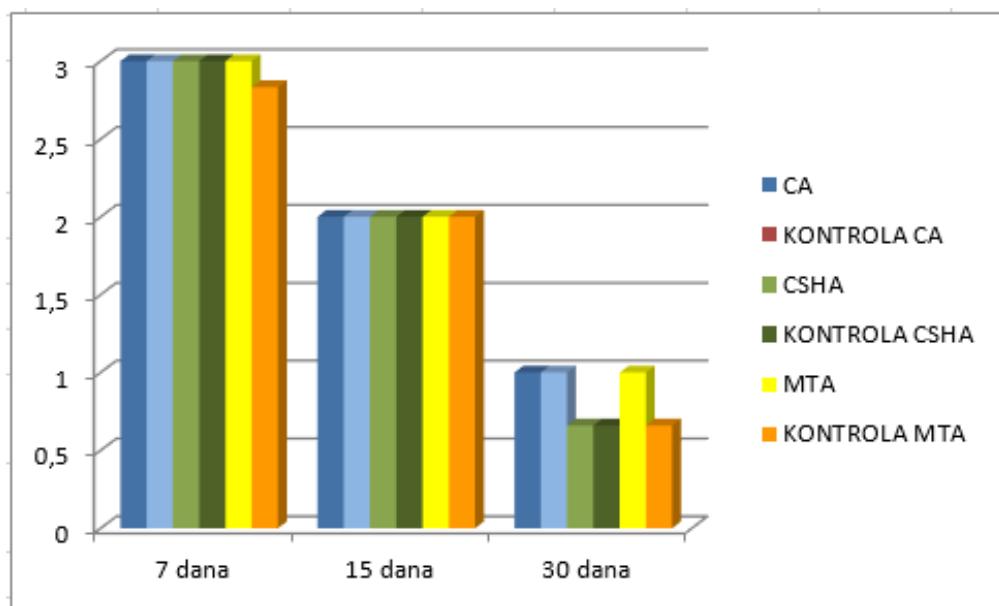
Slika 25. Grafički prikaz debljine fibrozne kapsule ispitivanih materijala u odnosu na kontrolu

Grafikon jasno prikazuje da je kod ispitivanih materijala i njihovih kontrola zabilježeno povećanje debljine fibrozne kapsule u funkciji vremena. Najtanja je bila nakon 7 dana.

Analiza dobijenih rezultata za fibroznu kapsulu, nakon 7 dana, je ukazala na deblju fibroznu kapsulu kod CA u odnosu na kontrolu sa statistički značajnom razlikom ( $p=0,5567$ ), kao i kod MTA u odnosu na kontrolu, takođe, sa statistički značajnom razlikom ( $p=0,1183$ ). Nije bilo statistički značajne razlike između CSHA i njegove kontrole u debljini fibrozne kapsule u ovom opservacionom periodu.

Nakon 15 dana razlika u debljini fibrozne kapsule je bila statistički značajna jedino kod CA u odnosu na kontrolu ( $p=0,2222$ ).

Nakon 30 dana rezultat je sličan, pa je razlika u debljini fibrozne kapsule takođe bila statistički značajna jedino kod CA u odnosu na kontrolu ( $p=0,3333$ ). I poslije 15 i poslije 30 dana deblja fibroznna kapsula je registrovana kod materijala CA.



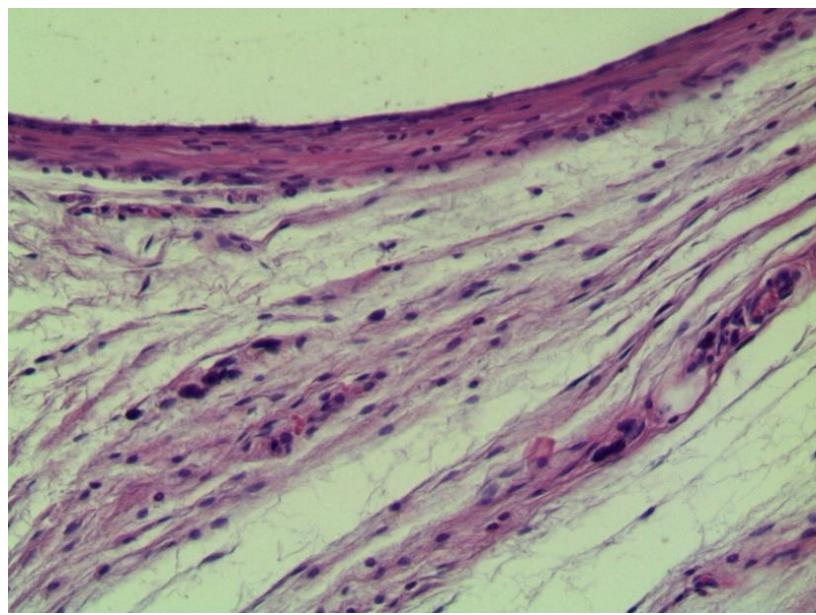
Slika 26. Grafički prikaz očuvanja integriteta vezivnog tkiva ispitivanih materijala u odnosu na kontrolu

Grafikon jasno prikazuje da je kod ispitivanih materijala i njihovih kontrola najveća narušenost strukture veziva zabilježena u prvih 7 dana, da se smanjivala nakon 15 dana, a da je nakon 30 dana zabilježena njena minimalna narušenost strukture ili kompletno očuvanje.

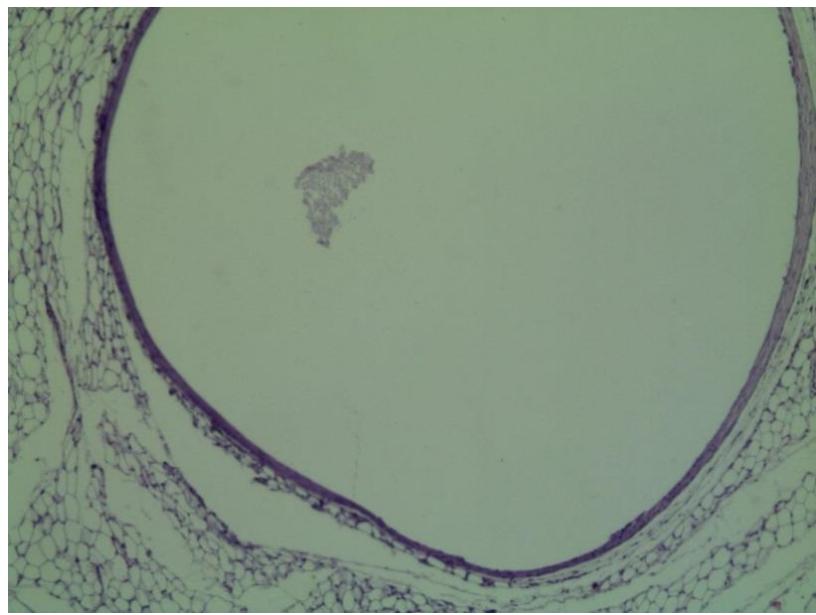
Analiza dobijenih rezultata očuvanja integriteta vezivnog tkiva nakon 7 dana je ukazala na statistički značajnu razliku jedino kod materijala MTA u odnosu na kontrolu ( $p=0,0888$ ). Bolja očuvanost strukture veziva je konstatovana kod MTA.

Nakon 15 dana nije bilo statistički značajne razlike u očuvanja integriteta vezivnog tkiva između ispitivanih materijala i njihovih kontrola.

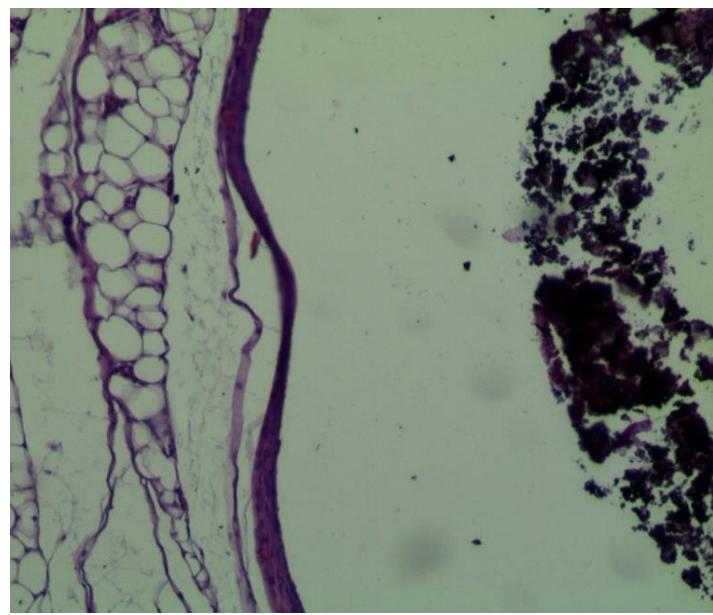
Nakon 30 dana, bolji integritet veziva u odnosu na kontrolu je registrovan samo kod MTA. Utvrđena je i statistički značajna razlika ( $p=0,0888$ ).



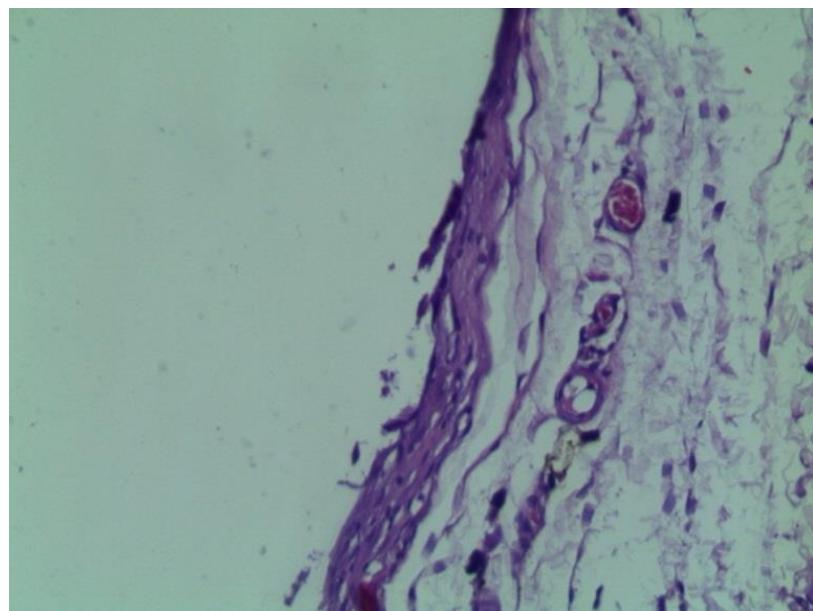
Slika 27. Materijal CA u eksperimentalnom periodu od 30 dana. Na mikrofotografiji se uočava debela kapsula i blaga vaskularna kongestija i blaga inflamacija (HE x400).



Slika 28. Materijal CS-HA u eksperimentalnom periodu od 30 dana. Na mikrofotografiji se uočava implantacija u supkutanom masnom tkivu okružena debelom kapsulom bez inflamatornog odgovora i kongestija (HEx200).



Slika 29. Materijal MTA u eksperimentalnom periodu od 30 dana. Na mikrofotografiji se uočava umjereno debela kapsula, minimalna vaskularna kongestija bez inflamatornog odgovora (HEx200).



Slika 30. Negativna kontrola (prazna cjevčica) u eksperimentalnom periodu od 30 dana. Na mikrofotografiji se uočava debela kapsula i blaga vaskularna kongestija i blaga inflamacija (HE x400).

#### 5.4. REZULTATI DIREKTNOG PREKRIVANJA PULPE PACOVA

U ovom dijelu su prikazani rezultati direktnog prekrivanja pulpe pacova *Wistar* soja. Ispitivani su eksperimentalni nanostrukturni biomaterijali na bazi kalcijum aluminata (CA), kalcijum silikata (CS) i kalcijum silikat hidroksiapatita (CS-HA) u komparaciji sa komercijalnim kalcijum silikatnim cementom (MTA).

Rezultati su prikazani tabelama 10 i 11 i slikama 31-45.

Tabela 10. Inflamatorni odgovor pulpe zuba pacova na ispitivane materijale

	inflamantorni odgovor pulpe			
	CA (%)	MTA (%)	CS (%)	CS-HA (%)
Odsustvo zapaljenja	66,67	60,95	55,56	66,7
Prisustvo malog broja polimorfonuklearnih Leu	27,78	22,4	38,89	22,2
Prisustvo velikog broja polimorfonuklearnih Leu	5,55	11,1	5,55	11,1
Nekroza	0	5,55	0	0
	100	100	100	100

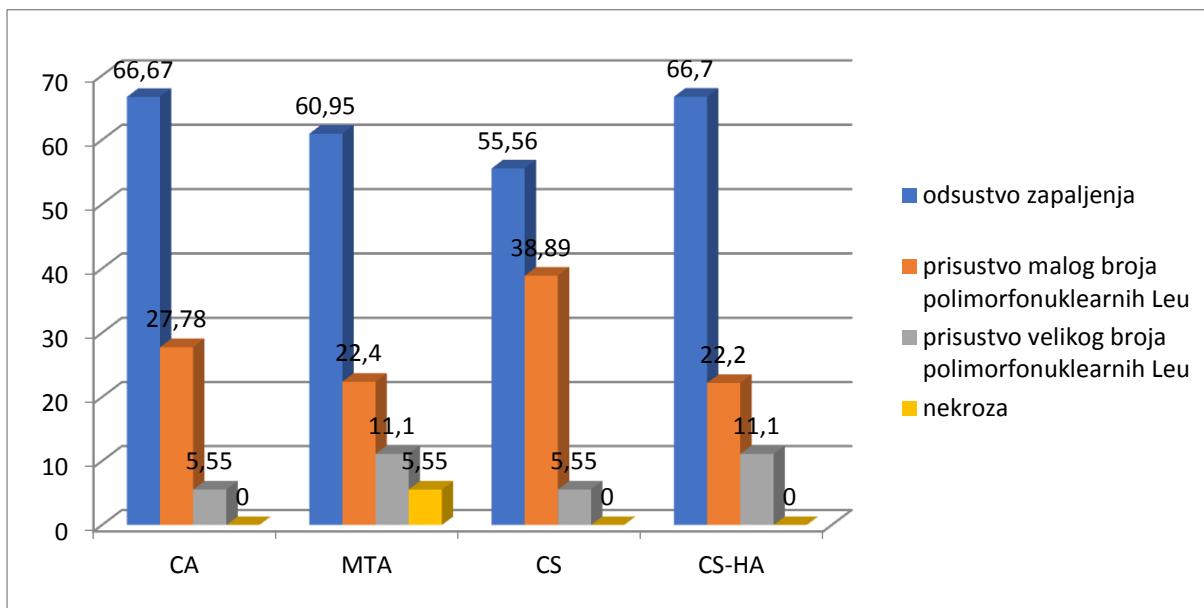
Analiza inflamatornog odgovora pulpe zuba pacova kod kojih je apliciran CA je ukazala na odsustvo zapaljenja u 66,67 % slučajeva, prisustvo malog broja polimorfonuklearnih leukocita u 27,78 % slučajeva i prisustvo velikog broja polimorfonuklearnih leukocita u 5,55 % slučajeva, dok je nekroza pulpe izostala.

Nakon DPP zuba pacova sa MTA zapaljenje je izostalo kod 60,95% slučajeva, prisustvo malog broja polimorfonuklearnih leukocita je zabilježeno u 22,4 % slučajeva, prisustvo velikog broja polimorfonuklearnih leukocita je zabilježeno u 11,1% slučajeva, a nekroza pulpe u 5,55% slučajeva.

Nakon DPP zuba pacova sa CS zapaljenje je potpuno izostalo u 55,56 % slučajeva, kod 38,89 % slučajeva je utvrđeno prisustvo malog broja polimorfonuklearnih leukocita, dok je kod 5,55 % slučajeva utvrđeno prisustvo velikog broja polimorfonuklearnih leukocita.

Nakon DPP zuba pacova sa CSHA zapaljenje je potpuno izostalo kod 66,7% slučajeva, kod 22,2 % slučajeva je zabilježeno prisustvo malog broja polimorfonuklearnih leukocita,

dok je kod 11,1% slučajeva zabilježeno prisustvo velikog broja polimorfonuklearnih leukocita.



Slika 31.Grafički prikaz inflamatornog odgovara pulpe zuba na ispitivane materijale

Iz grafikona se jasno vidi da su sva četiri ispitivana materijala (CA,CS,CSHA,MTA) u najvećem procentu dala odsustvo inflamatornog odgovora pulpe.

Najslabiji inflamatori odgovor pulpe zuba pacova je prouzrokovao CA, slijedi ga CSHA koji ima slične procentualne vrijednosti inflamacije pulpe kao i CA, s tom razlikom što je pokazao malo veću zastupljenost prisustva velikog broja polimorfonuklearnih leukocita.

Materijal MTA je sledeći po visini inflamatornog odgovora budući da ima veći procenat inflamatornog odgovora pulpe u odnosu na CA i CSHA, slične ili veće vrijednosti prisustva malog broja polimorfonuklearnih leukocita, veći procenat prisustva velikog broja polimorfonuklearnih leukocita i jedini ima prisustvo nekroze pulpe. Utvrđena je i statistički značajna razlika u visini inflamatornog odgovora pulpe između CA i MTA ( $p=0,034$ ), kao i između CSHA i MTA ( $p=0,039$ ).

Najviši inflamatori odgovor pulpe je prouzrokovao CS, koji je imao i najveći procenat prisustva malog broja polimorfonuklearnih leukocita.Utvrđena je statistički značajna razlika u visini inflamatornog odgovora pulpe između CA i CS ( $p=0,041$ ), kao i između CS i CSHA ( $p=0,044$ ).

