



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE

**BIOKOMPATIBILNOST I MARGINALNA
ADAPTACIJA MINERAL-TRIOKSID
AGREGATA, TRIKALCIJUM- SILIKATNOG
CEMENTA I AMALGAMA KAO MATERIJALA
ZA RETROGRADNO ZATVARANJE KANALA
KORENA ZUBA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Branislav Bajkin

Kandidat: dr Lena Jovanović

Novi Sad, 2019. godine

Univerzitet u Novom Sadu

Asoijacija centara za interdisciplinarne i
multidisciplinarne studije i istraživanja – ACIMSI

Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Lena Jovanović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Branislav Bajkin, vanredni profesor na Katedri za stomatologiju (Oralna hirurgija), Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Naslov rada: NR	BIOKOMPATIBILNOST I MARGINALNA ADAPTACIJA MINERAL-TRIOKSID AGREGATA, TRIKALCIJUM- SILIKATNOG CEMENTA I AMALGAMA KAO MATERIJALA ZA RETROGRADNO ZATVARANJE KANALA KORENA ZUBA
Jezik publikacije: JP	srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Novi Sad, Vojvodina
Godina: GO	2019.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Medicinski fakultet, Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	7 poglavlja, 69 stranica, 8 slika, 18 grafikona, 99 referenci
Naučna oblast: NO	Medicina

Naučna disciplina: ND	Stomatologija, Oralna hirurgija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	biokompatibilni materijali; dentalna marginalna adaptacija; materijali za punjenje kanala korena; aluminijumska jedinjenja; silikatni cement; dentalni amalgam; skenirajući elektronski mikroskop; terapija kanala korena; apikotomija
UDK	616.314.16-089.818.1-74
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Važna napomena: VN	nema

Izvod:

IZ

Već izvesno vreme u stručnoj literaturi vodi se rasprava o biokompatibilnosti materijala koji se koriste u periapikalnoj hirurgiji. Pored biokompatibilnosti, od materijala za retrogradnu opturaciju kanala korena zuba se očekuje da spreči prodor bakterija iz kanalnog sistema u okolna tkiva. Kvalitetno rubno zaptivanje, odnosno adekvatna marginalna adaptacija su među najznačajnijim faktorima za dugoročan uspeh tretmana.

Cilj ovog istraživanja je bio ispitati biokompatibilnost i utvrditi da li postoji razlika u biokompatibilnosti između mineral-trioksid agregata, trikalcijum-silikatnog cementa i amalgama na osnovu tri standardna testa citotoksičnosti, kao i utvrditi marginalnu adaptaciju ispitivanih materijala za retrogradno zatvaranje kanala korena zuba.

Materijali i metode: Eksperimentalni deo istraživanja je podeljen na dva dela. U prvom delu istraživanja je vršeno ispitivanje biokompatibilnosti materijala, dok je u drugom delu vršeno ispitivanje marginalne adaptacije na osnovu mikrofotografija dobijenih skening elektronskim mikroskopom. Ispitivanje biokompatibilnosti je izvršeno na dve ćelijske linije, liniji mišjih fibroblasta (L929) i liniji humanih fibroblasta (MRC-5). U eksperimentima su korišćene samo žive (vijabilne) ćelije. Broj ćelija i njihova vijabilnost je određena testom odbacivanja boje sa 0,1% tripan plavim. Vijabilnost ćelija korišćenih u eksperimentu je bila veća od 90%. Biokompatibilnost sve tri vrste materijala je ispitana na osnovu standardnih testova biokompatibilnosti: DET test, MTT test, Agar difuzioni test.

Ispitivanje marginalne adaptacije je sprovedeno na 90 ekstrahovanih jednokorenih zuba interkaninog sektora gornje vilice sa intaktnom pulpom, završenim rastom korena, bez frakture i resorpcije korena zuba. Izvršena je endodontska obrada svih zuba i nakon toga su zubi ostavljeni u vlažnoj sredini na 48h, da bi se sprečile frakture prilikom sečenja. Nakon mehaničko medikamentozne obrade i opturacije kanala korena zuba je vršena resekcija vrha korena zuba 3mm, a nakon toga su svi zubi preparisani do dubine od 3 mm unutar kanala, ultrazvučnim nastavcima (EMS, miniMaster Piezon scaler).

Zubi su naizmenično podeljeni u 3 grupe (30 zuba po grupi). Prvu grupu čine zubi kojima je apikalni kavitet biti ispunjen amalgamom, u drugoj grupi, apikalni kavitet je ispunjen MTA, a u trećoj trikalcijum-silikatnim cementom. Nakon retrogradne opturacije, zubi su ostavljeni u vlažnoj sredini 48h, do potpunog vezivanja ispitivanih materijala. Nakon vezivanja ispitivanih materijala, zubi su sečeni longitudinalno, finom dijamantskom šajbnom. Marginalna adaptacija ispitivanih materijala je procenjena skening elektronskim mikroskopom (SEM). Pripremljeni uzorci su posmatrani pod uvećanjima 30x, 40x, 80x i 100x. Uvećanje 30x je rađeno radi prikaza celokupnog retrogradnog punjenja na jednom snimku, tj. spoja materijal-zub. Nakon toga je napravljeno više uzastopnih snimaka sa uvećanjem 80x do pune dužine materijala. Na taj način je utvrđeno postojanje i izvršeno merenje marginalne pukotine u mikrometrima.

Merenja ukupne dužine marginalne pukotine u mikrometrima u 5 tačaka sa obe strane preparata su vršena u softverskoj aplikaciji *Image J software* (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Tačke su izabrane tako da tačka 1a i tačka 5a predstavljaju gornju i donju ivicu preparata. Tačka 3a predstavlja sredinu rastojanja između tačke 1a i tačke 5a. Tačka 2a i tačka 4a predstavljaju sredinu razmaka između tačke 1a i 3a, odnosno 3a i a5. Tačke 1b-5b su naspramne tačke.

Rezultati:

Rezultati biokompatibilnosti ukazuju na visok stepen ćelijske kompatibilnosti svih ispitivanih materijala. Međutim, DET testom nije utvrđena statistički značajna razlika u citotoksičnosti između istovetnih ispitivanih materijala u obe ćelijske linije, niti između sva tri ispitivana materijala u obe ćelijske kulture.

Poređenjem rezultata MTT testa nakon 24h i 48h, kao i nakon 48h i 72h uočava se da su dobijene srednje vrednosti indeksa citotoksičnosti kod sva tri ispitivana materijala i na obe ćelijske linije manje nakon 48h, odnosno nakon 72h, što ukazuje na oporavak ćelijskog metabolizma. Poređenjem rezultata nakon 24h i nakon 72h, uočava se znatno veći pad vrednosti indeksa citotoksičnosti nakon 72h kod sva tri ispitivana materijala i na obe ćelijske linije. U kulturi ćelija MRC5, kod sva tri ispitivana materijala postoji statistički značajna razlika između indeksa citotoksičnosti izmerenog nakon 24h i nakon 72h, kao i u kulturi ćelija L929.

Agar difuzionim testom nije uočena dekolorizacija, niti liza ćelija ispod ispitivanih materijala. Ćelijski odgovor je 0/0 što ukazuje da ovim testom nije utvrđeno postojanje citotoksičnog efekta ispitivanih materijala na ćelijske linije L929 i MRC-5.

Ispitivanje marginalne adaptacije materijala je vršeno na osnovu mikrofotografija dobijenih skening elektronskim mikroskopom.. Najpre su testirane razlike na prvoj tački merenja. Rezultati ovog testa pokazuju da postoje značajne razlike između materijala i da amalgam ima značajno više vrednosti izmerenih pukotina u odnosu na preostala dva materijala, dok se vrednosti za MTA i biodentin međusobno značajno ne razlikuju. Kao još jedna referentna tačka uzeta je tačka merenja 5. I u odnosu na vrednosti u ovoj tački merenja zabeležene su značajne razlike između materijala. Post hoc Mann-Whitney test pokazuje da se amalgam značajno razlikuje od preostala dva materijala, dok nema značajnih razlika između MTA i biodentina. Na osnovu medijane može se videti da amalgam ima niže vrednosti u ovoj tački merenja u odnosu na preostala dva materijala. U tačkama 2-4, kao i u tačkama 1-5 (ukupno), ne postoji statistički značajna razlika u marginalnoj adaptaciji ispitivanih materijala.

Zaključak:

Rezultati biokompatibilnosti ukazuju na visok stepen ćelijske kompatibilnosti svih ispitivanih materijala. Rezultati sva tri testa pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u citotoksičnosti između ispitivanih materijala. MTT test pokazuje da u obe ćelijske kulture, kod istovetnih ispitivanih materijala postoji statistički značajna razlika između indeksa citotoksičnosti izmerenog nakon 24h i nakon 72h.

Rezultati ispitivanja marginalne adaptacije pokazuju da u tački 1 najgore zaptiva amalgam, dok između MTA i biodentina nema razlike. U tački 5 najbolje zaptiva amalgam.

Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	13.4.2017.
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>Predsednik: Član: Član: Član: Član:</p>
---	---

University of Novi Sad

ACIMSI

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D. Thesis
Author: AU	Lena Jovanović
Mentor: MN	Branislav Bajkin, DMD, Ph.D, Associate Professor, Medical faculty, University of Novi Sad
Title: TI	BIOCOMPATIBILITY AND MARGINAL ADAPTATION OF MINERAL TRIOXIDE AGGREGATE, TRICALCIUM SILICATE CEMENT AND DENTAL AMALGAM AS A ROOT END FILLING MATERIALS
Language of text: LT	Serbian/Latin
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Novi Sad, Vojvodina
Publication year: PY	2019.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Medical faculty, Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	7 chapters, 69 pages, 8 figures, 18 graphics, 99 references
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Dentistry, Oral surgery