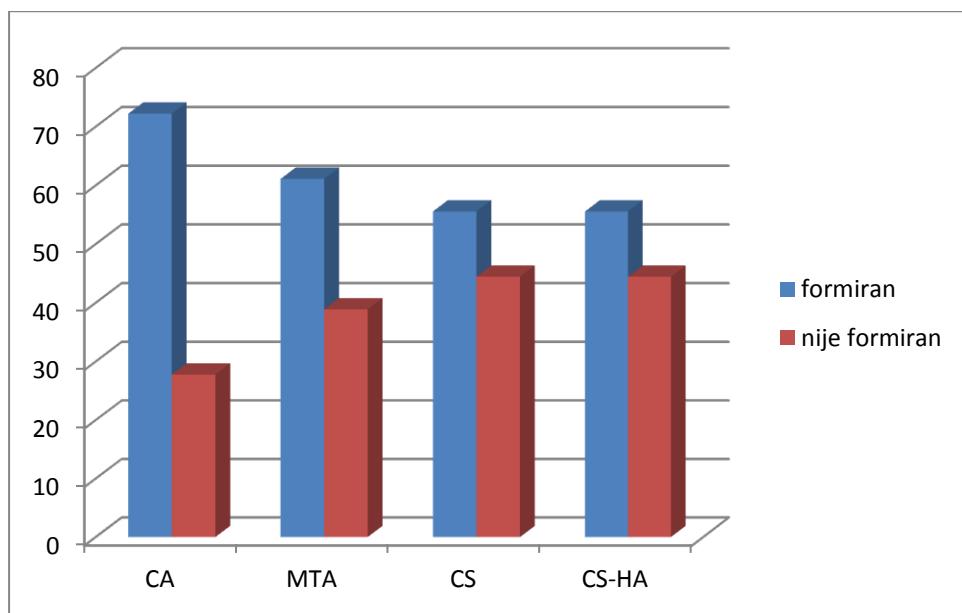
Tabela 11. Formiranje dentinskog mosta nakon primjene ispitivanih materijala

	CA	MTA	CS	CS-HA
Formiran (%)	72,22	61,11	55,56	55,56
Nije formiran (%)	27,78	38,89	44,44	44,44
Suma	100	100	100	100

Analiza formiranja dentinskog mosta na zubima pacova nakon 30 dana pokazuje da su sva četiri ispitivana materijala u većem procentu dovela do formiranja dentinskog mosta (tabela 11, slika 40).

Najveću učestalost formiranja dentinskog mosta je imao materijal CA (72,22 %) dok je formiranje dentinskog mosta izostalo u 27,78 % slučajeva. Utvrđena je statistički značajna razlika u formiranju dentinskog mosta između CA i CS ( $p=0,025$ ), kao i između CA i CSHA ( $p=0,025$ ).

Nakon primjene MTA do formiranja dentinskog mosta je došlo u 61,11 % slučajeva, dok su najmanju sposobnost formiranja dentinskog mosta pokazali CS i CSHA kod kojih je isti formiran u 55,56 % slučajeva. Ova razlika u formiranju dentinskog mosta MTA u odnosu na CS i CSHA je bila i statistički značajna ( $p=0,037$ ).



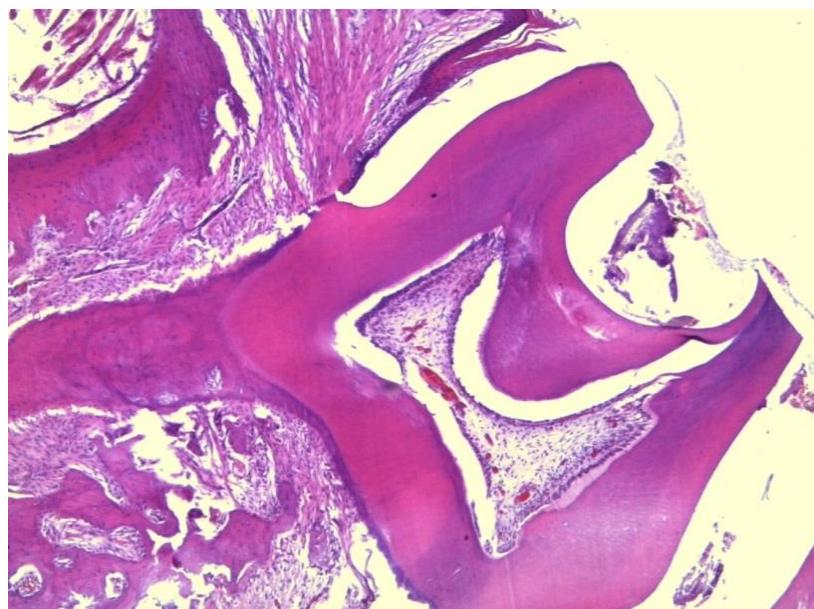
Slika 32. Grafički prikaz formiranja dentinskog mosta nakon primjene ispitivanih materijala

#### 5.4.1. Inflamacija pulpnog tkiva ispod kalcijum aluminata (CA)

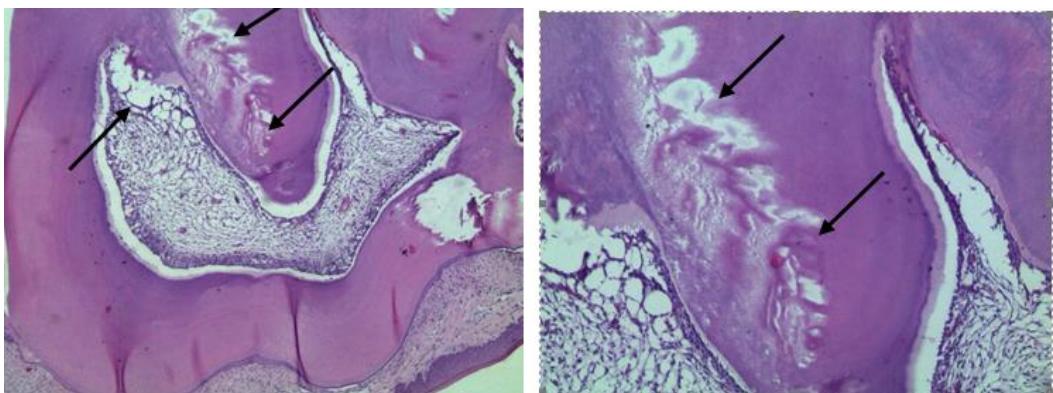
Od ukupno 18 uzoraka gdje je kao materijal za direktno prekrivanje pulpe korišten CA, 12 uzoraka je dobilo ocjenu 1, koja označava potpuno odsustvo ili svega nekoliko prisutnih raštrkanih upalnih ćelija. Kod 5 uzoraka je utvrđeno prisustvo malobrojnih upalnih ćelija među kojima dominiraju polimorfonuklearni leukociti, što je ocijenjeno ocjenom 2. U jednom uzorku je konstatovana intenzivna zapaljenska reakcija, gdje su pronađene brojne zapaljenske ćelije sa predominacijom polimorfonuklearnih leukocita (ocjena 3).

Bakterije nisu bile prisutne ni u jednom uzorku.

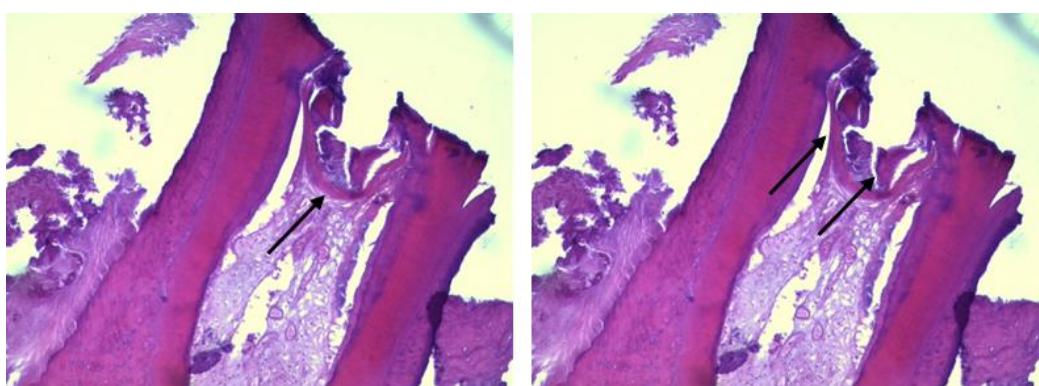
Na kraju opservacionog perioda, poslije 30 dana kod 13 uzoraka je konstatovano formiranje dentinskog mosta.



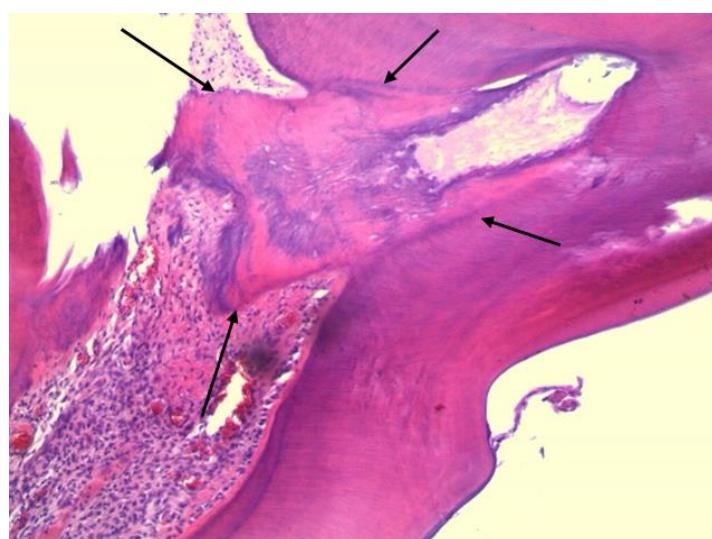
Slika 33. Uzdužni presjek zuba i pulpe – odsustvo zapaljenja nijedna upalna ćelija nakon direktnog prekrivanja pulpe CA, HE x 200.



Slika 34. Poprečni presjek zuba sa fibrinskim matriksom na mjestu perforacije i početkom dezintegracije pulpe, rani početak formiranja dentinskog mosta nakon direktnog prekrivanja pulpe CA, a) HE x200, b) HE x 400.



Slika 35. Uzdužni presjek zuba dentinska ostrvca u fazi zatvaranja perforacije cavuma dentis nakon direktnog prekrivanja pulpe materijalom CA a) HE x 100 i b) HE x 200.



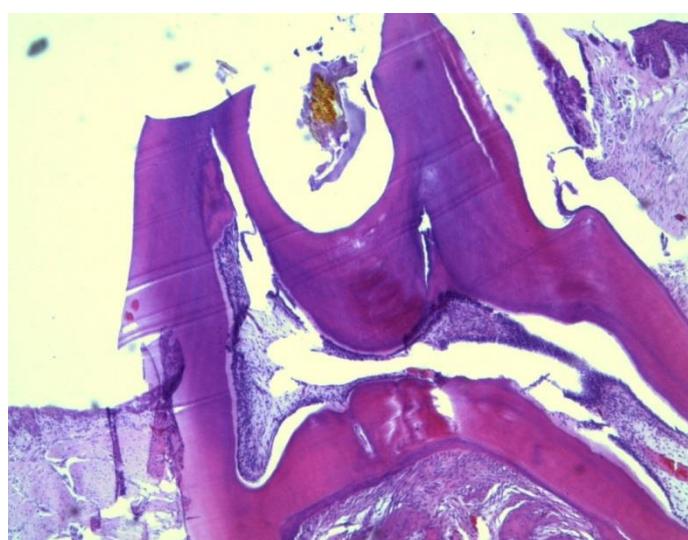
Slika 36. Uzdužni presjek zuba dio pulpe, sloj odontoblasta sa potpuno formiranim dentinskim mostom sa dentinskim kanalićim koji su u kontinuitetu sa okolnim dentinom nakon direktnog prekrivanja pulpe CA, HE x 400.

#### 5.4.2 Inflamacija pulpnog tkiva ispod kalcijum silikata (CS)

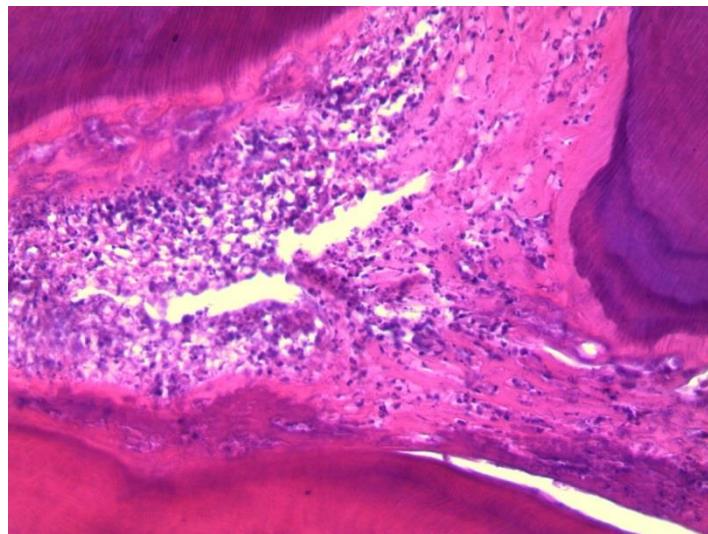
Kod 10 uzoraka kod kojih je kao materijal za direktno prekrivanje pulpe korišten CS zapaljenska reakcija je izostala ili je konstatovano prisustvo nekoliko raštrkanih upalnih ćelija (ocjena 1). Samo u jednom uzorku su pronađene brojne zapaljenske ćelije (ocjena 3), dok su kod 7 uzoraka bile prisutne malobrojne upalne ćelije sa dominacijom polimorfonuklearnih leukocita (ocjena 2).

Ni u jednom uzorku nije bilo bakterija.

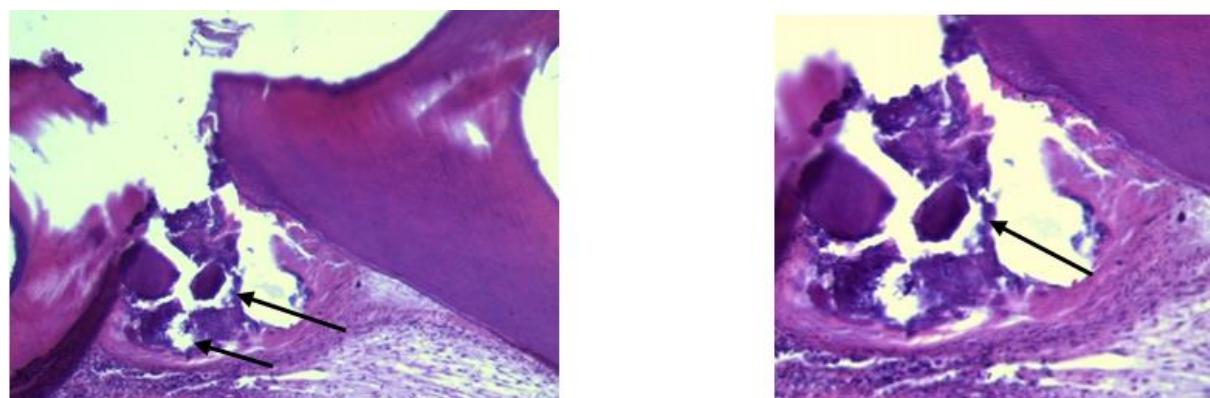
Do formiranja nekomplettnog dentinskog mosta je došlo nakon 30 dana, kod 10 uzoraka.



Slika 37. Uzdužni presjek zuba i pulpe - odsustvo zapaljenja nijedna upalna ćelija nakon direktnog prekrivanja pulpe CS, HE x 200.



Slika 38. Presjek dentina i pulpe – Difuzno prisustvo velikog broja polimorfonuklearnih leukocita u većem dijelu pulpe nakon direktnog prekrivanja pulpe CS, HE x 400.



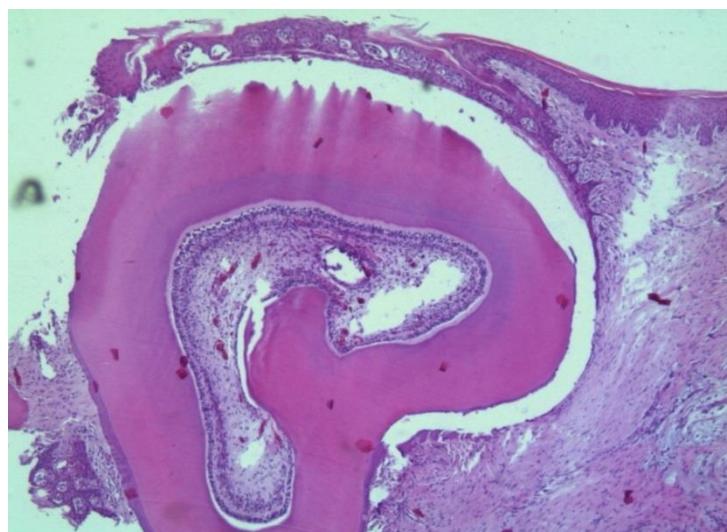
Slika 39. Presjek zuba, uočava dio pulpe i dentin sa perforacijom komore pulpe zuba koji prekriva nepotpuno formiran dentinski most (fibrin i kalcifikati ostrvca dentina ) nakon direktnog prekrivanja pulpe sa CS a) HE x 200 i b) HE x 400.

#### 5.4.3. Inflamacija pulpmog tkiva ispod CS-HA

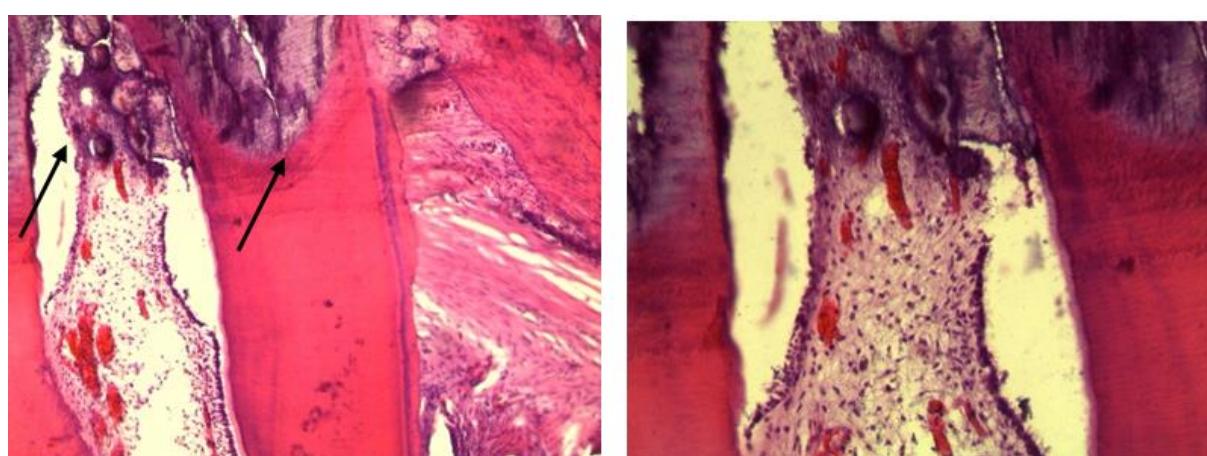
Ovaj materijal je apliciran kod svega 9 uzoraka, pri čemu kod 6 uzoraka nije registrovano zapaljenje (ocjena 1), tj. nije bilo upalnih ćelija ili je uočeno nekoliko raštrkanih upalnih ćelija. U 1 uzorku je konstatovano prisustvo velikog broja polimorfonuklearnih leukocita (ocjena 3), a kod 2 uzorka prisustvo malog broja polimorfonuklearnih leukocita (ocjena 2).