Subject, Key words SKW	Biocompatible Materials; Dental Marginal Adaptation; Root Canal Filling Materials; Aluminium Compounds; Silicate Cement; Dental Amalgam; Microscopy, Electron, Scanning; Root Canal Therapy; Apicoectomy
UDC	616.314.16-089.818.1-74
Holding data: HD	Library of Medical Faculty, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Note: N	none
<p>Abstract: AB</p> <p>Biocompatibility of materials, deployed in periapical surgery, has been a subject of debate in referential literature for some time now. Apart from biocompatibility, root end filling materials are expected to prevent bacteria from entering the surrounding tissue from canal system. The most important factors for successful long term treatment include marginal seal, i.e. adequate marginal adaptation.</p> <p>The aim of this research was to examine biocompatibility and establish the potential difference in biocompatibility between mineral trioxide aggregate, tricalcium silicate cement and dental amalgam according to three cytotoxicity tests, but also to corroborate marginal adaptation of the materials in question for retrograde seal of a root canal.</p> <p>Materials and methods: The experimental part of the research is divided in two parts. In the first part of the research biocompatibility of the materials was examined, while the examination of the marginal adaptation based on the micro images from scanning electron microscope was conducted in the second part. The examination of biocompatibility was executed on two cell lines, mouse fibroblast cell line (L929) and human cell line (MRC-5). Biocompatibility of all three types of material was examined based on three standard biocompatibility tests: DET test, MTT test, Agar diffusion test.</p> <p>The examination of marginal adaptation was carried out on 90 single-rooted tooth extracted human teeth of the intercanine sector of maxilla with intact pulp, mature apices, without root fractures or resorption. All teeth were endodontically treated. After the extirpation, irrigation and obturation, the resection of 3mm of root apex and retrograde preparation with ultrasonic instruments up to 3 mm depth inside the canal was done.</p> <p>Teeth were divided in three groups alternately. The First group include teeth which apical cavitation was filled with amalgam, in the Second group apical cavitation was filled with MTA, and in the Third group with tricalcium silicate cement. After the complete setting of the materials, teeth were cut in longitudinal manner, with fine, diamond tool. Marginal adaptation of the materials was assessed through scanning electron microscope (SEM). Software application <i>Image J software</i> was deployed to measure the total length of marginal fissure in micrometers in 5 pointson both sides of the preparation .</p> <p>Results:</p> <p>The results of biocompatibility indicate high degree of cell compatibility of all tested materials. DET test did not assert any statistically significant difference in cytotoxicity between the same tested materials in both cell lines, nor between all three tested materials in both cell cultures.</p> <p>Comparing the results of MTT test after 24h and 48h, and 48h and 72h, it is noted that middle value of cytotoxicity index with all three tested materials and on both cell lines is lower after 48h, and after 72h, indicating the recovery of cell metabolism. In both cell cultures, with all three tested materials there is statistically significant difference between measured cytotoxicity indices after 24h and after 72h.</p> <p>Agar diffusion test did not show decolorization, nor cell lysis underneath the tested materials,</p>	

which means that cytotoxic effect was not asserted on cell lines L929 i MRC-5.

The examination of marginal adaptation was conducted according to micro images gained by scanning electron microscope. The results in the measure point 1 indicate there are significant differences between materials, and amalgam has significantly higher values of the measured fissures in relation to remaining two materials, whereas values for MTA and biodentine do not differ significantly.

In measure point 5 significant differences were noted. *Post hoc Mann-Whitney* test shows that amalgam has lower values of the tested fissures in this measure point in relation to two other materials, while there were no significant differences between MTA i biodentine. In points 2-4, as well as points 1-5 (in total), there were no statistically significant differences in marginal adaptation of the examined materials.

Conclusion:

The results of all three tests show that there is no statistically significant difference in cytotoxicity between examined materials. MTT test shows that there is, in both cell cultures, with the same examined materials , statistically significant difference between cytotoxicity indices measured after 24h and after 72h. The results of the examination of marginal adaptation show that in point 1 amalgam has the worst seal, whereas between MTA and biodentine there is no difference. In point 5 amalgam has the best seal.

Accepted on Senate on: AS	13.4.2017.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	President: Member: Member: Member: Member:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
Periapikalne lezije.....	1
Tretman periapikalnih lezija.....	2
Materijali koji se koriste za retrogradnu opturaciju kaviteta.....	3
Amalgam	4
Mineral- trioksid agregat (MTA)	6
Trikalcijum- silikatni cement (Biodentine™).....	8
Glas jonomer cementi.....	10
Diaket	11
Super EBA.....	11
Biokompatibilnost.....	12
Osnovni principi ispitivanja citotoksičnosti <i>in vitro</i>	13
Testovi za ispitivanje biokompatibilnosti.....	14
Ćelijske kulture	16
Marginalna adaptacija	17
2. CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	18
3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA	19
Metode za ispitivanje biokompatibilnosti:	19
Izbor i priprema uzoraka	19
Ćelijske linije korišćene u <i>in vitro</i> uslovima	19
Testovi za ispitivanje biokompatibilnosti.....	21
Metode za ispitivanje marginalne adaptacije:	24
Izbor i priprema uzoraka	24
Mehaničko-medikamentozna obrada i opturacija kanala korena zuba	25
Resekcija i retrogradna opturacija kanala korena zuba.....	25
Skening elektronska mikroskopija	26
4. REZULTATI	28
Biokompatibilnost ispitivanih materijala	28
Rezultati testa odbacivanja boje- <i>dye exclusion test</i> (det).....	28
Rezultati kolorimetrijskog testa sa tetrazolijum solima- mtt test.....	29
Rezultati agar difuzionog testa.....	33
Marginalna adaptacija	34
Rezultati merenja marginalne pukotine MTA primenom skening elektronske mikroskopije	34

Rezultati merenja marginalne pukotine biodentina primenom skening elektronske mikroskopije	35
Rezultati merenja marginalne pukotine amalgama primenom skening elektronske mikroskopije	37
Poređenje kvaliteta marginalne adaptacije ispitivanih materijala.....	38
5.DISKUSIJA	41
Diskusija metodologije	41
Dikusija izbora materijala uključenih u ispitivanje	41
Diskusija metodologije ispitivanja biokompatibilnosti	42
Diskusija metodologije ispitivanja marginalne adaptacije.....	44
Diskusija rezultata	46
Diskusija rezultata biokompatibilnosti	46
Diskusija rezultata marginalne adaptacije.....	48
6.ZAKLJUČCI	50
7.LITERATURA	51

1. UVOD

Već izvesno vreme u stručnoj literaturi vodi se rasprava o biokompatibilnosti materijala koji se koriste u periapikalnoj hirurgiji. Postavlja se pitanje da li i u kojoj meri ti materijali utiču na okolno tkivo. Pored biokompatibilnosti, od materijala za retrogradnu opturaciju kanala korena zuba se očekuje da spreči prodor bakterija iz kanalnog sistema u okolna tkiva. Kvalitetno rubno zaptivanje, odnosno adekvatna marginalna adaptacija su među najznačajnijim faktorima za dugoročan uspeh tretmana.

Amalgam, kao materijal koji se najduže koristi za retrogradno zatvaranje kanala je često smatran toksičnim zbog svog sastava. Zbog toga ali i zbog drugih ograničavajućih osobina amalgama, sve češće su u upotrebi i noviji materijali čija uspešnost nakon kliničke primene je i dalje predmet istraživanja.

1.1. Periapikalne lezije

Periapikalne lezije su patološke promene koje nastaju na vrhu korenova avitalnih zuba, kada nekrotični sadržaj kanala korena, vršeći stalnu iritaciju apikalnog predela, uslovljava pojavu hronične inflamacije. [1] One su posledica odbrambene reakcije periapeksnog tkiva, koje teži da spreči dalje širenje infekcije. Izazivaju ih bakterijski, toksični, hemijski i traumatski nadražaji.

Najčešće nastaju kao posledica karijesa koji kasnije zahvata pulpno tkivo i dovodi do zapaljenja, a zatim se zapaljenje širi u periapikalni prostor i dovodi do periapikalnog procesa. [2]U početku je zahvaćen samo periodontalni ligament, a kako zapaljenje napreduje, dolazi do resorpcije cementa, dentina i alveolarne kosti. Prodor infekcije je mogući preko dubokih paradontalnih džepova, duž destruiranog periodnocijuma.[3]

Neadekvatno endodontsko lečenje, tj. neadekvatna instrumentacija, medikacija i opturacija takođe mogu dovesti do nastanka periapikalnih lezija. Flora endodontski saniranih zuba se razlikuje od nelečenih avitalnih zuba po tome što u njoj dominiraju fakultativni anaerobi, najčešće enterokoke, stafilokoke i streptokoke. U periapikalnim lezijama otpornim na endodontsku terapiju, u flori dominiraju gram pozitivni organizmi i ona se potpuno razlikuje od flore koja reaguje na lečenje. [4]

Mikroorganizmi koji dovode do nastanka periapikalnih lezija su najčešće intrakanalni. *Bacteroides forsythus*, *Campilobacter shawae*, *Fusobacterium nucleatum* i *Actinobacillus*

actinomyces comitans su prisutni u preko 90% periapikalnih lezija.[3]

Najveći procenat periapikalnih lezija uočen je kod mlađe populacije. Istraživanja su pokazala da se periapikalne lezije razvijaju dva puta češće na zubima gornje vilice i to najčešće u predelu sekutića. Postoje mnoge klasifikacije periapikalnih lezija ali jedina precizna klasifikacija se može izvršiti samo na osnovu histopatološke analize.[5]

1.2. Tretman periapikalnih lezija

Osnovni tretman periapikalnih lezija je endodontska sanacija zuba. Najnovija istraživanja pokazuju da je uspešnost adekvatne endodontske terapije u lečenju periapikalnih lezija preko 85%, a neuspeh ispod 5% slučajeva.[6,7]

Prognoza uspeha endodontske terapije zavisi od nekoliko faktora: dijagnoze, morfologije kanala, mehaničko-medikamentozne obrade i opturacija kanala korena kao i od histološke slike same promene.