Nije bilo nekroze, a ni bakterije nisu bile prisutne niti u jednom uzorku.

Kod 5 uzoraka je nakon 30 dana ustanovljeno formiranje nekomplettnog dentinskog mosta.



Slika 40. Poprečni presjek zuba i pulpe – nekoliko raštrkanih upalnih ćelija nakon direktnog prekrivanja pulpe CS-HA, HE x 200.



Slika 41. Uzdužni presjek zuba, uočava se pulpa, sloj odontoblasta, predentin i dentin bez morfoloških promjena sa predjelom perforacije komore pulpe zuba i nepotpuno formiranim dentinskim mostom nakon direktnog prekrivanja pulpe sa CS-HA a) HE x 200 i b) HE x 400.

#### 5.4.4. Inflamacija pulpnog tkiva ispod MTA

Materijal MTA je korišten kao kontrola kod obe grupe pacova (A i B) kod kojih je rađen terapijski postupak direktnog prekrivanja pulpe. U grupi A kod 18, a u grupi B kod svega 9 uzoraka.

U grupi A (18 uzoraka), kod 11 uzoraka je bilo prisutno samo nekoliko raštrkanih upalnih ćelija ili je zapaljenje potpuno izostalo (ocjena 1). Malobrojne upalne ćelije među kojima dominiraju polimorfonuklearni leukociti pronađene su kod 4 uzorka (ocjena 2). Kod 2 uzorka smo pronašli intenzivniju zapaljensku reakciju sa brojnim zapaljenskim ćelijama (ocjena 3), dok je u jednom uzorku došlo i do nekroze pulpe.

Bakterije nisu pronađene ni u jednom uzorku.

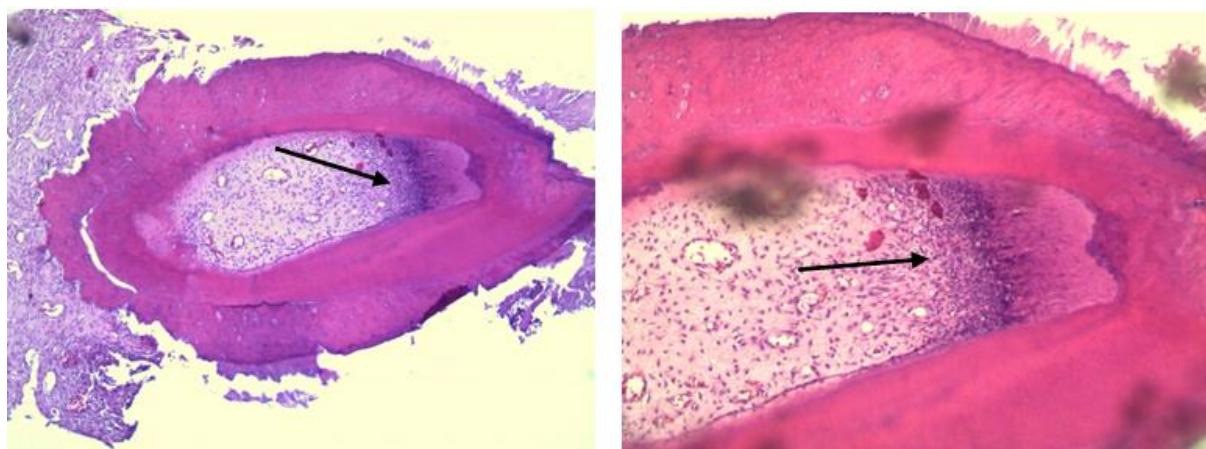
Dentinski most je formiran kod 11 uzoraka, na kraju opservacionog perioda, poslije 30 dana.

U grupi B (9 uzoraka) nije bilo nekroze pulpe ni u jednom uzorku. Bakterije takođe, nisu bile prisutne. Inflamacija je u većem broju uzoraka (6) ocijenjena ocjenom 1, dakle bila je odsutna ili je konstatovano prisustvo eventualno nekoliko raštrkanih upalnih ćelija. 1 uzorak je pokazao veliki broj polimorfonuklearnih leukocita (ocjena 3), a kod 2 uzorka smo imali prisustvo malog broja polimorfonuklearnih leukocita (ocjena 2).

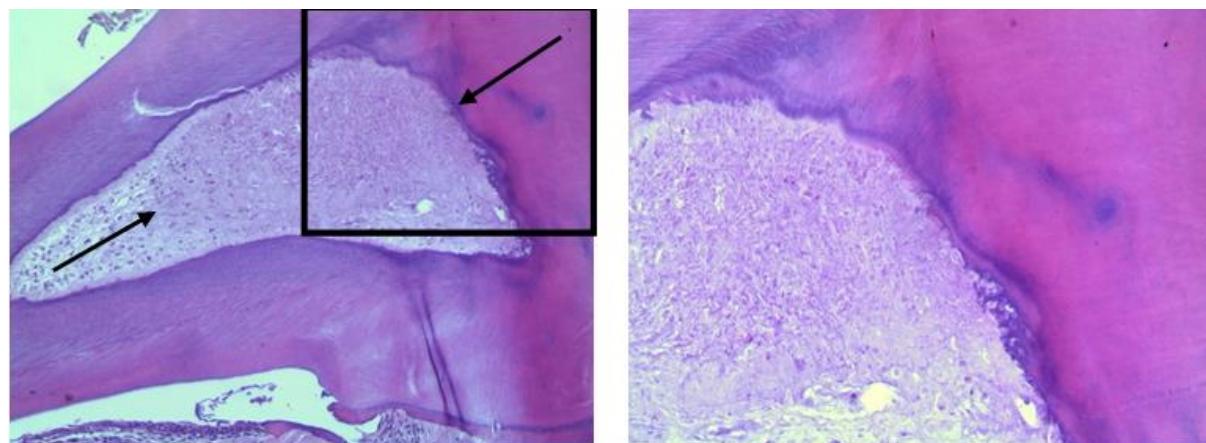
Nakon 30 dana kod 4 uzorka je formiran nekompletan dentinski most.



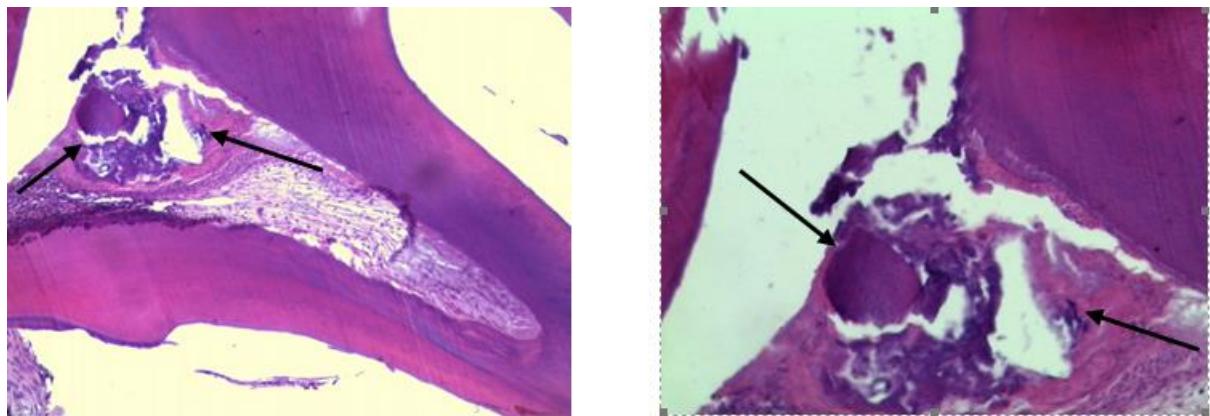
Slika 42. Poprečni presjek zuba i pulpe – nekoliko raštrkanih upalnih ćelija nakon direktnog prekrivanja pulpe MTA, HE x 400.



Slika 43. Uzdužni presjek zuba i pulpe – Prisustvo velikog broja polimorfonuklearnih leukocita u 1/3 pulpe nakon direktnog prekrivanja pulpe MTA, a) HE x 100 b)HE x200.



Slika 44. Presjek dentina i pulpe – Nekroza većeg dijela pulpe nakon direktnog prekrivanja pulpe MTA a) HE x 200 b) HE x 400.



Slika 45. Presjek zuba, uočava se dio pulpe i dentin sa perforacijom komore pulpe zuba koji prekriva nepotpuno formiran dentinski most fibrin i kalcifikati ostrvca dentina) nakon direktnog prekrivanja pulpe sa MTA a) HE x 200 i b) HE x 400.

## **6. DISKUSIJA**

### **6.1. DISKUSIJA REZULTATA BIOKOMPATIBILNOSTI NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI KALCIJUM ALUMINATA: Procjenom citotoksičnosti**

Citotoksičnost materijala se definiše kao njegov uticaj na preživljavanje, proliferativnu aktivnost ili ćelijski matabolizam, pri čemu ona može, ali ne mora biti praćena ćelijskom smrću. [150]

Postoji niz metoda za određivanje preživljavanja ćelija, neke su direktnе, zasnovane na direktnom brojanju ćelija ili kolonija ćelija u uzorku, a neke su indirektne. Indirektne metode mogu biti kolorimetrijske ili su bazirane na mjerenu intenziteta ugradnje radionuklida u biomakromolekule. [151-156]

Testovi citotoksičnosti procjenjuju citotoksičnost materijala mjerenjem broja ćelija ili ćelijskog rasta, nakon izlaganja materijalu. Nakon postavke ćelija u posude sa kulturom, slijedi njihovo prihvatanje za podlogu. Ukoliko materijal nije citotoksičan, ćelije ostaju pričvršćene za podlogu i sa vremenom dolazi do njihove proliferacije. Ukoliko je materijal citotoksičan, ćelijski rast prestaje. Do danas su korištene različite metode u svrhu procjene potencijalnih citotoksičnih efekata stomatoloških materijala [61,137,151-156].

U ovoj studiji citotoksična aktivnost ispitivanih cemenata kalcijum aluminatnog cementa (CA), kalcijum slikatnog cementa (CS), kalcijum silikatnog hidroksiapatita (CS-HA) i mineraltrioksid agregata (MTA Angelus) je određivana u uslovima *in vitro*, MTT testom.

MTT test je jedan od najčešće korištenih načina za procjenu potencijalne citotoksičnosti stomatoloških materijala, zahvaljujući jednostavnom i brzom izvođenju, preciznosti i reproduktivnosti [156].

Test se realizuje u uslovima *in vitro*, na kulturi ćelija, upotrebom MTT reagensa (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) i zasniva se na sposobnosti živih ćelija da primarnu tamno žutu boju tetrazolijumove soli redukuju u plavo-ljubičasto obojeni formazan. Redukciju navedenog spoja mogu vršiti samo žive ćelije, budući da jedino one sadrže mitohondrijalni enzim sukcinat-dehidrogenazu. MTT test je zasnovan na principu da je broj preživjelih ćelija nakon inkubacije kulture ćelija sa citotoksičnom materijom i nakon bojenja MTT reagensom, proporcionalan sadržaju obojenog formazana, koji se može odrediti

spektrofotometrijski. Vijabilnost se izražava kao apsorbancija tretiranih ćelija u odnosu na apsorbanciju kontrole [153,157-160].

MRC-5 ćelijska linija je nastala iz normalnog plućnog tkiva muškog fetusa starog 14 nedelja [161]. Ova ćelijska linija se koristi za testiranje citotoksičnosti supstanci, zbog svoje velike osjetljivosti. MRC-5 ćelije se kultivišu adherirane, a prema morfološkoj karakterizaciji su slične fibroblastima. Sposobne su da prođu kroz 42 do 46 dupliranja populacije prije pojave senescencije [150].

Permanentne ćelijske linije su u prednosti u odnosu na primarne, jer se lakše gaje, brže reprodukuju i imaju neograničen životni vijek [155,162,163].

Kalcijum aluminat (CA), čisti kalcijum silikat (CS) i MTA nisu ispoljili citotoksične efekte, te je konstatovan veoma visok procenat preživljavanja ćelija i pri najvećoj primjenjenoj koncentraciji ovih materijala.

Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja koje su realizovali *Silva i sar.* (2012.) u kome prilikom primjene MTT testa na ćelijskoj liniji 3T3 fibroblasta, kalcijum aluminatni cement EndoBinder (Binderware, Sa~o Carlos, SP, Brazil) i MTA nisu ispoljili citotoksičan efekat pri direktnom kontaktu sa fibroblastima. U njihovoј studiji je samo kalcijum-hidroksid ispoljio efekte citotoksičnosti ( $P<0,05$ ), što objašnjavaju manjom rastvorljivošću EndoBindera i MTA i samim tim slabijom disocijacijom kalcijumovih i hidroksilnih jona u poređenju sa kalcijum hidroksidom [61]. Izraženija disociacija kalcijumovih i hidroksilnih jona doprinosi toksičnosti, jer dovodi do stvaranja alkalnog medijuma [137,164]. U uslovima sa povišenim pH dolazi do denaturacije susjednih ćelija i proteina što je triger mehanizam za nastanak ćelijske smrti [165].

Rezultati studije kineskih naučnika *Kai-Chun Changa i saradnika* (2014.) takođe su u skladu sa ovim nalazima jer su primjenom (WST-1) testa potvrdili citokompatibilnost trikalcijum aluminatnih cemenata proizvedenih sol-gel metodom (označene kao PSC-91, PSC-73, i PSC-55) istu kao kod MTA cementa, uz izuzetak PSC-55 koji je pokazao blagu citotoksičnost u poređenju sa ostalim grupama, nakon 1 dana i nakon 3 dana inkubacije. Ovo objašnjavaju povećanjem sadržaja  $C_3A$  sa 30% na 50% u sastavu ovog cementa, koje je značajno poboljšalo vrijeme vezivanja i mehaničku čvrstoću, ali i pogoršalo njegove biološke karakteristike [63].

*Gutiérrez i saradnici* (2016.) su došli do rezultata koji odgovara nalazima ovog ispitivanja potvrdivši da kalcijum aluminatni cement (CAC) i kalcijum aluminatni cement sa dodatkom vodenog rastvora LiCl (CAC1) predstavljaju bioaktivne materijale, koji ne uzrokuju hemolizu i u *in vitro* uslovima ne ispoljavaju citotoksične efekte na ćelijskoj liniji fibroblasta L929. Prema njihovim rezultatima broj živih ćelija nakon direktnog kontakta sa cementom CAC1 je veći od broja ćelija nakon direktnog kontakta sa cementom CAC, jer je CAC1 cement više hidriran od CAC-a usljud dodatka Li [65].

U studiji *Soaresa i saradnika* (2017.) eksperimentalni kalcijum aluminatni citosan kolagen skafold se pokazao kao bioaktiv i citokompatibilan materijal, sposoban za povećanje odontogenog potencijala ćelija ljudske pulpe (HDPCs). Ovakav rezultat objašnjavaju sinergijom bioaktivnih efekata organske matrice citosan-kolagena i mikročestica kalcijum-aluminata [66].

U nekim istraživanjima su kalcijum aluminatni cimenti pokazali i bolje rezultate u odnosu na MTA: povećanje broja ćelija, veću ćelijsku održivost, veću aktivnost alkalne fosfataze i veću ekspresiju osteoblastnih markera. Autori ovo objašnjavaju stehiometrijskim odnosom između kalcijuma i aluminata ,koji predstavljaju bazu CAC +sistema, koji je nadalje rezultirao manjom rastvorljivošću i slabijom disocijacijom Ca i OH jona u poređenju sa MTA [16,64].

Sa druge strane zabilježeni su slučajevi gdje su kalcijum aluminatni cement Quick-Set (Primus Consulting, Bradenton, FL) i WMTA (Dentsply Tulsa Dental Specialities, Tulsa, OK) pokazali inicijalno veću citotoksičnost u odnosu na kontrolu, a poslije 15 dana biokompatibilnost oba cimenta je bila komparativna sa kontrolom [22]. Ovi kineski naučnici su zaključili da i kalcijum aluminatni cement Quick-Set i WMTA posjeduju zanemarljiv *in vitro* toksikološki efekat vremenski zavisan od eluiranja toksičnih komponenti. Cementi sa razblaženjem 1:1 su pokazali znatno višu citotoksičnost, u odnosu na razblaženje 1:10 ili 1:100 ( $P<0,05$ .) Zavisnost toksičnih efekata MTA od njegove koncentracije u rastvoru, kao i visoko preživljavanju ćelija nakon izlaganja rastvorima nižih koncentracija potvrdili su i *Hakki i sar. 2009* [166].

Najsnažnije citotoksično dejstvo je prema rezultatima ovog istraživanja ispoljio CS-HA. Ovakav rezultat je vjerovatno posljedica nešto inferiornijih fizičko hemijskih karakteristika CS-HA koji je u komparaciji sa eksperimentalnim CS i MTA pokazao veću resorpciju vode, veću poroznost i rastvorljivost [167]. Posljedica ovih osobina bi mogla biti otpuštanje i

akumulacija veće količine jona koja je nadalje rezultirala većim redukcijama u preživljavanju ćelija.

Ovi rezultati su donekle uporedivi sa rezultatima studije *Jingzbi Ma i sar.* (2011.) u kojoj je potvrđena biokompatibilnost nanostruktturnih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum silikata i kalcijum fosfata, ali je od strane autora uočeno da kraće vezivanje materijala, uz duže izluživanje može dovesti do oslobađanja veće količine jona sa negativnim uticajem na biokompatibilnost [168].

U studiji *Gomes Filha i sar.* (2009.) HA, koji ulazi u sastav ovdje ispitano nanostruktturnog CS-HA je pokazao izraženo citotoksično dejstvo na ćelijskoj NIH-3T3 (fibroblastima miša) [169].

Sa druge strane u mnogim studijama kalcijum silikatni cementi sa dodatkom hidroksiapatita, kao i čisti kalcijum silikatni cementi imaju citokompatibilni efekat uporediv sa komercijalnim MTA [103,108,170-172].

U suprotnosti sa našim rezultatima su saznanja do kojih su došli *Petrović SV. i saradnici* (2014.) u čijem istraživanju je CS-HA ispoljio manju citotoksičnost u odnosu na CS, a naročito u odnosu na MTA, što ovi autori objašnjavaju drugačijim hemijskim sastavom materijala i nižim vrijednostima pH [167].

Podaci do kojih se dolazi u literaturi ukazuju na činjenice da odabir različitih ćelijskih linija i testova, kao i uslovi pod kojima se odvija eksperiment, rezultiraju promenljivim rezultatima citotoksičnosti [169,173,174].

Treba imati u vidu da je ovo istraživanje sa eksperimentalnim nanostruktturnim kalcijum aluminatnim i kalcijum silikatnim cementima rađeno u laboratorijskim uslovima gdje se uzorci ispitivanih materijala dovode u kontakt sa velikom količinom tečnosti, pa je posljedično i sam osmotski efekat cemenata izraženiji [82]. Preporuka je da se u budućnosti dobijeni rezultati provjere i da se dalja ispitivanja nastave u kliničkim uslovima, gdje se manja količina materijala dovodi u kontakt sa vlagom okolnog tkiva.

## 6.2. DISKUSIJA REZULTATA BIOKOMPATIBILNOSTI NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI KALCIJUM ALUMINATA: Procjenom genotoksičnosti

Odsustvo genotoksičnosti predstavlja jedno od najznačajnijih obilježja biokompatibilnosti. Genotoksična oštećenja ne moraju nužno dovesti do ćelijske smrti. Ona mogu oštetiti ćelijski genom i posljedično značajno smanjiti reparacione sposobnosti tkiva, što će na duže staze rezultirati razvojem neoplazija [175].

U okviru ispitivanja genotoksičnog potencijala kalcijum aluminatnih sistema opredijelili smo se za primjenu Komet testa, zahvaljujući njegovim mnogobrojnim prednostima u odnosu na druge genotoksične testove.

Komet test ili elektroforeza pojedinačnih ćelija u agaroznom gelu je brz i osjetljiv metod za ispitivanje integriteta DNK na nivou pojedinačne ćelije [176-178]. Predstavlja test koji nam omogućava brzu detekciju oštećenja i praćenje reparacije u molekulu DNK [179]. Upotrebljava se na svim tipovima ćelija, osim eritrocita, što je veoma značajno, jer genotoksični i genoprotективni efekti mogu biti specifični za određeni tip ćelija i tkiva [180].

Prednosti ovog testa su: brza analiza, jednostavnost, ne zahtijeva veliki broj ćelija po uzorku ( $<10,000$ ) visoka osjetljivost testa, dobra cijena [181]; primenljivost na gotovo sve eukariotske ćelije (proliferišuće i neproliferišuće) [180]; fleksibilnost, odnosno mogućnost modifikacije protokola kako bi se detektivali različiti tipovi DNK oštećenja: mijenjanjem uslova elektroforeze i korišćenjem različitih lesion-specific enzima. Naime poznato je da osim jednolančanih, dvolančanih prekida i apurinskih mesta, postoje i drugi tipovi DNK oštećenja kao što su oksidovane baze i UV-indukovani dimeri [182-184].

U početku se izvodio neutralni Komet test koji se mogao koristiti isključivo za analizu dvolančanih DNK prekida. *Singh i sar.* (1988.) su razvili alkalnu verziju Komet testa (the alkaline single cell gell electrophoresis), koja je omogućila analizu i jednolančanih i dvolančanih DNK prekida, ali i alkalnih labilnih mjesta (bazična mjesta koja zaostaju nakon uklanjanja oštećenih baza) [179].

Kad nastupi DNK oštećenje, dolazi do opuštanja omči. U toku elektroforeze, električno polje izvlači otpuštene omče i slomljene krajeve prema pozitivno nabijenoj anodi. Određivanje relativne količine DNK koja je putovala duž gela, omogućava da se na jednostavan način izvrše mjerjenja DNK lomova na nivou pojedinačnih ćelija [185]. Bivša

ćelijska jedra i polomljeni fragmenti razvučeni u električnom polju oblikuju „glavu“ i „rep“ komete, iz čega i potiče naziv Komet test [186].

Prilikom mjerjenja kometa se upotrebljava epiflorescentni mikroskop koji je spojen sa kompjuterom, te se uz pomoć specijalnih softvera mjere određeni parametri: dužina repa i % DNK u repu [187]. Dužina repa je određena dužinom DNK migracije i direktno je povezana sa veličinom DNK fragmenta, odnosno stepenom oštećenja. Komet test ne daje uvid u veličinu DNK fragmenata, jer fragmenti nisu odvojeni prilikom elektroforeze. Međutim, povećanjem broja lomova DNK dolazi do većeg opuštanja omči DNK, a kao rezultat toga više slobodnih krajeva može migrirati i veća količina DNK putuje u rep kometa [186]. Dužina repa kometa se izračunava od sredine glave do kraja repa, a označava količinu DNK fragmenta, koja direktno upućuje na dio genoma koji je pogoden oštećenjem. Postotak DNK u repu je najpouzdaniji parametar Komet testa [176,188].

Prilikom ispitivanja genotoksičnog potencijala nekog materijala, najprije se DNK izlaže njegovom djelovanju i ukoliko se utvrdi DNK oštećenje, nakon toga se pristupa njegovoj kvantifikaciji. Ukoliko je genetsko oštećenje malo, za vrijeme elektroforeze dolazi do istezanja molekule DNK. Sa porastom broja oštećenja, dijelovi DNK molekule slobodno putuju i grade rep komete, sve do krajnjeg slučaja (apoptoze) u kojoj su glava i rep komete jasno razdvojeni [187].

Primjenom alkalne verzije Komet testa na ćelijskoj liniji MRC-5 (normalnim humanim fibroblastima) ispitivan je genotoksični potencijal kalcijum aluminatnog cementa (CA) i kalcijum silikat hidroksiapatita (CS-HA), materijala koji je jedini ispoljio citotoksičnu aktivnost prilikom prethodno urađenog MTT testa za procjenu potencijalne citotoksičnosti materijala.

Eksperimentalni nanostruktturni biomaterijal na bazi CA nije ispoljio genotoksični potencijal, tj. procenat oštećenja DNK pri svim primjenjenim koncentracijama je na nivou netretiranih kontrolnih ćelija.

Rezultati koji su donekle uporedivi sa nalazima ove studije, kad je u pitanju CA cement, su proistekli iz obimne studije *Pameijera i saradnika* (2008.). U kompleksnom istraživanju ovih naučnika, između ostalog, je urađeno ispitivanje mutagenosti kalcijum aluminatnog cementa Ceramir® Crown & Bridge (ranije XeraCem™) primjenom Amesovog testa (testa reverzibilne mutacije). Prema rezultatima njihove studije Ceramir C & B nije

ispoljio mutagenost. Za odsustvo mutagenog efekta ovog kalcijum aluminatnog cementa moguće da je zaslužan njegov sastav, jer Ceramir® Crown & Bridge je hibridni materijal sastavljen od kalcijum aluminatnog i glasjonomer cementa, a biokompatibilnost glasjonomercementa je odavno poznata [60].

Brazilski naučnici *Kido WH. i sar.* (2014.) su primjenom Komet testa dokazali odsustvo genotoksičnog efekta aluminatnog skafolda sa dodatkom bioglassa (BG) i hidroksiapatita (HA), na ćelijama krvi, jetre i bubrega, a nakon ugradnje ovog materijala u koštane defekte tibije pacova. Autori ovakav rezultat objašnjavaju povećanom degradacijom BG i HA koja je posljedično stimulisala osteogenezu privlačenjem osteoprogenitorskih ćelija i stvaranjem osteoblastnog matriksa, a time i nove kosti [189].

*Ashraf A. Eid i saradnici* (2013.) su evaluirali promjene na nivou mRNA praćenjem ekspresije gena (RUNX2, OCN, BSP i DMP1) povezanih sa osteogenom/dentinogenom diferencijacijom i mineralizacijom, proizvodnjom alkalne fosfataze i mineralizacijom ekstracelularnog matriksa (Alizarin crveno S bojenje). Nije bilo statistički značajne razlike između eksperimentalnog kalcijum aluminosilikatnog cementa (Quick-set) i WMTA. Ovako dobar rezultat kalcijum aluminosilikatnog cementa (Quick-set) je vjerovatno zasluga načina njegove proizvodnje u toku koje je uklonjen katjonski surfaktant iz tečne gel komponente, za koji se smatralo da ometa biokompatibilnost [5].

Interesantno je da je u dvjema studijama aluminijum oksid, jedan od sastojaka ovdje ispitivanog kalcijum aluminatnog cementa, pokazao genotoksični efekat.

*Balasubramanyam i sar.*(2009.) su ispitivali genotoksične efekte na perifernim ćelijama krvi pacova izloženih aluminijumskom oksidu. Njihovi rezultati su ukazali da jedinjenje aluminijum oksida ,u uslovima *in vivo*, pokazuje dozno zavisnu genotoksičnost. Jedno od mogućih objašnjenja je da Al može uticati na strukturu hromatina i dovesti do oštećenja DNK. Drugi mehanizam je potkrijepljen opažanjima da interakcija ćelija sa Al može dovesti do formiranja ROS-a. Sem toga, Al može poboljšati propustljivost lizozomske membrane i inhibirati lizosomalnu protonsku pumpu, koja može dovesti do oslobođanje DNA-ze iz lizozoma. Pokazano je da DNA-za uvedena u citoplazmu elektroporacijom predstavlja snažan induktor citogenetskog oštećenja. Moguće je da Al izaziva genotoksičnost pomoću jednog ili više mehanizama. Svakako su neophodne dalje studije, ali autorи sugerisu da je genotoksičnost jedinjenja aluminijum oksida izraženija pri primjeni većih doza. [190].

Studija *Hashimoto* i sar (2015.) je negativno ocijenila biološke odgovore kultivisanih makrofaga (RAW264) na nanočestice aluminijum-oksida ( $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NPs}$ ) i nanočestice silicijum-oksida ( $\text{SiO}_2\text{NPs}$ ) analizom citotoksičnosti (WST-8 i Hoechst) i genotoksičnosti (Mikronukleus i Komet test). Zaključili su da su koncentracije aluminijum i silicijum oksida iznad 200 g/mL dovoljno velike da indukuju citotoksične i genotoksične efekte na ćelije [191]. Veličina nanočestica aluminijum oksida i silicijum oksida (13 nm) korišćena u ovom istraživanju je manja od onih koji su korišteni u drugim studijama citotoksičnosti u literaturi. Autori ukazuju na to postoji indukcija nuklearne NP penetracije zavisna od veličine, pri čemu je moguće da manje NP bez površinskog premaza mogu u većoj mjeri prodrijeti u pore nego veće NP-e, što dovodi do promocije cito- i genotoksičnosti. Sem toga, NP koncentracije u ovoj studiji (200 i 400 g / mL) relativno su velike, što je omogućilo lako dobijanje citotoksičnih i genotoksičnih efekata i mikromorfoloških promjena ćelija, ali je svakako potrebno da se urade dodatna istraživanja mjerjenje efekta NP na ćelije u niskim koncentracijama (ispod 100 g / mL).

Aluminijumski oksid je ,istina, samo jedan od sastojaka koji ulaze u sastav kalcijum aluminatnog cementa ispitivanog u okviru našeg istraživanja. Treba imati u vidu da je za sintezu aktivnog kalcijum aluminatnog sistema, koji je predmet ovih istraživanja bilo neophodno najprije sintetisati pojedinačne komponente: kalcijum aluminat ( $\text{CaOAl}_2\text{O}_3$ ), kalcijum karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) i monociklični  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  ili  $\text{BaSO}_4$  (kao rentgen kontrast). Kalcijum aluminatna faza je sintetisana korištenjem  $\text{CaCl}_{2x}5\text{H}_2\text{O}$ , a aluminatna sol ( $\text{AlOOH}$ ) je dobivena hidrotermalnim tretmanom. Monociklični  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  je proizведен kalcinacijom  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  (Kemika, Croatia) na  $450^\circ\text{C}$ , tokom 20 sati. Ova procedura je izvedena sa ciljem da se dobije stabilna tetragonalna  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  faza, zasićena kiseonikom. Objasnjenje za odsustvo genotoksične aktivnosti ispitivanog nanostrukturnog CA moglo bi da leži upravo u njegovom hemijskom sastavu i načinu njegove sinteze procesom nanotehnologije, kombinacijom sol gel metode i metode samosagorjevajućih talasa. Sol gel metoda omogućava da se ciljni proizvod dobije na specifičnoj površini od 7 do  $120 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  [192], poboljšava svojstva materijala, doprinosi smanjenju mase, a povećanju funkcionalnosti i stabilnosti materijala [193]. Prema mišljenju *Chena* i sar. (2011.) materijali dobijeni sol-gel procesima su bioaktivniji u odnosu na materijale koji su dobijeni drugim metodama sintetisanja [151].

Eksperimentalni CS-HA je za razliku od CA ispoljio genotoksičnu aktivnost. Prilikom primjene Komet testa kod CS-HA su samo koncentracije od 5 i 10 mg/mL prouzrokovale oštećenja DNK na nivou kontrole, dok su sve više koncentracije rezultirale sa značajno većim

oštećenjima. Genotoksičnost CS-HA je donekle bila i očekivana, s obzirom da je ovaj materijal ispoljio citotoksičan efekat, prilikom prethodno urađenog MTT testa.

Nadalje, ustanovljena je i zavisnost DNA oštećenja od primijenjene koncentracije CS-HA materijala. Očekivano, najveći procenat DNA oštećenja (38,1 %) je zabilježen pri najvećoj primjenjenoj koncentraciji materijala (100 mg/mL), dok je najmanji procenat DNA oštećenja (4,7 %) konstatovan pri koncentraciji CS-HA od 5 mg/mL.

U studiji *Opačić Galić V.* i sar. (2012.) je eksperimentalni CS-HA, sastavljen od CS (34%) i HA (66%) i proizveden hidrotermalnom sol gel metodom ispoljio genotoksični efekat na limfocitima donatora 2. Autori su genotoksični potencijal materijala ispitivali primjenom Komet testa na humanim limfocitima periferne krvi .Genotoksičnost CS-HA na limfocitima donatora 2 je potvrđena u svim testiranim koncentracijama ,izuzev najniže (0,01 mg/mL). Interesantno je da je pri tome genotoksični efekat CS-HA izostao na limfocitima donatora 1, a čak i pri najvećoj primjenjenoj koncentraciji CS-HA (10 mg/mL) rezultirao smanjenjem procenta DNK oštećenja u limfocitima donatora 3. Razlog za ove razlike u ispoljavanju genotoksičnog efekta CS-HA bi ,po autorima, mogla da bude različita osjetljivost ćelija dobijenih od tri različita donatora, koji imaju različite genetske osnove, a samim tim i različite reparativne kapacite DNK [194].

*Halil i Eid* (2013.) su istraživali i upoređivali sistemsku toksičnost BioAggregata, trikalcijum silikatnog cementa sa dodatkom hidroksiapatita i MTA na jetru i bubrege , nakon 7 i 30 dana. Zaključili su da MTA ima znatno ozbiljnije štetne efekte na jetru i bubrege od BioAggregata, ali bez trajnog oštećenja. Kao moguće objašnjenje autori navode da MTA sadrži teške metale i oslobađa arsen. Tokom hirurškog zahvata arsen je došao u kontakt sa krvlju, putem krvotoka je dospio u jetru i bubrege. Poznato je da u slučaju kad jetra ne uspije metabolisati arsen, on postaje otrovan i uzrokuje oštećenja, čak i u subletalnim koncentracijama [130]. Drugo tumačenje sistemskog negativnog efekta je proizvodnja citokina kao što su IL-1 i IL-6 u potkožnom tkivu (*Koh i sar.* 1998), koji mogu ući u cirkulaciju, vezati se za hepatocite i uzrokovati inflamatorne reakcije [195].

Sa druge strane HA, koji se nalazi u sastavu CS-HA, nije ispoljio genotoksični potencijal na ćelijskoj liniji L1210 (ćelije leukemije), kao ni na skafoldima MG63 i mezenhimalnim matičnim ćelijama [197,198]. Objasnjenje za izvrsnu biokompatibilnost HA moglo bi biti u njegovom površinskom sloju koji ima presudnu ulogu u ostvarivanju veze između ćelijskih tkiva i ovog biomaterijala [36].

Raznolikost genotoksičnih odgovora pri ispitivanju toksičnosti stomatoloških materijala na raznim ćelijskim linijama potvrđena je i u nekim drugim studijama [175,198-202].

Postoji velika vjerovatnoća da na konačne rezultate procjene genotoksičnog potencijala neke supstance utiče genetika osobe od koje se uzimaju ćelije, vrsta odabrane ćelijske linije, ali i uslovi pod kojima se realizuje eksperiment [194].

Rezultati genotoksičnog potencijala kalcijum aluminatnog cementa koji je primarno ispitivan svakako ohrabruju da se nastave istraživanja ovog materijala u budućnosti i drugim eksperimentalnim studijama.

### **6.3. DISKUSIJA REZULTATA BIOKOMPATIBILNOSTI NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI KALCIJUM ALUMINATA NAKON POTKOŽNE IMPLANTACIJE**

Testiranja na životinjama su čest način provjere novih materijala prije njihove kliničke provjere. Svaki materijal prije svoje komercijalne primjene mora proći strogu naučnu, a potom i kliničku provjeru [203].

Osvrnemo li se na našu daleku prošlost pronaći ćemo veoma interesantne podatke o prvim animalnim eksperimentima. Eksperimente na životinjama je izvodio još u V. vijeku prije Hrista, Alkmeon iz Krotona (grčki ljekar i filozof), a početke komparativne anatomofiziologije je postavio Aristotel. Danas se eksperimenti na životinjama koriste kao osnova u svim biomedicinskim istraživanjima, ali i kao osnova svih kliničkih disciplina u medicini, stomatologiji, veterini i farmaciji [203-205].