Komplikovana anatomija korenskih kanala, neadekvatna mehaničko-medikamentozna obrada i opturacija kanala korena, netretirani kanali, *fausse route*, zalomljeni instrumenti i koronarno mikrocurenje usled neadekvatne konzervativne ili protetske sanacije zuba nakon endodontske terapije su faktori koji dovode do neuspeha.

Prisustvo mikrororganizama u kanalu korena zuba predstavlja glavni uzrok neuspeha endodontske terapije. Kada endodontsko lečenje ne dovede do očekivanog uspeha i kada retreatman nije indikovano, neophodan je endodontsko-hirurški tretman. [7-9]

Hirurški tretman podrazumeva podizanje mukoperiostalnog režnja, uklanjanje kosti, kako bi se pristupilo leziji i vrhu korena zuba, kiretažu patološke promene, odsecanje vrha korena zuba, preparaciju apikalnog kaviteta i postavljanje materijala za opturaciju apikalnog kaviteta.

Hirurški tretman je najčešće indikovano kod perzistirajućih periapikalnih lezija, kanalnih opstrukcija, kada endodontski tretman nije moguć i nakon komplikacije endodontske terapije u smislu zalamanja instrumenata u apikalnoj trećini korena zuba, perforacije kanala korena i kod prebacivanja paste ili gutaperke u periapikalno tkivo. [10]

Cilj periapikalne hirurgije je uklanjanje periapikalne promene i kompletna ortogradna ili retrogradna opturacija kanala korena zuba.

Savremeni endodontsko-hirurški tretman ima veoma visoki procenat uspeha zbog upotrebe mikrohrurških i ultrazvučnih instrumenata, dentalnih mikroskopa i savremenih materijala.

Mikrohrurški instrumenti i dentalni mikroskop su najviše doprineli promeni ugla resekcije vrha korena zuba. Resekcija pod uglom od 45°-60° zbog olakšanog pristupa i vidljivosti je

zamenjenaresekcijom pod uglom od 0° - 10° u odnosu na horizontalnu ravan, čime je dobijen znatno manji broj izloženih dentinskih tubula. Samim tim je mogućnost reinfekcije smanjena na minimum. [11-13] Uklanja se 3mm vrha korena zuba, da bi se uklonio najveći broj kanalnih ramifikacija i lateralnih kanala. [9,14,15]

Ultrazvučni instrumenti su još više unapredili hiruršku tehniku zbog svojih malih dimenzija i efikasnosti. Njihovom upotrebom značajno je smanjena količina uklonjene kosti da bi se pristupilo korenu, a samim tim je smanjena nelagodnost i olakšan postoperativni oporavak pacijenata.

Retropreparacija se izvodi primenom posebnih mikroinstrumenata- mikrokolenjakom i mikroborerima ili posebnim nastavcima za ultrazvučne instrumente.

Ultrazvučni nastavci su dizajnirani tako da prate uzdužnu osu zuba i takvih su dimenzija da olakšavaju preparaciju apikalnog kaviteta prateći morfologiju kanala korena. [16]

Retrogradni kaviteti se uz pomoć ovih nastavaka preparišu znatno lakše i brže, sa većom preciznošću u odnosu na konvencionalne metode preparacije borerima. Najčešće korišćeni nastavci su od nerđajućeg čelika i dijamantski, s tim što se prednost daje dijamantskim nastavcima jer su se pokazali kao brži i efikasniji. Nedostatak ovih nastavaka je znatno brže trošenje usled ponavljane upotrebe i sterilizacije.[2, 17]

1.3.Materijali koji se koriste za retrogradnu opturaciju kaviteta

Osnovni zadatak materijala koji se koriste u periapikalnoj hirurgiji je da obezbede hermetičko zatvaranje kanala korena zuba, tj.da spreče prodor bakterija iz kanala korena zuba u okolna tkiva. [1] Stoga je kvalitetno rubno zaptivanje, odnosno adekvatna marginalna adaptacija među najznačajnijim faktorima za dugoročan uspeh tretmana.

Idealan materijal za retrogradno zatvaranje kanala korena zuba bi trebalo da pored biokompatibilnosti poseduje i druge karakteristike koje uključuju: bioaktivnost, zadovoljavajući kvalitet marginalnog zaptivanja, dimenzionalnu stabilnost, antimikrobno dejstvo, kao i jednostavnost primene. [18-21]Materijali za retrogradno zatvaranje bi trebalo da budu rendgen kontrastni, da bi se lako utvrdio njihov položaj na radiografskom snimku.

Iako je danas na tržištu dostupan veliki broj materijala za retrogradno zatvaranje kanala korena zuba, za sada nijedan ne zadovoljava sve kriterijume idealnog materijala.Materijali koji se najviše koriste u periapikalnoj hirurgiji su amalgam, fosfatni cement, glas jonomer cementi, kompoziti i mineral- trioksid agregat (MTA).[22,23] Poslednjih godina razvijen je novi materijal, trikalcijum-silikatni cement.

1.3.1. Amalgam

Naziv amalgam potiče od grčkih reči: a = ne i malagma = smekšanje.

Prvi zapisi o materijalu koji je po sastavu bio sličan amalgamu nalaze se u kineskoj literaturi, 659. godine u delu “*Materia medica*”, Su Kunga (iz dinastije Tang). U sledećem milenijumu, nemački lekar *Jochan Stocker* patentirao je smešu napravljenu od vrelog zelenog vitriola i žive. Stocker je i uveo naziv “amalgam”, a 1528. godine dao je prvi zapis o novom materijalu.

Amalgam koji se danas koristi u velikoj meri se zasniva na formulaciji *G. V. Black-a. Black* je 1895. patentirao leguru koja se sastojala od 65% Ag s manjim količinama Sn, Au ili Cu i Zn. On je uočio da sastav amalgama i način upotrebe utiču na njegova svojstva. Po definiciji, amalgam je legura koja sadrži živu. Živa je na sobnoj temperaturi tečna i reaguje sa mnogim metalima, formirajući legure. [24]

Hemijski sastav dentalnih amalgama

Osnovni hemijski sastojci amalgamske legure su srebro (Ag), kalaj (Sn) i živa (Hg). U manjim količinama leguri mogu biti dodati bakar (Cu), cink (Zn), zlato (Au), platina (Pt), paladijum (Pa), nikal (Ni), molibden (Mo), volfram (V), a preamalgamiranoj leguri i sasvim male količine žive, do 3%. Savremeni amalgami sadrže veće koncentracije bakra, srebra, kalaja i cinka. [25] Dentalni amalgami se prema količinskom udelu bakra dele na konvencionalne i amalgame s visokim procentom bakra. U oba tipa, glavne komponente legura su srebro (Ag) i kalaj (Sn).

Konvencionalni amalgami (*low-copper alloys*)

Konvencionalni amalgami, sa manje od 5% bakra su korišćeni od kraja 19. veka, pa sve do 70-ih godina 20. veka. Ovi amalgami formiraju kontinuiranu γ_2 fazu tokom restauracije, što dovodi do korozije, posebno nedovoljno kondenzovanih ispuna. Ne dolazi do transformacije u γ_1 fazu i zbog toga se oni nazivaju γ_2 amalgami. Tokom korozije γ_2 faze, dolazi do otpuštanja žive i može doći do reakcije između neodreagovanog γ_2 faze ili do isparenja. Ipak, ne- γ_2 (*non- γ_2*) amalgami su gotovo potpuno izbacili ove amalgame iz upotrebe, zbog povećane rezistencije na koroziju, redukovano pužanja i boljih kliničkih performansi. [26]

Opseg procentualne zastupljenosti elemenata u konvencionalnim amalgamima iznosi:

- 66.7-71.5% Ag,
- 24.3- 27.6% Sn,
- 1.2- 5.5% Cu,
- 0- 1.5% Zn i
- 0- 4.7% Hg. (3)

Amalgami s visokim procentom bakra (*high-copper alloys*)

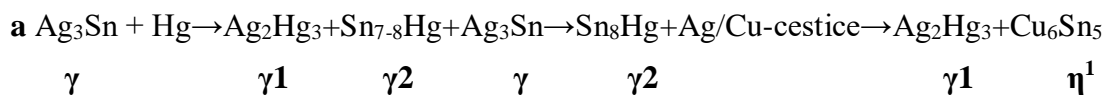
Amalgame sa visokim procentom bakra nazivamo jos i *non- γ_2* amalgami jer je kod njih ne dolazi do stvaranja gama2 faze.

Njih dalje možemo podeliti, u zavisnosti od procentualne zastupljenosti bakra, na mešane amalgamske legure, koje sadrže oko 9% bakra i amalgame sa vrlo visokim procentom bakra koje sadrže do 28% bakra. [27]

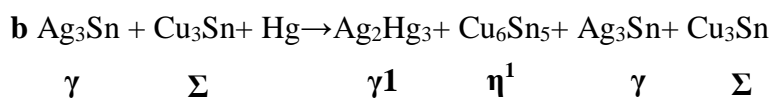
Na shemi 1 je prikazana reakcija vezivanja *non- γ_2* i konvencionalnih amalgama.