Skoro da nema vrste i podvrste životinjskoga svijeta koja nije korištena za potrebe naučnih istraživanja. Ipak, kad su u pitanju stomatološka istraživanja prednost se daje pacovima. Prvi pisani trag o eksperimentisanju pacovima potiče iz sredine XIX vijeka, kada je Philipeaux izučavao na koji način adrenaloktomija utiče na albino pacove [68]. Prvi pacovi uzgojeni za potrebe medicinskih ispitivanja su bili na Wistar institutu u Filadelfiji [68,69]. Iako danas postoji više stotina čistokrvnih i oko pedeset ukrštenih sojeva pacova, u stomatološkim eksperimentima najviše se upotrebljavaju sojevi Wistar i Sprague-Dawley [70]. Prednost u stomatološkim istraživanjima ovim eksperimentalnim životinjama daje u prvom redu činjenica da pacovi ne mogu povraćati i stoga se koriste kao čest početni model za brojna ispitivanja toksičnosti i kancerogenosti stomatoloških materijala. Svakako, prednost je i njihova prihvatljiva cijena i mogućnost jednostavnog obezbjeđivanja. Kao i miševi, pacovi imaju dobre reproduktivne sposobnosti i dobro se uzgajaju u laboratorijskim uslovima [206,207].

Potkožni implantati kod pacova se vrlo često koriste za procjenu biološke kompatibilnosti raznih stomatoloških materijala [208]. Rasprostranjena primjena ove metode proizilazi iz činjenice da je implantacija materijala u potkožno tkivo životinja pristupačna i jednostavna, ali i pouzdana u svrhu određivanja iritacije tkiva i interakcije tkiva i samog materijala [6,71,123,208-210]. Lokalne reakcije na ugrađeni implantat se mogu kvantitativno

i kvalitativno proceniti primjenom različitih metoda: histološka analiza, skening elektronska mikroskopija (SEM), transmisiona elektro mikroskopija (TEM), histohemijska analiza. Ipak, najčešći metod za proučavanje kompatibilnosti tkiva na implantirani materijal je histološka analiza, a debljina fibrozne kapsule oko implantata koji je ispod kože, se koristi kao pokazatelj biokompatibilnosti materijala decenijama [211].

Imajući u vidu iskustva nekih ranijih istraživača koji su došli do zaključka da se bolji rezultati postižu ukoliko se implantirani materijal na neki način ograniči, jer se na taj način sprječava njegovo rasipanje u okolnom vezivnom tkivu, materijali su prije aplikacije stavljeni u polietilenske tubice [212].

Iako je danas u upotrebi čitava paleta različitih vrsta tubica: dentinske [102,213,214], silikonske [215], teflonske [5], polietilenske [6,71,123], polipropilenske [216], naš izbor su bile polietilenske tubice, s obzirom na njihovu inertnu prirodu i široku primjenu [217-219]. One ne izazivaju tkivnu reakciju, na kontrolisan i efikasan način izlažu testirani materijal živom tkivu, jednostavne su za aplikaciju i sterilizaciju.

Tkivo oko testiranih materijala je pokazalo najviši nivo upale u prvih 7 dana, uz umjerenu narušenost strukture vezivnog tkiva. Vezivno tkivo oko MTA je pokazalo znake najteže zapaljenske reakcije ocijenjene kao umjereni i izraženo zapaljenje. Ovo je u skladu sa nalazima nekih drugih istraživača (*Lotfi i sar. 2009., Camilleri 2006.*) koji nešto izraženiju početnu zapaljensku reakciju tkiva na implantaciju MTA objašnjavaju visokom pH vrijednošću ovog materijala, dugim vremenom vezivanja praćenim oslobađanjem topote, kao i stimulacijom inflamatornih citokina [220,221].

U skladu sa ovim rezultatima su i rezultati studije *Opačić Galić V. i sar. (2017.)* gdje je 7 dana nakon supkutane implantacije nanostruktturnog CS-HA, CS i kontrolnog MTA, kod pacova Wistar soja najjači zapaljenski odgovor dao MTA ( $3,30 \pm 0,48$ ), dok je za CS i CS-HA on ocijenjen sa  $3,00 \pm 0,71$  [222].

Rezultati ovog istraživanja su pokazali zavisnost između jačine inflamatornog odgovora i debljine fibrozne kapsule. Sa odmicanjem vremena konstatovan je pad u intenzitetu inflamacije, uz povećanje debljine fibrozne kapsule kod svih testiranih materijala. Eksperimentalni kalcijum aluminatni cement (ALBO-CA) je na kraju opservacionog perioda, poslije 30 dana, prouzrokovao identičnu tkivnu reakciju kao kalcijum silikat hidroksiapatit (ALBO-CSHA) i komercijalni mineral trioksid agregat (MTA), uz najbolje organizovanu fibroznu kapsulu oko materijala, što je najvjerojatnije zasluga hemijske prirode i načina

sinteze ovog cementa. Bioaktivnost jednog materijala povezana je i sa načinom njegove sinteze. Nanostrukturalni biomaterijal na bazi kalcijum aluminata, koji je ovom doktorskom tezom ispitivan, je proizведен procesom nanotehnologije, kombinacijom dvije metode: sol-gel metode i metode samosagorjevajućih talasa. Prema mišljenju *Chena i sar.* (2011.) materijali dobijeni sol-gel procesima su bioaktivniji u odnosu na materijale koji su dobijeni drugim metodama sintetisanja [151].

*Garcia i sar.* (2014.) su dobili rezultate biokompatibilnosti koji u potpunosti odgovaraju rezultatima ove studije uz odsustvo inflamacije i značajno povećanje debljine fibrozne kapsule nakon 30 dana potkožne implantacije kalcijum aluminatnog cementa (EndoBindera), kalcijum silikatnog cementa (Mineral trioksid agregata) i kalcijum hidroksida kod pacova. Uprkos činjenici da Endobinder prilikom rastvaranja oslobađa manju količinu kalcijumovih jona u njihovom istraživanju je prouzrokovao tkivnu reakciju sličnu onoj koju izaziva MTA i kalcijum-hidroksid u svim opservacionim periodima. Autori to objašnjavaju metodologijom koja je primijenjena u ovoj *in vivo* studiji. Garcia i sar. su zaključili da sa biološke tačke gledišta EndoBinder postaje obećavajuća opcija u endodontskoj terapiji, ali uz preporuku da se prije njegove primjene u endodontskoj terapiji humane populacije sprovedu dodatna istraživanja bioloških i fizičko-hemiskih svojstava ovog novog cementa [6].

*Aminozarbian MG i saradnici* (2012) su potvrđili da je inflamatorni odgovor tkiva na implantaciju kalcijum aluminatnog cementa CAAC-a i mješavine volastonita i kalcijum aluminatnog cementa WOLCA-a, nakon 30 dana, kod pacova uporediv sa MTA, što je u skladu sa našim nalazima, dok CAAC Plus nije potvrdio biokompatibilnost jer je indukovao intenzivniji inflamatorni odgovor u odnosu na MTA. Autori ovo objašnjavaju sastavom CAAC Plus cementa, dodatkom 5% Na-HMP disperzanta sa ciljem poboljšanja njegovih svojstava što se sa druge strane negativno odrazilo na biokompatibilnost [223].

*Aguilar i saradnici* (2012.) su potvrđili bolju tkivnu reakciju poslije primjene kalcijum aluminatnog cementa EndoBindera u odnosu na GMTA, nakon 42 dana potkožne implantacije ovih materijala u tkivo pacova. Ovo objašnjavaju procesom sinteze EndoBindera, fazom sa niskim sadržajem Ca, koja ima za posljedicu oslobađanje manje količine jona kalcijuma, čineći ga manje iritantnim i citotoksičnim za tkiva, a bez ugrožavanja njegovih antimikrobnih svojstava [71].

Reakcija tkiva na prazne cjevčice (negativna kontrola) u ovom eksperimentu je slična nalazima drugih istraživača [211,224]. Bilo je najteže nakon sedmog dana, kad je

konstatovan najizraženiji inflamatorni odgovor. Početna inflamatorna reakcija na prazne cjevčice je najvjerojatnije reakcija na hirurški zahvat implantacije [211,224].

Rezultati biokompatibilnosti ALBO-CSHA dobijeni ovom studijom odgovaraju nalazima *Petrović* i saradnika [123] i *Saghirija* i saradnika [124] u čijim studijama na kraju opservacije nije utvrđeno postojanje značajne razlike u inflamatornom odgovoru tkiva između CS-HA i MTA, odnosno Bioagregata, nanostruktturnog trikalcijum silikatnog cementa sa dodatkom kalcijum fosfata, i MTA, nakon potkožne implanatacije kod pacova Wistar i Sprague Dawley. Autori ovakav nalaz objašnjavaju činjenicom da materijali koji sadrže kalcijum dobra biološka svojstva duguju zajedničkoj sposobnosti oslobođanja kalcijumovih jona, te je sasvim očekivana slična reakcija u situaciji kada novi sistem kalcijum-silikata dođe u kontakt sa tkivnim fluidima. U studiji *Petrović* i saradnika primjena posebnog metoda sinteze je dodatno favorizovala bioaktivnost ispitivanog CS-HA.

Nasuprot tome *Batur BY* i saradnici (2013.) su došli do rezultata koji nisu u skladu sa ovim rezultatima jer su potvrdili statistički značajno bolju tkivnu reakciju i slabiji inflamatori odgovor DiaRoot BioAggregata, u odnosu na MTA. Kao mogući razlog za bolji rezultat Bioaggregata navode jedino činjenicu da je njihovo istraživanje rađeno u in vivo uslovima, na laboratorijskim životinjama (pacovi Sprouge Dawley), za razliku od prethodnih in vitro studija u kojima nije konstatovana statistički značajna razlika između MTA i BioAggregata [125].

## 6.4. DISKUSIJA REZULTATA BIOKOMPATIBILNOSTI NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI KALCIJUM ALUMINATA NAKON DIREKTNOG PREKRIVANJA PULPE

Veoma duga klinička praksa nam svjedoči o liječenju izložene pulpe terapijskim postupkom direktnog prekrivanja. Tretman vitalne pulpe se sprovodi preko 200 godina [225]. Direktno prekrivanje pulpe je postupak kojim se prekriva otvorena pulpna komora, sa osnovnim ciljem da se sačuva njen vitalitet, odnosno da se podstakne odrambena reakcija pulpe i stvaranje reparatornog dentina [226].

Stomatološka istraživanja su potvrdila da zubna pulpa posjeduje dobro vaskularizovano vezivno tkivo koje ima dobre reparatorene sposobnosti, odnosno dobar odgovor na nadražaje [132,227].

Prema rezultatima većine aktuelnih studija, ukoliko se poštuje protokol liječenja i zadovolje neophodni klinički kriterijumi, direktnim prekrivanjem pulpe se može sačuvati vitalitet zuba u čak do 90% slučajeva [114,133-135,228].

U stomatološkim istraživanjima, laboratorijska životinja izbora je pacov (*Car BD* i sar.2006.), pa je zato ovaj animalni model korišten i u ovom eksperimentu [229]. Ono što ovim eksperimentalnim životinjama daje prednost u odnosu na druge, u prvom redu, je sličnost između njihovih i ljudskih molara [206]. Osim toga, ženke pacova se kote čak 6-7 puta u toku života (Čupić i sar.1999.) pa su zahvaljujući dobrim reproduktivnim sposobnostima pristupačni za nabavku [230]. Prednost pacova je i njihova ekonomična cijena i dobra adaptacija na život u laboratorijskim uslovima [206,207].

Kalcijum hidroksid je dugo vremena imao status najčešće korištenog materijala za direktno prekrivanje zubne pulpe. U težnji prevazilaženja poznatih nedostataka ovog materijala (pojavljivanje distrofičnih kalcifikacija, mogućnost stvaranja nekontinuiranog dentinskog mosta sa tzv. „tunelskim defektima“, rubno propuštanje i nepostojanost konzistencije materijala) mnogi istraživači novog doba su počeli intenzivno istraživati i primjenu nekih drugih materijala u svrhu DPP, prvenstveno kalcijum silikatnih cemenata. [231].

Efikasnost kalcijum silikatnih cemenata kao materijala za DPP je dokazana u brojnim eksperimentalnim i kliničkim studijama [135,232-235].

Iz tog razloga, je odabran MTA, komercijalni kalcijum silikatni cement, kao kontrolni materijal, u ovoj studiji.

Ipak, danas se zna da ovaj materijal posjeduje i neka negativna svojstva: kratko radno vrijeme, dugo vrijeme vezivanja, zrnastu konzistenciju zamiješanog materijala, što otežava kliničku manipulaciju i njegovu svakodnevnu upotrebu [78,145,236-238]. Unaprijeđenje ovih karakteristika uz zadržavanje svojstava biokompatibilnosti i biofunkcionalnosti MTA, bio je imperativ novijih istraživanja stomatoloških materijala.

Sa druge strane, o primjeni kalcijum aluminata u postupku DPP se veoma malo zna što dodatno pokazuje značaj naše studije [76,77].

U ovoj studiji u terapijskom postupku direktnog prekrivanja pulpe su korišćeni nanostrukturi biomaterijali na bazi kalcijum aluminatnih sistema, kalcijum silikatnih sistema i kalcijum silikat hidroksiapatita, proizvedenih hidrotermalnom sol gel metodom i metodom samosagorjevajućih talasa, po metodi *Jokanovića* i saradnika.

In vivo studija je realizovana aplikacijom navedenih materijala na ukupno 72 gornja molara, kod 18 pacova *Wistar* soja.

Prema dobijenim rezultatima, svi testirani materijali u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi su potvrdili biokompatibilnost.

Kad je u pitanju inflamatori odgovor, najveći broj uzoraka ispitivanih cemenata je ocijenjen ocjenom 1, što označava odsustvo inflamacije ili prisustvo svega nekoliko raštrkanih upalnih ćelija, što govori u prilog biokompatibilnosti svih testiranih materijala. Zapaljenska reakcija pulpnog tkiva je bila najmanje izražena posle direktnog prekrivanja CA.

Bakterije nisu bile prisutne niti u jednom uzorku, što se objašnjava radom terapeuta u strogo aseptičnim uslovima, ali i adekvatnim rubnim zatvaranjem kavite kompozitnim ispunima.

Jedna od rijetkih studija koja je razmatrala problematiku primjene kalcijum aluminata u liječenju pulpe je studija *Kramera i saradnika* iz 2014. godine rađena na pulpi pacova. Kalcijum aluminatni cement (Quick-Set) je u ovoj studiji pokazao slične osobine kalcijum

silikatnim cementima (ProRoot MTA i MTA Plus) i potvrdio mogućnost primjene nakon pulpotorije. Analizirani su stvaranje dentinskog mosta, prisustvo bakterija i vitalitet pulpe. Prema rezultatima ove studije koncentracije IL-1 $\beta$  i IL-1 $\alpha$  su smanjene kod zuba sa cementima, ali nije bilo značajne razlike između 3 cementa. Do formiranja dentinskog mosta je došlo nakon 60 dana kod primjene svakog od 3 cementa, a i svi zubi su sačuvali vitalitet. Sličan dentinogeni potencijal kalcijum aluminatnog cementa (Quick-Set) kao kod MTA, je moguće objasniti njegovim sastavom. Quick-Set je nastao rafiniranjem eksperimentalnog kalcijum aluminosilikatnog cementa Capasio (Primus Consulting, Bradenton, FL) uklanjanjem katjonskog surfaktanta iz tečne gel komponente, koja se negativno odražavala na biokompatibilnost [76].

U skladu sa ovim rezultatima su i rezultati studije *Radovića i sar.* (2017.) gdje je potvrđen povoljan biološki efekat nanostrukturnog kalcijum aluminatnog cementa u postupku direktnog prekrivanja pulpe ovaca. Konstatovana je blaga do umjerena upala pulpnog tkiva i formiran dentinski most kod gotovo svih uzoraka. U studiji Radovića i saradnika primijenjen je identičan metod sinteze kalcijum aluminata kao u ovoj doktorskoj disertaciji, što je uz fizičko-hemijske karakteristike i sastav nanostrukturnog kalcijum aluminatnog cementa dodatno favorizovalo povoljan odgovor pulpnog tkiva [77].

Ovim nalazima odgovaraju i rezultati prethodne studije *Kai-Chun Chang i sar.* (2014.) koji su dokazali da su trikalcijum aluminatni cementi pogodni materijali za terapiju vitalne pulpe, jer pokazuju optimalnu otpornost na pritisak, kratko vrijeme vezivanja i visok stepen biokompatibilnosti i biološke aktivnosti [63].

Dobar odgovor pulpnog tkiva na primjenu kalcijum aluminatnog cementa Ceramir® Crown & Bridge (ranije XeraCem™), je potvrđen i u opsežnoj studiji *Pameijera i saradnika* (2008.), koja je ,između ostalog, obuhvatala procjenu reakcije pulpe majmuna (*Rhesus macaques*) nakon cementiranja inleja V klase Ceramir C & B cementom. Rezultat je bio odsustvo znakova inflamacije pulpe nakon 30 i nakon 85 dana, uz izuzetak jednog uzorka. Ovako dobar rezultat autori pripisuju pozitivnim karakteristikama Ceramira u postupku trajnog cementiranja fiksnih protetskih radova. Ovaj materijal posjeduje dobru marginalnu adaptaciju, dobru retenciju, ne izaziva iritacije gingive i subjektivnu osjetljivost [60].

Kineski naučnici *Surintanasarn i saradnici* (2017) su studijom novijeg datuma ustanovili da kalcijum-aluminatni cementi mogu poboljšati i remineralizaciju uslijed oslobođanja fluora i veće pH vrijednosti [239].