Shema 1. Reakcije vezivanja non- γ_2 (a I b) i konvencionalnih amalgama (c)

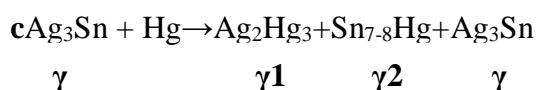
non- γ_2 amalgami



non- γ_2 amalgami



Konvencionalni amalgami (γ_2 amalgami)



Amalgam kao materijal za retrogradno zatvaranje kaviteta

Iako se amalgam kao restaurativni materijal u stomatologiji koristi veoma dugo, poslednjih godina se sve više govori o njegovom potencijalno štetnom uticaju na zdravlje čoveka, zbog prisustva žive u njegovom sastavu.[28] Amalgam ima dosta nedostataka, sklon je koroziji i dezintegraciji, ima odloženu ekspanziju, loše zaptiva, zahteva veći retrogradni kavitet, a višak amalgama i oslobođene metalne čestice u okolno meko tkivo mogu dovesti do prebojavanja tkiva što se naziva amalgamska tetovaža. [29-31] Ispitivanja na životinjskim modelima su pokazala da amalgam izaziva ozbiljan inflamatorni odgovor kod pasa i da dolazi do stvaranja fibroznih kapsula oko retrogradnih kaviteta ispunjenih amalgamom. [31]

Usled napredovanja industrije stomatoloških materijala, adhezivni materijali, pre svega kompoziti su uticali na to da se upotreba amalgama značajno smanji. [28] Noviji materijali za opturaciju retrogradnih kaviteta imaju bolju sposobnost zaptivanja i biokompatibilniji su. [29]

I pored svih nedostataka, amalgam je materijal koji se najduže i najčešće koristi kao materijal za retrogradno zatvaranje, dobro je ispitan i često se u istraživanjima koristi kao standard sa kojim se porede noviji materijali. [31]

1.3.2. Mineral- trioksid agregat (MTA)

Mineral-trioksid agregat (MTA) je cement na bazi kalcijum silikata, koji je prvobitno dizajniran za retrogradno zatvaranje kanala korena zuba, kao i u terapiji direktnog prekrivanja pulpne komore i zatvaranja jatrogenih perforacija.[31,32] Patentirao ga je *Torabinejad* na Univerzitetu Loma Linda i prvi put je predstavljen 1993. godine kao *ProRoot MTA* (Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, USA). Pokazalo se da materijal ima jako dobre osobine, dobrozaptivo i promovise aktivnost osteoblasta. [31]

Dobra adaptacija MTA za ivice kaviteta može biti povezana sa prirodom ovog materijala. Naime, MTA prah sadrži hidrofilne čestice koje apsorbuju vodu tokom hidratacije. Upravo zbog toga dolazi do širenja materijala tokom vezivanja i do dobrog zaptivanja. [30]

Kao najbitniju osobinu, mnogi autori navode formiranje cementnih mostića, direktno iznad ispuna, što pokazuje da tkivo pozitivno reaguje na njega i da poseduje sposobnost cementogeneze. [31]

Od svih materijala koji se koriste za retrogradno zatvaranje, čini se da MTA ima najviše dobrih osobina i zbog toga se najčešće preporučuje kao materijal izbora. Mnoge studije su pokazale da je MTA biokompatibilan materijal koji indukuje osteo i odontogenezu. Kada je MTA direktno u kontaktu sa fibroblastima, cementoblastima i osteoblastima periodontalnog ligamenta, MTA je

biokompatibilniji i manje toksičan od drugih materijala. [30,31]

Danas MTA ima širok spektar primene u tretmanu zuba sa nezavršenim rastom korena (apeksogeneza i apeksifikacija), direktnog prekrivanje pulpe, zatvaranja lateralnih i furkalnih perforacija ali ipak se najčešće koristi kao materijal za retrogradno zatvaranje.

Ipak, mnogi autori su imali i primedbe na ovaj materijal i to zbog teškog postavljanja i rukovanja samim materijalom i veoma sporog vezivanja, usled čega može doći do mikrocurenja, loše marginalne adaptacije, površinske dezintegracije i prekida kontinuiteta materijala. [30]

Hemijski sastav

MTA se sastoji od 50-75% CaO i 15-25% SiO₂. Ova dva jedinjenja cine 70-95% ukupnog sastava cementa. Mešanjem ova dva oksida, nastaju trikalcijum silikat, dikalcijum silikat, trikalcijum aluminat i tetrakalcijum aluminoforit. Dodavanjem vode, dolazi do hidratacije cementa i nastanka kalcijum silikatnog hidratnog gela (C-S-H) i kalcijum hidroksida. [33]

MTA je patentiran u skladu sa ASTM (*American Standards for Testing Materials*) kao derivat Portland cementa, tip 1 sa dodatim bizmut oksidom u razmeri 4:1, kao rendgen kontrastno sredstvo.

Do nedavno su postojala samo dva komercijalna oblika MTA (*ProRoot MTA*), sivi i beli. Danas postoji više proizvođača MTA-a, kao na primer Harvard MTA (*Harvard Dental International GmbH*, Hoppegarten, Germany), MTA Angelus (*Angelus Soluções Odontológicas*, Londrina, Brazil).

Sivi i beli MTA se razlikuju u koncentracijama jedinjenja aluminijuma (Al₂O₃), magnezijuma (MgO) i gvožđa (FeO). Koncentracija ovih oksida je znatno niža u sastavu belog MTA.