U ovom istraživanju su konstatovani znaci dentinske regeneracije za sve materijale. Do formiranja dentinskog mosta je došlo posle mjesec dana kod svih ispitivanih materijala, na većem broju uzoraka. Ovi rezultati su u skladu sa ranijim saznanjima da se formiranje reparativnog dentina javlja kod 83% molara pacova, 28 dana nakon što je izvršeno prekrivanje pulpe [240]. Dentinski most je bio najkompletniji na uzorcima zuba prekrivenim kalcijum aluminatom, dok se kod većine ostalih uzoraka može opisati kao nepotpuno formiran. Nepotpuno formiran dentinski most je moguće posljedica kratkog opservacionog perioda od 30 dana. Najbolje formiran dentinski most poslije prekrivanja pulpe kalcijum aluminatom vjerovatno dugujemo unaprijeđenim fizičko-hemijskim osobinama ali i izraženoj bioaktivnosti kalcijum aluminata koja je potvrđena i u brojnim studijama drugih istraživača [38,51,54].

*Loof i saradnici* (2008.) su potvrdili bioaktivnost kalcijum aluminatnih cemenata, za razliku od GJC čija je biokativnost izostala tokom perioda testiranja. Najveći stepen bioaktivnosti je pokazao čisti kalcijum aluminatni cement, gdje je relativno debeli sloj hidroksiapatita formiran već nakon 24 časa. Sa hemijske tačke gledišta postoji nekoliko preduslova koje treba ispuniti kako bi došlo do formiranja HA. Mora postojati stanje zasićenosti jonima, što znači da koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4^{2-}$  moraju biti iznad granice rastvorljivosti HA. Hidroksiapatit je najstabilnije jedinjenje u sistemu kalcijum fosfata na pH između 4.2 i 12, te je važno imati negativan naboј na površini kako bi došlo do precipitacije HA na površini materijala. Negativno nanelektrisana površina privlači  $\text{Ca}^{2+}$  ione u SBF-u, stvara se pozitivni površinski sloj koji zauzvrat privlači  $\text{PO}_4^{2-}$  u SBF. Kada se postigne zasićenje u rastvoru, nastupa precipitacija kristala HA. Pojednostavljeno prikazano hemijskom formulom za CA to izgleda ovako:  $3(\text{CaOAl}_2\text{O}_3) + 12\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_3(\text{Al(OH)}_4)_2(\text{OH}) + 4\text{Al(OH)}_3$ . Reakcija se može opisati i sa mineralima koji se formiraju: Kalcijum aluminat+voda → Katoit+Gips; Prisustvo tjelesnih tečnosti predstavlja pokretačku snagu koja promoviše formiranje HA preko mineralnog Katoita. U slučaju GJC koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4^{2-}$  nije bila ni približno velika kao kod CA [50].

*Bird i saradnici* (2012.) su ustanovili da za razliku od kalcijum aluminatnog cementa Capasia, čija je penetracija u dentinske tubule uočena na svim nivoima, nije konstatovan prođor MTA u dentinske tubule niti na jednom nivou. Oba cementsa su pokazala sposobnost formiranja apatitnih kristala, koji po strukturi odgovaraju hidroksiapatitu (što potvrđuju SEM, EDXA i XRD analize) [19].

Zahvaljujući sposobnosti da stimuliše taloženje hidroksiapatita u kontaktu sa SBF, kalcijum aluminatni cement se pokazao pogodnim materijalom za biomedicinske aplikacije, uz preporuku za dalnjim ispitivanjima, prema rezultatima *Oliveire i sar.* 2015 [54].

Postoje i neka istraživanja u kojima je biološka aktivnost kalcijum aluminata bila inferiornija u odnosu na MTA. *Oliveira i sar.* (2013.) su iznijeli zapažanje da i MTA i CAEC pokazuju biološku aktivnost u kontaktu sa SBF, ali da MTA cement otpušta više jona kalcijuma i promoviše viši pH u odnosu na eksperimentalni cement na bazi kalcijum aluminata. Ovo objašnjava činjenicom da  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{OH}^-$  joni otpušteni iz MTA, uglavnom zbog disocijacije kalcijum hidroksida reaguju sa jonima fosfora iz solucije KSBF, što je rezultiralo precipitacijom kalcijum fosfata na površini MTA cementa. Ova faza je slična sastavu neorganske komponente kostiju, te dolazi do biološke integracije i stvaranja hemijske veze između kostiju i površine apatita [53].

Eksperimentalni kalcijum silikatni cementi su ,u ovoj studiji, pokazali nešto bolje rezultate u poređenju sa MTA, što je u skladu sa studijom Asgary i sar. (2008.), gdje su takođe novi dentalni cementi slične strukture pokazali bolji biološki odgovor pulpnog tkiva i deblji dentinski most od MTA. Ovo objašnjavaju činjenicom da u sastav novih cemenata ulaze različita jedinjenja kalcijuma, koja predstavljaju bogat izvor jona Ca i P, važnih u procesu stvaranja hidroksiapatita [228].

Rezultati ovih istraživanja su u skladu i sa rezultatima studije *Bajić i saradnika* (2016.) koji su ove materijale testirali u postupku direktnog prekrivanja pulpe Vijetnamskih svinja. Autori ove studije biokompatibilnost eksperimentalnih kalcijum silikatnih cemenata objašnjavaju njihovim povoljnim dejstvom na reparatorne sposobnosti pulpe, zahvaljujući prvenstveno fizičko-hemijskim karakteristikama i hemijskom sastavu materijala, koji u najvećem procentu čine dikalcijum i trikalcijum silikat [241].

U studiji Opačić Galić V. i sar. (2017.) u kojoj je rađeno DPP kunića nanostruktturnim kalcijum silikatnim cementima, nanostruktturni biomaterijali CS i CS-HA su uzrokovali blagu do umerenu zapaljensku reakciju pupnog tkiva kunića samo u neposrednoj blizini implantiranog materijala. Najmanje izražena zapaljenska rekcija pulpnog tkiva kunića uočena je kod materijala CS ( $1,83 \pm 0,75$ ), zatim kod MTA i CS-HA ( $2,67 \pm 1,53$ ,  $3,00 \pm 0,63$ ) [222].

Nanostruktturni biomaterijali na bazi kalcijum aluminata ispitivani u postupku direktnog prekrivanja pulpe pacova Wistar soja su potvrđili biokompatibilnost i stekli status

materijala za potencijalnu primjenu u tretmanu vitalne pulpe, ali svakako je preporuka da se dobijeni rezultati provjere u nekim budućim kliničkim studijama.

## **7. ZAKLJUČAK**

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

1. Nanostrukturi biomaterijal na bazi kalcijum aluminata nije ispoljio citotoksičnost na humanim plućnim fibroblastima. Konstatovan je veoma visok procenat preživljavanja ćelija (89,5 %) i pri najvećoj primjenjenoj koncentraciji materijala.
2. Nanostrukturi biomaterijal na bazi kalcijum aluminata nije pokazao genotoksični potencijal na humanim plućnim fibroblastima. Procenat oštećenja DNK pri svim primjenjenim koncentracijama je bio na nivou netretiranih kontrolnih ćelija.
3. Nanostrukturi biomaterijal na bazi kalcijum aluminata je potvrdio biokompatibilnost u *in vivo* uslovima, na eksperimentalnim životinjama, implantacijom materijala u potkožno tkivo pacova.
4. Potkožna implantacija nanostrukturnih biomaterijala na bazi CA je poslije 7 dana izazvala umjerenu zapaljensku reakciju vezivnog tkiva, poslije 15 dana je došlo do značajnijeg opadanja intenziteta zapaljenske reakcije i formiranja tanke kapsule, a poslije 30 dana je uočena debela fibrozna kapsula sa blago narušenim integritetom vezivnog tkiva.
5. Nakon DPP nanostrukturnim biomaterijalom na bazi kalcijum aluminata kod većine ispitivanih uzoraka zuba je konstatovano odsustvo zapaljenja ili svega nekoliko prisutnih raštrkanih upalnih ćelija. Bakterije nisu bile prisutne niti u jednom uzorku.
6. Nanostrukturi biomaterijal na bazi kalcijum aluminata je indukovao stvaranje kompletognog dentinskog mosta.

## 8. LITERATURA

1. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent.* 2001; 86(2):203–209.
2. Moharamzadeh K, Brook IM, Noort R. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials.* 2009;(2):514-548.
3. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. Biocompatibility of Dental Materials. Verlag GmbH Heidelberg Germany. Springer; 2009.
4. Kostić M, Krunić N, Najman S. Contemporary aspect of dental materials biocompatibility examination tests. *Acta Stom. Naissi.* 2010;26(62):1007–1016.
5. Eid AA, Niu LN, Primus CM, Opperman LA, Pashley DH, Watanabe I, et al. In Vitro Osteogenic/Dentinogenic Potential of an Experimental Calcium Aluminosilicate Cement. *J Endod.* 2013;39(9):1161-6.
6. Garcia Lda FR, Huck C, Menezes de Oliveira L, de Souza PP, de Souza Costa CA. Biocompatibility of new calcium aluminate cement: tissue reaction and expression of inflammatory mediators and cytokines. *J Endod.* 2014;40(12):2024-9.
7. Garcia Lda F, Chinelatti MA, Rossetto HL, Pires-de-Souza Fde C. Solubility and desintegration of new calcium aluminate cement (EndoBinder) containing different radiopacifying agents. *J Endod.* 2014;40(2):261-5.
8. Kraft L. Calcium Aluminate based Cement as Dental Restorative Materials. *Acta Universitatis Upsaliensis Uppsala.* Sweden. 2002.
9. Dijken JWV, Grönberg KS. A two-year clinical evaluation of a new calcium aluminate cement in Class II cavities. *Acta odontol Scand.* 2003;61:235-240.
10. Jefferies SR, Pameijer CH, Appleby DC, Boston D, Galbraith C, Loof J, et al. Prospective Observation of a New Bioactive Luting Cement: 2-Year Follow-Up. *Journal of Prosthodontics.* 2012;21:33–41.
11. Garcia Lda FR. Calcium aluminate based-cements for endodontic application. *J J Dent Res.* 2014;1(2):008.
12. Silva EJ, Herrera DR, Rosa TP, Duque TM, Jacinto RC, Gomes BP, et al. Evaluation of cytotoxicity, antimicrobial activity and physicochemical properties of a calcium aluminate-based endodontic material. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(1):61-7.

13. Pires-de-Souza Fde C, Moraes PC, Garcia Lda F, Aguilar FG, Watanabe E. Evaluation of pH, calcium ion release and antimicrobial activity of a new calcium aluminate cement. *Braz Oral Res.* 2013;27(4):324-30.
14. Garcia Lda FR, Rossetto HL, De Carvalho Panzeri F, Pires-de-Souza Fde. Shear bond strength of novel calcium aluminate-based cement (EndoBinder) to root dentine. *Eur J Dent.* 2014;8(4):498–503.
15. Pandolfelli VC, Oliveira IR, Jacobovitz M, Rossetto HL. Aluminous cement-based composition for application in endodontics and cementitious product obtained thereof. Patent n. WO2009067774. 2011.
16. Spinola de Castro-Raucci LM, Regina de Oliveira I, Teixeira LN, Adalberto Luiz Rosa AL, Tambasco de Oliveira P, Jacobovitz M. Effects of a novel calcium aluminate cement on the early events of the progression of osteogenic cell cultures. *Braz. Dent. J.* 2011;22(2).
17. Oliveira IR, Pandolfelli VC, Jacobovitz M. Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. *IEJ.* 2010; 43:1069–1076.
18. Porter ML, Berto A, Primus CM, Watanabe I. Physical and Chemical Properties of New-generation Endodontic Materials. *JOE.* 2010;36(3).
19. Bird DC, Komabayashi T, Guo L, Opperman A, Spears R. In Vitro Evaluation of Dentinal Tubule Penetration and Biomineralization Ability of a New Root-end Filling Material. *J Endod.* 2012;38(8):1093–1096.
20. Bhagat K, Goel M, Bhagat N. Root End Filling Materials and Recent Advances: A Review. *EC Dental Science.* 2017;46-57.
21. Washington JT, Schneiderman E, Spears R, Fernandez CR, He J, Lynne A, et al. Biocompatibility and Osteogenic Potential of New Generation Endodontic Materials Established by Using Primary Osteoblasts. *J Endod.* 2011;37:1166–1170.
22. Wei W, Qi YP, Nikonov SY, Niu LN, Regina RLW, Mao J, et al. Effects of an Experimental Calcium Aluminosilicate Cement on the Viability of Murine Odontoblast-like Cells. *J Endod.* 2012;1–7.
23. Sunnegaardh-Gronberg K, Peutzfeldt A, van Dijken JWV. Hardness and in vitro wear of a novel ceramic restorative cement. *Eur J Oral Sci.* 2002;110:1.

24. Sunnegårdh-Grönberg K, van Dijken JWV. Surface roughness of a novel ceramic restorative cement" after treatment with different polishing techniques in vitro. *Clin Oral Investig.* 2003;7(1):27-31.
25. Sunnegårdh-Grönberg K, Peutzfeldt A, Van Dijken JWV. Flexural strength and modulus of a novel ceramic restorative cement intended for posterior restorations as determined by a three-point bending test. *Acta Odont Scand.* 2003;61:(2)87-92.
26. Hulme PA, Heini PF, Persson T, Spengler H, Björklund K, Hermansson L. et al. Mechanical Evaluation of a Bioactive Calcium Aluminate Cement for Vertebral Body Augmentation. *Eur Cells and Mater.* 2006;11(1):42.
27. Pameijer CH, Zmener O, Serrano SA, Godoy FG. Sealing properties of a calcium aluminate luting agent. *Amer jour of dent.* 2010;23(2):121-4.
28. Jefferies SR, Fuller AE, Boston DW. Preliminary Evidence That Bioactive Cements Occlude Artificial Marginal Gaps. *Jour of Esthet and Rest Dent.* 2015;27(3):155–166.
29. Garcia LFR, Aguilar FG, Sabino MG, Rossetto HL, Pires de-Souza FCP. Mechanical and microstructural characterisation of new calcium aluminate cement (EndoBinder). *Advan in Appl Ceram.* 2011;110(8):469-475.
30. Cammilleri J. Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. *IEJ.* 2010;(43):231–240.
31. International Standards organization. Dental root canal sealing materials. 2001;6876:7-8.
32. Aguilar FG, Garcia LFR, Rossetto HL, Pardini LC, Fernanda de Carvalho Panzeri, Pires-de-Souza FCP. Radiopacity Evaluation of Calcium Aluminate Cement Containing Different Radiopacifying Agents. *JOE.* 2011;37(1):67-71.
33. Luz AP, Pandolfelli VC. Physical properties and hydration evolution of dispersant containing calcium aluminate cement compositions for endodontic applications. *Cerâmica.* 2014;(60):366-370.
34. Oliveira IR, Andradea TL, Daniele Coelho Matsuo, Renata Martins Parreira RM, Jacobovitzb M, Pandolfellic VC. Influence of Radiopacifier Additives on Calcium Aluminate Cement Properties. *Materials Research.* 2014;17(5):1295-1301.

35. Ann KY, Cho CG. Corrosion Resistance of Calcium Aluminate Cement Concrete Exposed to a Chloride Environment. *Materials*. 2014;7:887-898.
36. Liu WN, Chang J, Zhu YQ, Zhang M. Effect of tricalcium aluminate on the properties of tricalcium silicate–tricalcium aluminate mixtures: setting time, mechanical strength and biocompatibility. *IEJ*. 2011;(44):41–50.
37. Han Oh S, Choi SY, Lee YK, Kim KN. Preparation of calcium aluminate cement for hard tissue repair: Effects of lithium fluoride and maleic acid on setting behavior, compressive strength, and biocompatibility. *Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res*. 2002;62:593–599.
38. Engqvist H, Loof J, Uppström S, Phaneuf MW, Jonsson JC, Leif Hermansson L, et al. Transmittance of a Bioceramic Dental Restorative Material Based on Calcium Aluminate. *Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 2004;(69):94–98.
39. Josipović R, Živković S, Janković O, Gajić N, I. Kuzmanović Radman I, Đeri A. Marginal microleakage of newly synthesized nanomaterials based on calcium aluminate systems. *The Book of Abstracts. Rosov Pin Belgrade*. 2017;100p.
40. Sunnegårdh-Grönberg K, van Dijken JW, Lindberg A, Hörstedt P. Interfacial adaptation of a calcium aluminate cement used in class II cavities in vivo. *Clin Oral Investig*. 2004;8(2):75-80.
41. Berglunda A, Hulterströma AK , Gruffmanb E, van Dijken JWV. Dimensional change of a calcium aluminate cement for posterior restorations in aqueous and dry media. *Dent Mater*. 2006;(22):470–476.
42. Loof J, Engqvist H, Ahnfelt NO. Mechanical properties of a permanent dental restorative material based on calcium aluminate. *J of Mater Sci Mater in Med*. 2003;14:1033-1037.
43. Loof J, Engqvist H, Ortega GG, Ahnfelt NO, Hermansson L. Mechanical property aspects of a biomimetic based dental restorative system. *Key Eng Mater*. 2005;284-286.
44. Van Dijken JW, Sunnegårdh-Grönberg K. A calcium aluminate cement as restorative material in Class V cavities. *Swed Dent J*. 2004;28(3):111-8.

45. Yang J, Hu X, Huang J, Chen K, Huang Z, Liu J, et al. Novel porous calcium aluminate/phosphate nanocomposites: in situ synthesis, microstructure and permeability. *Nanoscale*. 2016;8:3599-3606.
46. Williams DF. Definitions in biomaterials. Amsterdam: Elsevier. 1987.
47. Costaa CS, Heblingb J,Scheffelb DLS, Soaresc DGS, Bassoa FG, Ribeirod APD. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent mater*. 2014;(30):769–784.
48. Tadin A. Cytotoxic and genotoxic effects of contemporary esthetic restorative materials on pulpal cells and mucosal cells of oral cavity.Doctoral thesis.Zagreb; 2013.
49. Faris A, Engqvist H, Lööf J, Mikael OM, Hermansson L. In Vitro Bioactivity of Injectable Ceramic Orthopaedic Cements. *Key Eng Mater*. 2006;309:833-836.
50. Loof J, Svahna F, Jarmara T, Engqvist H, Pameijer CH. A comparative study of the bioactivity of three materials for dental applications. *Dent Mater*.2008;24:653-659.
51. Engstrand J, Unosson E, Engqvist H. Hydroxyapatite Formation on a Novel Dental Cement in Human Saliva. *ISRN Dentistry*. 2012;1-7.
52. Carmo S, Néspoli FFP, Bachmann L, Miranda CES, Castro-Raucci LMS, Oliveira IR et al. Influence of early mineral deposits of silicate- and aluminate-based cements on push-out bond strength to root dentine. *Int Endod J*. 2018;51(1):92-101.
53. Oliveira IR, Andrade TL, Jacobovitz M, Pandolfelli VC. Bioactivity of Calcium Aluminate Endodontic Cement. *J Endod*. 2013;39:774–778.
54. Oliveiraa IR, Andradea TL, Parreira RM, Jacobovitzb M, Pandolfelli VC. Characterization of Calcium Aluminate Cement Phases when in Contact with Simulated Body Fluid. *Mater Res*. 2015;18(2): 382-389.
55. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations.J Dent Suppl.2 2004;22:S6-S11.
56. Riss TL, Moravec RA, Niles AL. Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. *Methods Mol Biol*. 2011;740:103-14.
57. Bakopoulou A, Mourelatos D, Tsifoglou AS, Giassin NP, Mioglou E, Garefis P. Genotoxic and cytotoxic effects of different types of dental cement on normal cultured human lymfocites. *Mutation Res*. 2009;672:103-112.

58. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Efect of post-polymerization treatments of citotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl. Oral Sci.* 2006;14:203-207.
59. Franz A, Konradsson K, König F, Dijken JWV, Schedle A. Cytotoxicity of a calcium aluminate cement in comparison with other dental cements and resin based materials. *Acta Odontol Scand.* 2006;64:1-8.
60. Pameijer CH, Jefferies SR, Lööf J, Hermansson L, Wiksell E. In vitro and in vivo biocompatibility tests of XeraCem™. *J Dent Res.* 2008;87(B):3097.
61. Silva EJNL, Herrera DR, Almeida JFA, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells by three root repair materials. *IEJ.* 2012;45:815-820.
62. Clafshenkel WP, Rutkowski JL, Palchesko RN, Romeo JD, McGowan KA, Gawalt ES et al. A novel calcium aluminate-melatonin scaffold enhances bone regeneration within a calvarial defect. *J. Pineal Res.* 2012;53:206–218.
63. Chang KC, Chang CC, Huang YC, Chen MH, Lin FH, Lin CP. Effect of Tricalcium Aluminate on the Physicochemical Properties, Bioactivity, and Biocompatibility of Partially Stabilized Cements. *PLOS ONE.* 2014;9:1-9.
64. Castro-Raucci LMS, Teixeira LN, Oliveira IR, Raucci-Neto W, Jacobovitz M, Rosa AL, et al. Osteogenic cell response to calcium aluminate-based cement. *IEJ.* 2017;50(8):771-779.
65. Gutiérrez AIO, Bocardo JCE, Robles RMA, Hernández DAC, Ramírez MMGS, Hernández PJR, et al. Development of LiCl-containing calcium aluminate cement for bone repair and remodeling applications. *Mater Sci and Eng.* 2017;70:357–363.
66. Soares DG, Rosseto HL, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, Costa CAS. Chitosan-collagen biomembrane embedded with calcium-aluminate enhances dentinogenic potential of pulp cells. *Braz. Oral Res.* 2017;30(1):e54.
67. Oliveira IR, Ranieroa LJ, Leitea VMC, Castro-Raucci LMS, Oliveira PT, Pandolfellic VC. In vitro apatite-forming ability of calcium aluminate blends. *Ceram Int.* 2017;43(13) :10071-10079.
68. Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimbi FW. Laboratory Animal Medicine. 2nd edition. American College of Laboratory Animal Medicine Series. Academic Press; 2002.

69. Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. Principles of laboratory animal science a contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results. New York; Elsevier, Amsterdam; 1993.
70. Muminovic M, Mujezinović I, Smajlović A, Velić R, Omeragić J. Uzgoj bolesti i terapija laboratorijskih životinja. Elmita; Veterinarski fakultet. Sarajevo;2006.
71. Aguilar FG, Garcia FR, Pires-de-Souza FCP. Biocompatibility of New Calcium Aluminate Cement (EndoBinder). JOE. 2012;38(3):367-371.
72. Garcia LFR, Huck C, Scardueli CR, Costa CAS. Repair of Bone Defects Filled with New Calcium Aluminate Cement (EndoBinder). JOE. 2015;1-7.
73. Palmquist A, Jarmar T, Hermansson L, Emanuelsson L, Taylor A, Taylor M, et al. Calcium aluminate coated and uncoated free form fabricated CoCr implants: a comparative study in rabbit. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009;91(1):122-7.
74. Romeo J, McGowan K, Palchesko R, Clafshenkel WP, Rutkowski AJ, Gawalt E, et al. A novel calcium aluminate-melatonin scaffold enhances bone regeneration within a calvarial defect. Jour of Pin Res. 2012;8-31.
75. Miljkovic ND, Cooper GM, Hott SL, Disalle BF, Gawalt ES, Smith DM, et al. Calcium aluminate RGD-modified calcium aluminate and beta-tricalcium phosphate implants in a calvarial defect. J Craniofac Surg. 2009;20(5):1538-43.
76. Kramer PR, Woodmansey KF, White R, Primus CM, Opperman LA. Capping a Pulpotomy with Calcium Aluminosilicate Cement: Comparison to Mineral Trioxide Aggregates. J Endod. 2014;40(9): 1429–1434.
77. Radović I, Davidović L, Stojanović N, Ćuk M, Živković S, Jokanović V. Direct pulp capping with novel nanostructural material based on calcium aluminate cement. The Book of Abstracts. Rosov Pin Belgrade. 2017;93p.
78. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part III: Clinical Applications, Drawbacks, and Mechanism of Action. J Endod. 2010;36:400–413.
79. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. IEJ. 2007;40:462–470.
80. 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. Biomater. 2004;25(5):787-93.

81. Sluyk SR, Moon PC, Hartwell GR. Evaluation of Setting Properties and Retention Characteristics of Mineral Trioxide Aggregate When Used as a Furcation Perforation Repair Material. *J Endod.* 1998;24(11):768-771.
82. Fridland M, Rosado R. Mineral Trioxide Aggregate (MTA) Solubility and Porosity with Different Water-to-Powder Ratios. *J Endod.* 2003;29(12):814-817.
83. Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent.* 2008;(11) 4:141-143.
84. Wu MK, Kontakiotis EG, Wesselink PR. Long-term seal provided by some root end filling materials. *J Endod.* 1998;24: 557–560.
85. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end Filling Materials Alter Fibroblast Differentiation. *J Dent Res.* 2004;83(5):408-413.
86. Holland R Jose',Filho JAO, Souza V, Nery MN, Bernabe'PFE, Junior ED. Mineral Trioxide Aggregate Repair of Lateral Root Perforations. *J Endod.* 2001;27(4):261-264.
87. Yaltirk M, Ozbas H, Bilge Bilgic B, Issever H. Reactions of Connective Tissue to Mineral Trioxide Aggregate and Amalgam. *J Endod.* 2004;30(2):96-99.
88. Baek SH, Plenk H, Kim S. Periapical Tissue Responses and Cementum Regeneration with Amalgam, SuperEBA, and MTA as Root-End Filling Materials. *JOE.* 2005;31(6):444-448.
89. Kayahan MB, Nekoofar MH, Kazandaġ M, Canpolat C, Malkondu O, Kaptan F, et al. Effect of acid-etching procedure on selected physical properties of mineral trioxide aggregate. *IEJ.* 2009;42:1004–1014.
90. Lee YL, Lin FH, Wang WH, Ritchie HH, Lan WH, Lin CP. Effects of EDTA on the Hydration Mechanism of Mineral Trioxide Aggregate. *J Dent Res.* 2007;86(6):534-538.
91. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1999;25(3):197-205.
92. Walker MP, Diliberto A, Charles Lee. Effect of Setting Conditions on Mineral Trioxide Aggregate Flexural Strength . *J Endod.* 2006;32:334 –336.
93. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod.* 1995;21(6):295-9.

94. Coleman NJ, Nicholson JW, Awosanya K. A preliminary investigation of the in vitro bioactivity of white Portland cement. *Cem and Conc Res.* 2007;37:1518–1523.
95. Živković S, Ivanović V, Vujašković M, Teodorović N, Lukić A, Karadžić B, et al. Praktikum endodontske terapije. Data status; Beograd; 2011.
96. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Stowe S, Brink F. A qualitative X-ray analysis of white and grey mineral trioxide aggregate using compositional imaging. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17(2):187-91.
97. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater.* 2005;21(4):297-303.
98. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Ghoddusi J. SEM evaluation of pulp reaction to different pulp capping materials in dog's teeth. *Iran Endod J.* 2006;1(4):117-23.
99. Santos AD, Araújo EB, Yukimitu K, Barbosa JC, Moraes JC. Setting time and thermal expansion of two endodontic cements. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(3):e77-9.
100. Jacobovitz M, Lima RK. Treatment of inflammatory internal root resorption with mineral trioxide aggregate: a case report. *Int Endod J.* 2008;41(10):905-12.
101. Camilleri J, Formosa L, Damidot D. The setting characteristics of MTA Plus in different environmental conditions. *Int Endod J.* 2013;46(9):831-40.
102. Dreger LA, Felippe WT, Reyes-Carmona JF, Felippe GS, Bortoluzzi EA, Felippe MC. Mineral trioxide aggregate and Portland cement promote biomineralization in vivo. *J Endod.* 2012;38(3):324-9.
103. De-Deus G, de Souza MC, Sergio Fidel RA, Fidel SR, de Campos RC, Luna AS. Negligible expression of arsenic in some commercially available brands of Portland cement and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2009;35(6):887-90.
104. Lessa FCR, Aranha AMF, Hebling J, Costa CAS. Cytotoxic effects of White-MTA and MTA-Bio cements on odontoblast-like cells (MDPC-23). *Braz. Dent. J.* 2010;21(1)24-31.
105. Guven Y, Tuna EB, Dincol ME, Aktoren O. X-ray diffraction analysis of MTA-Plus, MTA-Angelus and DiaRoot BioAggregate. *Eur J Dent.* 2014;8(2):211–215.

106. Park JW, Hong SH, Kim JH, Lee SJ, Shin SJ. X-Ray diffraction analysis of white ProRoot MTA and Diadent BioAggregate. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontol.* 2010;109:155-158.
107. Hassanien EE, Abu-Seida AM, Hashem AA, Khanbash SS. Histologic Evaluation of Furcation Perforation Treated with Mineral Trioxide Aggregate and Bioaggregate. *Asian J Anim Sci.* 2015;9(4):148-156.
108. Chung CR, Kim E, Shin SJ. Biocompatibility of Bioaggregate cement on human pulp and periodontal ligament (PDL) derived cells. *J Korean Acad Conserv Dent.* 2010;35(6):473-478.
109. Yalcin M, Arslan U, Dundar A. Evaluation of antibacterial effects of pulp capping agents with direct contact test method. *Eur J Dent.* 2014;8(1):95–99.
110. Singh H, Kaur M, Markan S, Kapoor P. Biodentine: A Promising Dentin substitute. *J Interdiscipl Med Dent Sci.* 2014;2(5):140.
111. Camilleri J, Kralj P, Veber M, Sinagra E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. *IEJ.* 2012;45:737–743.
112. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater.* 2013;29(2):20-28.
113. Tanalp J, Karapınar-Kazandağ M, Dölekoğlu S, Kayahan MB. Comparison of the radiopacities of different root-end filling and repair materials. *The Sci World J.* 2013;1-4.
114. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, et al. Response of human dental pulp capped with Biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2013;39(6):743-7.
115. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF- $\beta$ 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* 2012;45(5):439-48.
116. Shayegan A, Jurysta C, Atash R, Petein M, Abbeele AV. Biodentine used as a pulp-capping agent in primary pig teeth. *Pediatr Dent.* 2012;34(7):e202-8.
117. Pawar AM, Kokate SR, Shah RA. Management of a large periapical lesion using Biodentine TM as retrograde restoration with eighteen months evident follow up. *J Conserv Dent.* 2013;16(6):573-575.

118. Chalas R, Mielko E, Zubrzycka-Wrobel J, Nowak J. A chemical activity evaluation of two dental calcium silicate-based materials. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* 2015;28(2):89-91.
119. Kermani S, Megat Abdul Wahab R, Zarina Zainol Abidin I, Zainal Ariffin Z, Senafi S, Hisham Zainal Ariffin S. Differentiation capacity of mouse dental pulp stem cells into osteoblasts and osteoclasts. *Cell J.* 2014;16(1):31-42.
120. Mestieri LB, Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Biocompatibility and bioactivity of calcium silicate-based endodontic sealers in human dental pulp cells. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(5):467-71.
121. Cornelio G, Lívia A. Cytotoxicity and genotoxicity of calcium silicate-based cements on an osteoblast lineage. *Braz oral res.* 2016;30(1):e48.
122. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PF, de Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *J Endod.* 2009;35(2):256-260.
123. Petrović V, Opačić-Galić V, Jokanović V, Jovanović M, Basta Jovanović G, Živković S. Biocompatibility of a new nanomaterial based on calcium silicate implanted in subcutaneous connective tissue of rats. *Acta Veter.* 2012;62(6):697-708.
124. Saghir MA, Tanideh N, Garcia-Godoy F, Lotfi M, Karamifar K, Amanat D. Subcutaneous Connective Tissue Reactions to Various Endodontic Biomaterials: An Animal Study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2013;7(1):15–21.
125. Batur YB, Acar G, Yalcin Y, Dindar S, Sancaklı H, Erdemir U. The cytotoxic evaluation of mineral trioxide aggregate and bioaggregate in the subcutaneous connective tissue of rats. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18(4):e745-51.
126. Sitaru A, Hantoiu T, Monea M. Tissue reaction induced by dental pulp capping materials. *Eur Sci J.* 2014;10(9):95-104.
127. Bramante CM, Kato MM, Assis GF, Duarte MA, Bernardineli N, Moraes IG, et al. Biocompatibility and setting time of CPM-MTA and white Portland cement clinker with or without calcium sulfate. *J Appl Oral Sci.* 2013;21(1):32-6.
128. Bósio CC, Felippe GS, Bortoluzzi EA, Felippe MC, Felippe WT, Rivero ER. Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggregate

- (MTA) Fillapex, DiaRoot BioAggregate and MTA. *Int Endod J.* 2014;47(7):667-74.
129. Minotti PG, Ordinola-Zapata R, Midena RZ, Marciano MA, Cavenago BC, Bramante CM, et al. Rat subcutaneous tissue response to calcium silicate containing different arsenic concentrations. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(1):42-8.
  130. Khalil WA, Eid NF. Biocompatibility of BioAggregate and mineral trioxide aggregate on the liver and kidney. *Int Endod J.* 2013;46(8):730-7.
  131. Bidar M, Naghavi N, Mohtasham N, Sheik-Nezami M, Fallahrastegar A, Afkhami F, et al. Mineral trioxide aggregate and portland cement for direct pulp capping in dog: a histopathological evaluation. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2014;8(3):134-40.
  132. Shayegan A, Petein M, Vanden Abbeele A. The use of beta-tricalcium phosphate, white MTA, white Portland cement and calcium hydroxide for direct pulp capping of primary pig teeth. *Dent Traumatol.* 2009;25(4):413-9.
  133. Popović Bajić M, Danilović V, Prokić B, Prokić B, Jokanović V, Živković S. Direct Pulp Capping Using Biodentine. *Serb Dent J.* 2014; 61(2):65-70.
  134. Kim J, Song YS, Min KS, Kim SH, Koh JT, Lee BN, et al. Evaluation of reparative dentin formation of ProRoot MTA, Biodentine and BioAggregate using micro-CT and immunohistochemistry. *Restor Dent Endod.* 2016;41(1):29-36.
  135. Hasheminia SM, Feizi G, Razavi SM, Feizianfard M, Gutknecht N, Mir M. A comparative study of three treatment methods of direct pulp capping in canine teeth of cats: a histologic evaluation. *Lasers Med Sci.* 2010;25(1):9-15.
  136. Chen I, Karabucak B, Wang C, Wang HG, Koyama E, Kohli MR, et al. Healing after root-end microsurgery by using mineral trioxide aggregate and a new calcium silicate-based bioceramic material as root-end filling materials in dogs. *J Endod.* 2015;41(3):389-99.
  137. Camargo SEA, Camargo CHR, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *IEJ.* 2009;42:227–237.
  138. Hirschman WR, Wheater MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *J Endod.* 2012;38(3):385–8.

139. Gandolfi MG, Siboni F, Botero T, Bossù M, Riccitiello F, Prati C. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2015;13(1):43-60.
140. Poggio C, Ceci M, Dagna A, Beltrami R, Colombo M, Chiesa M. In vitro cytotoxicity evaluation of different pulp capping materials: a comparative study. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2015;66(3):181-8.
141. Hwang YC, Kim DH, Hwang IN, Song SJ, Park YJ, Koh JT, et al. Chemical constitution, physical properties, and biocompatibility of experimentally manufactured Portland cement. *J Endod.* 2011;37(1):58-62.
142. Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, Li L, Zheng YF, Häkkinen L, et al. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod.* 2013;39(4):478-83.
143. Zhang S, Yang X, Fan M. BioAggregate and iRoot BP Plus optimize the proliferation and mineralization ability of human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2013;46(10):923-9.
144. Lim ES, Park YB, Kwon YS, Shon WJ, Lee KW, Min KS. Physical properties and biocompatibility of an injectable calcium-silicate-based root canal sealer: in vitro and in vivo study. *BMC Oral Health.* 2015;15:129.
145. Martelo RB, Tanomaru JMG, Viapiana R, Berbert FLCV, Bernardi MIB, Filho MT. Calcium Silicate-Based Cements Associated with Micro- and Nanoparticle Radiopacifiers: Physicochemical Properties and Bioactivity. *2015;1-7.*
146. Niu L, Watson D, Thames K, Primus CM, Bergeron BE, Jiao K, et al. Effects of a discoloration-resistant calcium aluminosilicate cement on the viability and proliferation of undifferentiated human dental pulp stem cells. *Sci Reports.* 2015;5:171-177.
147. Huck C, Barud HS, Basso FG, Costa CAS, Hebling J, Garcia LFR. Cytotoxicity of New Calcium Aluminate Cement (EndoBinder) Containing Different Radiopacifiers. *Braz Dent J.* 2017;28(1):57-64.
148. Liu W, Chang J, Yue Z. Physicochemical properties and in vitro biocompatibility of a hydraulic calcium silicate/tricalcium aluminate cement for endodontic use. *J Biomed Mater Res Part B.* 2012;100B:1257–1263.

149. Kohout GD, He J, Primus CM, Opperman LA, Woodmansey KF. Comparison of Quick-Set and mineral trioxide aggregate root-end fillings for the regeneration of apical tissues in dogs. *J Endod.* 2015;41(2):248-52.
150. Simić SV. Antimikrobnna, citotoksična i genotoksična aktivnost novosintetisanih kompleksa paladijuma i platine sa 2-(difenilfosfino) benzaldehid-1-adamantoilhidrazonom. Doktorska disertacija. Beograd; 2016.
151. Chen CC, Shie MY, Ding SJ. Human dental pulp cell responses to new calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J.* 2011;44(9):836-42.
152. Chen YZ, Lü XY, Liu GD. A novel root-end filling material based on hydroxyapatite, tetracalcium phosphate and polyacrylic acid. *Int Endod J.* 2013;46(6):556-64.
153. De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J.* 2005 ;38(9):604-9.
154. Victoria-Escandell A, Ibañez-Cabellos JS, de Cutanda SB, Berenguer-Pascual E, Beltrán-García J, García-López E, et al. Cellular Responses in Human Dental Pulp Stem Cells Treated with Three Endodontic Materials. *Stem Cells Int.* 2017;1-14.
155. Schwarze T, Fiedler I, Leyhausen G, Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *Jour of Endod.* 2002;28:784–6.
156. Sepet E, Pinar A, Ilhan B, Ulukapi I, Bilir A, Tuna S. Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line in vitro. *Quintessence Int.* 2009;40(8):55-61.
157. Testarelli L, Nocca G, Lupp A, Pacifici L, Pompa G', Vozza I et al. Biocompatibility of root canal filling materials: differences between vitality and functionality tests. *Eur J of inflamat.* 2012;10(1):105-110.
158. Silva EJ, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod.* 2013;39(2):274-7.
159. Modareszadeh MR, Chogle SA, Mickel AK, Jin G, Kowsar H, Salamat N et al. Cytotoxicity of set polymer nanocomposite resin root-end filling materials. *Int Endod J.* 2011;44(2):154-61.

160. Keiser K, Johnson C, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *Jour of Endod.* 2000;26(5):288-291.
161. Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. (1970). Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature.* 1970;227:168–170.
162. Bouillaguet S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *Jour of Endod.* 2006;32: 989–92.
163. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW et al. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *Jour of Endod.* 2011;37:673–7.
164. Leonardo RT, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *Jour of Endod.* 2000;26: 328–30.
165. Beltes P, Koulaouzidore E, Kotoula V, Kortsaris AH. In vitro evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxidebasedroot canal sealers. *Endod and Dent Traum.* 1995;11:245–9.
166. Hakki SS, Bozkurt BS, Hakki EE, Belli S. Effect of Mineral trioxide aggregate on cell survival, gene expression associated with mineralized tissues, and biomineralization of cementoblasts. *J Endod.* 2009;35:513-9.
167. Petrović SV. Evaluation of biological and physical properties of nanostructural biomaterials based on active calcium silicate systems and hydroxiapatite. Doctoral dissertation.Belgrade; 2014.
168. Ma J, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of two novel root repair materials. *J Endod.* 2011;37(6):793-8.
169. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC, Faria MD, Lodi CS, Penha Oliveira SH. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *Jour of Endod.* 2009;35: 1577–9.
170. Cetenovic B, Prokic B, Vasilijic S, Dojcinovic B, Magic M, Jokanovic V, et al. Biocompatibility Investigation of New Endodontic Materials Based on Nanosynthesized Calcium Silicates Combined with Different Radiopacifiers. *J Endod.* 2017;43(3):425-432.
171. Jung JY, Woo SM, Lee BN, Koh JT, Nör JE, Hwang YC. Effect of Biodentine and Bioaggregate on odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2015;48(2):177-84.

172. Küçükkaya S, Gördusus MO, Zeybek ND, Müftüoğlu SF. In Vitro Cytotoxicity of Calcium Silicate-Based Endodontic Cement as Root-End Filling Materials. *Scientifica* (Cairo). 2016;2016:9203932.
173. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Canc. Res* 1988;48,4827–33.
174. Scelza MZ, Linghares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *IEJ*. 2012;(46):12–8.
175. Brzovic V, Miletic I, Zeljezic D, Mladinic M, Kasuba V, Ramic S, et al. In vitro genotoxicity of root canal sealers. *Int Endod J*. 2009;42:253e63.
176. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35:206e21.
177. Musa M, Kannan TP, Masudi SM, Rahman IA. Assessment of DNA damage caused by locally produced hydroxyapatite-silica nanocomposite using Comet assay on human lung fibroblast cell line. *Mol Cell Toxicol*. 2012;8:53-60.
178. Darrag AM, Fayyad DM. Genotoxicity of three endodontic sealers by single cell gel-electrophoresis/comet assay. *Tanta Dent Jour*. 2014;1-8.
179. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184-91.
180. Kopjar N, Želježić D, Kašuba V, Rozgaj R. Antineoplastični lijekovi kao čimbenik rizika u radnom okolišu: mehanizmi djelovanja na razini stanice i pregled metoda za otkrivanje njihovih genotoksičnih učinaka. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2010;61:121-146.
181. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*. 1995;339(1):37-59.
182. Bajrović K, Jevrić-Čaušević A, Hadžiselimović R. Uvod u genetičko inženjerstvo i biotehnologiju. INGEB, Sarajevo, 2005.
183. Kapur Pojskić L, Ed. Uvod u genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, 2. izdanje. Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju (INGEB), Sarajevo 2014.

184. Hadžiselimović R, Pojskić N. Uvod u humanu imunogenetiku. Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Sarajevo, 2005.
185. Olive LP, Banath JP. Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Clin.Cyt.* 2009;76(2):79-90.
186. Moller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;96(1):1-42.
187. Brozović G. Genotoksični i citotoksični učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na zdrave i stanice Ehrlich ascites tumora u Swiss albino miševa. Doktorski rad. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2007.
188. Collins A. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol. Biotech.* 2004;26:249–61.
189. Kido HW, Ribeiro DA, de Oliveira P, Parizotto NA, Camilo CC, Fortulan CA, et al. Biocompatibility of a porous alumina ceramic scaffold coated with hydroxyapatite and bioglass. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(7):2072-8.
190. Balasubramanyam A, Sailaja N, Mahboob M, Rahman MF, Hussain SM, Grover P. In vivo genotoxicity assessment of aluminium oxide nanomaterials in rat peripheral blood cells using the comet assay and micronucleus test. *Mutagenesis* 2009;24:245–251.
191. Hashimoto M, Imazato S. Cytotoxic and genotoxic characterization of aluminum and silicon oxide nanoparticles in macrophages. *Dent Mater.* 2015;31(5):556-64.
192. Selyunina LA, Mishenina LN, Mashkova KP, Slizhov YG. Sol-Gel Synthesis and Sorption Properties of Calcium Monoaluminate. *Rus. J. App. Chem.* 2016;89(3):394-399.
193. Jokanović V. NANOMEDICINA najveći izazov 21. veka. Data Status, Beograd, 2012.
194. Opačić-Galić V, Petrović V, Zivković S, Jokanović V, Nikolić B, Knežević-Vukčević J, et al. New nanostructural biomaterials based on active silicate systems and hydroxyapatite: characterization and genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *Int Endod J.* 2013;46(6):506-16.
195. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to mineral trioxide aggregate. *Jour of Endod.* 1998;24: 543–7.

196. Jantova S, Theiszova M, Letašiova S, Birošova L, Palou M. In vitro effects of fluor- hydroxyapatite, fluorapatite and hydroxyapatite on colony formation, DNA damage and mutagenicity. *Mutat Res.* 2008;652: 139-144.
197. Liuyun J, Yubao L, Chengdong X. Preparation and biological properties of a novel composite scaffold of nanohydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose for bone tissue engineering. *J Biomed Sci.* 2009;16:65-4.
198. Laurent P, Camps J, De Méo M, Déjou J, About I. Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material. *Dent Mater.* 2008;24(11):1486-94.
199. Zeferino GE, Bueno SEC, Oyama ML, Ribeiro AD. Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. *IEJ.* 2010;43:843–8.
200. Zhang W, Li Z, Peng B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. *IEJ.* 2010;43:769–74.
201. Kalmodia S, Sharma V, Pandeu KA, Dhawan A, Basu B. Cytotoxicity and Genotoxicity Property of Hydroxyapatite-Mullite Eluates. *Jour of Biomed Nanotech.* 2011;7:74–5.
202. Nai GA, Logar Gde A, Mori GG, Teixeira LM, Silva BC, Moraes AE, et al. Evaluation of the genotoxicity and mutagenicity of Ca<sub>3</sub>SiO<sub>5</sub>-based cement. *Braz Oral Res.* 2016;30(1):1-7.
203. Švajhler T, Filipović-Zore I, Kobler P, Macan D. The Use of Experimental Animals During Investigation of Dental Implants. *Acta Stomatol Croat.* 1997;213-220.
204. Belicza B. Pokusne životinje u znanstvenim medicinskim istraživanjima povjesno-medicinska promišljanja. na pokusne životinje u znanstvenim istraživanjima. Prvi hrvatski simpozij s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb, 1996;26 p.
205. Švajhler T. Temeljna istraživanja novog dizajna oseointegrirajućeg implantata u pasa. Disertacija. Zagreb:Stomatološki fakultet, 1996.
206. Sirois M. Laboratory Animals Medicine Principles & Procedures. St. Louis Elsevier (Mosby), ISBN: 0-323- 01944-7. 2005.
207. Gregurić GG, Gračner D, Pavičić Ž. The behaviour of laboratory animals mice and rats. *Vet. Stan.* 2015;46 (3): 197-206.

208. Ozbas H, Yaltirik M, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to compomers, composite and amalgam root-end filling materials. *Int Endod J* 2003;36:281–7.
209. Zafalon EJ, Versiani MA, de Souza CJ, Moura CC, Dechichi P. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103:e88–94.
210. Zmener O. Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod* 2004;30:348–51.
211. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Simonetti Lodi C et al. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX. *Dental Traumatology* 2012;28:452-56.
212. Figueiredo JAP, Pesce HF, Gioso MA, Figueiredo MAZ. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. *Int Endod J* 2001;34:377-385.
213. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J*. 2002;13(1):23-6.
214. Broon NJ, Martínez PAM, Muñiz GLR, Morales CT, Ángeles LHL, Bramante CM. Inflammatory response of Bioceramic material to dentin tube implantation in rats' subcutaneous tissue. *Rev. Odontol. Mex.* 2016;(20)3:174-178.
215. Martinez Lalis R, Esain ML, Kokubu GA, Willis J, Chaves C, Grana DR. Rat Subcutaneous Tissue Response to Modified Portland Cement, a New Mineral Trioxide Aggregate. *Braz Dent J* 2009;20(2):112-117.
216. Coleman NJ, Li Q. The Impact of Iodoform on the Hydration, Bioactivity and Antimicrobial Properties of White Portland Cement. *MATEC Web of Conferences*. 2017;109:1-7.
217. Farhad AR, Hasheminia S, Razavi S, Feizi M. Histopathologic evaluation of subcutaneous tissue response to three endodontic sealers in rats. *J Oral Sci*. 2011;53(1):15-21.
218. Silveira CM, Pinto SC, Zedebski Rde A, Santos FA, Pilatti GL. Biocompatibility of four root canal sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. *Braz Dent J*. 2011;22(1):21-7.

219. Demirkaya K, Can Demirdögen B, Öncel Torun Z, Erdem O, Çetinkaya S, Akay C. In vivo evaluation of the effects of hydraulic calcium silicate dental cements on plasma and liver aluminium levels in rats. *Eur J Oral Sci.* 2016;124(1):75-81.
220. Lotfi M, Vosoughhosseini S, Saghiri MA, Mesgariabbasi M, Ranjkesh B. Effect of White Mineral Trioxide Aggregate Mixed With Disodium Hydrogen Phosphate on Inflammatory Cells. *J Endod* 2009;35(5):703-5.
221. Camilleri J. A review of the methods used to study biocompatibility of Portland cement-derived materials used in dentistry. *Malta amedical ajournal* 2006;18(3):9-14.
222. Opačić-Galić V, Petrović V, Jokanović V, Živković S. Histological Evaluation of Tissue Reactions to Newly Synthesized Calcium Silicate- and Hydroxyapatite-Based Bioactive Materials: in vivo Study. *Srp Arh Celok Lek.* 2017;1-13.
223. Aminozarbian MG, Barati M, Salehi I, Mousavi SB. Biocompatibility of mineral trioxide aggregate and three new endodontic cements: An animal study. *Dent Res J.* 2012;9(1): 54–9.
224. Yavari HR, Shahi S, Rahimi S, Shakouie S, Roshangar L, Abbasi MM, et al. Connective tissue reaction to white and gray MTA mixed with distilled water or chlorhexidine in rats. *Iranian Endod J.* 2009;4(1):25–30.
225. Da Rosa WLO, Cocco AR, Silva TMD, Mesquita LC, Galarça AD, Silva AFD et al. Current trends and future perspectives of dental pulp capping materials: A systematic review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017;1-11.
226. Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res.* 2012;91(12):1166-71.
227. Takashi O, Kunihiko Y. Reparative Dentinogenesis Induced by Mineral Trioxide Aggregate:A Review from the Biological and Physicochemical Pointsof View. *Int J of Dentistry* 2009;10:40-47.
228. Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M, Ghanavati F, Rahimi H. A comparative study of histologic response to different pulp capping materials and a novel endodontic cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(4):609-14.

229. Car BD, Eng VM, Everds NE, Bounous DI. Clinical pathology of the rat. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, eds. *The Laboratory Rat*. 2nd ed. London, UK: Elsevier; 2006. pp.127–145.
230. Ćupić V, Kataranovski D, Popović N, Palić T. Fundamentals of biology, clinical pathology and therapy of undomesticated pets. Beograd; 48-58p. 1999.
231. Sangwan P, Sangwan A, Duhan J, Rohilla A. Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: a review of proposed mechanisms. *Int Endod J*. 2013;46(1):3-19.
232. 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 end white Portland cements as wound dressings. *Oral Surgery Oral Medicine and Oral Pathology* 2004;98:376-9.
233. Tziafas D, Kodonas K. Dentinogenic Specificity in the Preclinical Evaluation of Vital Pulp Treatment Strategies: A Critical Review. *Dent J*. 2015;3:133-156.
234. Salako N, Joseph B, Ritwik P, Salonen J, John P, Junaid TA. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol as pulpotomy agents in rat molar. *Dent Traumatol*. 2003;19:314–320.
235. 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. *Int Endod J*. 2008;41:128–150.
236. Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod* 2006;32:569-572.
237. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru Filho M, Esberard RM. The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *J Endod*. 2009;35:550-554.
238. Shahi S, Ghasemi N, Rahimi S, Yavari HR, Samiei M, Janani M et al. The Effect of Different Mixing Methods on the pH and Solubility of Mineral Trioxide Aggregate and Calcium-Enriched Mixture. *Iranian Endod J*. 2015;10(2):140-143.
239. Surintanasarn A, Siralertmukul K, Thamrongananskul N. Synthesized mesoporous silica and calcium aluminate cement fillers increased the fluoride

- recharge and lactic acid neutralizing ability of a resin-based pit and fissure sealant. Dent Mater J. 2017;29;36(6):706-713.
240. Watts A, Paterson RC. A comparison of pulp responses to two different materials in the dog and the rat. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1981;52:648–52.
241. Popović Bajić M, Petrović V, Opačić Galić V, Danilović V, Jokanović V, Prokić B, Prokić Bolka B, Živković S. Direct pulp capping with novel nanostructural materijals based on calcium silicate systems and hydroxyapatite. Serbian Dent J. 2016;63(4):183-192.

## BIOGRAFIJA MR SC. OGNJENKE JANKOVIĆ

Mr sc. Ognjenka Janković je rođena 28.06.1982. u Visokom, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu „Petar Petrović Njegoš“ je završila 1997. godine kao nosilac Vukove diplome, a Srednju medicinsku školu je završila 2001. godine u Banjoj Luci. Medicinski fakultet, studijski program stomatologija je završila 2009. godine sa prosječnom ocjenom 9,46 i kao stipendista Fondacije dr Milan Jelić.

Postdiplomski studij je završila sa prosječnom ocjenom 10,0, a magistarski rad pod nazivom: “Ispitivanje kvaliteta rubnog zaptivanja samonagrizajućih tečnih kompozitnih materijala“ je odbranila 26.4.2013.godine.

Specijalistički ispit iz bolesti zuba je položila 20.11.2015. i time stekla zvanje specijaliste bolesti zuba. U zvanje asistenta na Katedri za bolesti zuba je birana 2010. godine, a u zvanje višeg asistenta 2014. godine.

Član je Komore doktora stomatologije RS. Tečno govori engleski jezik, a poznaje i osnove njemačkog jezika. U toku rada na fakultetu učestvovala je na brojnim naučnim skupovima, nekoliko stručnih kurseva, te je objavila nekoliko radova iz oblasti bolesti zuba.

## Izjava 1

### IZJAVA O AUTORSTVU

**Izjavljujem  
da je doktorska disertacija**

Naslov rada : Biokompatibilnost nanostrukturnih biomaterijala na bazi kalcijum aluminata

Naslov rada na engleskom jeziku : Biocompatibility of nanostructured biomaterials based on calcium aluminate

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

U Banjoj Luci 02.04.2018.

Potpis doktoranta

Oleksandra Jankobuth

## Izjava 2

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

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom Biokompatibilnost nanostrukturnih biomaterijala na bazi kalcijum aluminata koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

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

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

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima (Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Banjoj Luci 02.04.2018.

Potpis doktoranta

Vanesa Ilić Jančić

### Izjava 3

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

Ime i prezime autora: Ognjenka Janković

Naslov rada: Biokompatibilnost nanostrukturnih biomaterijala na bazi kalcijum aluminata

Mentor: Prof. dr Slavoljub Živković

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

U Banjoj Luci 02.04.2018.

Potpis doktoranta

Ognjenka Janković