Rezultati studije *Asgary et al.* pokazuju da su najzastupljeniji oksidi u oba tipa MTA CaO, sSiO₂ i Bi₂O₃. [34]

Beli MTA je prvi put predstavljen 2002. godine, kao novija, estetski prihvatljivija verzija materijala. Beli MTA nema aluminoforitnu fazu koja daje boju sivom MTA i ne sadrži tako velike čestice kao sivi MTA. [35] Pokazalo se da se osteoblasti različito ponašaju kada se nađu u kontaktu sa belim i sivim MTA. [34]

1.3.3. Trikalcijum- silikatni cement (Biodentine™)

Trikalcijum-silikatni cement predstavlja materijal koji kao i MTA pripada grupi cemenata na bazi kalcijuma. U poslednje vreme, na tržištu se pojavilonekoliko materijala čiji se sastav bazira na kalcijum-silikatu, kao što su Biodentin (*Septodont*, Saint-Maur-des-Fosses, Francuska) i BioAggregate (*Innovative BioCeramik*, Vancouver, Kanada).

Biodentin je zamišljen kao materijal koji povezuje visoku biokompatibilnost i bioaktivnost kalcijum silikata, sa poboljšanim svojstvima kao sto su kraće vreme vezivanja (zahvaljujući kalcijum hloridu kao akceleratoru) i veća čvrstoća (usled smanjenja vode, dodavanjem hidrosolubilnog polimera), osobine koje ranije nisu povezivane sa ovim cementima. [36]

Biodentin je relativno nov materijal na tržištu, koji se koristi za retrogradno zatvaranje kanala korena zuba, a komercijalno dostupan je postao 2009. godine. Danas, Biodentin ima široki spektar primene, uključujući zatvaranje jatrogenih perforacija, direktno prekrivanje pulpe zuba, endodontsku terapiju zuba sa nezavršenim rastom korena i zatvaranje retrogradnih kaviteta nakon apikotomije. U poređenju sa drugim cementima na bazi kalcijuma za ovaj materijal se smatra da ima dve prednosti: brže vreme vezivanja i bolje mehaničke karakteristike. [36,37]

Imajući u vidu da se radi o relativno novom materijalu, ograničen je broj studija u kojima su ispitivana svojstva trikalcijum-silikatnog cementa kao materijla za retrogradno zatvaranje kaviteta.[38,39]

Hemijski sastav

Biodentin se sastoji od dve komponente, tečnosti i praha. Prah sadrži dikalcijum i trikalcijum-silikat koji reguliše reakciju vezivanja i kalcijum- karbonat, kao i cirkonijum-dioksid, koji daje rendgen kontrastnost. Tečnost sadrži rastvor kalcijum hlorida kao akcelerator i hidrosolubilni polimer kao sredstvo za smanjenje količine vode.[37]

Kompletni sastav Biodentina prikazan je u Tabeli 1.

Tabela 1. Komponente praha i tečnosti Biodentina

Prah		Tecnost	
Trikalcijum silikat	Glavna komponenta praha	Kalcijum hlorid	Akcelerator vezivanja
Dikalcijum silikat	Sekundarna komponenta praha	Hidrosolubilni polimer	Voda redukujući agens
Kalcijum karbonat i kalcijum oksid	Punioc		
Oksidi gvožđa	Boja		
Cirkonijum oksid	Rtg kontrastno sredstvo		

Za rendgen kontrastnost Biodentina odgovoran je cirkonijum dioksid, za razliku od MTA kod koga je kao rendgen kontrastno sredstvo dodat bizmut oksid. Cirkonijum dioksid je biokompatibilan i bioinertan, otporan na koroziju i sa povoljnim mehaničkim karakteristikama u odnosu na bizmut oksid. [37]

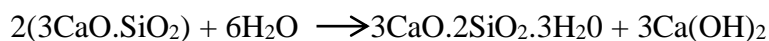
Kao još jedna značajna osobina trikalcijum silikatnog cementa se navodi oslobađanje kalcijum hidroksida iz vezanog materijala, kao i stvaranje hidroksiapatita pri kontaktu sa tkivnim tečnostima. Stvoreni kristali hidroksiapatita povećavaju zaptivanje materijala, posebno kada se formiraju na spoju materijala sa dentinskim zidovima. Mala ekspanzija je takođe zabeležena kod ovog materijala, što doprinosi njegovoj boljoj adaptaciji. [36,37,40]

Reakcija vezivanja

Nakon mešanja praha i tečnosti dolazi do sledećih reakcija:

- Trikalcijum silikat se meša sa tečnom komponentom i dovodi do stvaranja hidratizovanog kalcijum silikatnog gela (C-S-H) i kalcijum hidroksida. Slojevi gela se formiraju nakon raspadanja zrna trikalcijum silikata, dovodeći do precipitacije kalcijum silikata gel strukture.
- Ova reakcija se odvija na površini svakog zrna kalcijum silikata. Dolazi do taloženja kalcijum silikatnog gela i viška kalcijum hidroksida, što dovodi do zasićenja u medijumu.
- Kristalizacija CSH silikatnog gela se odvija kroz kontinuiranu hidrataciju, što dovodi do stvaranja kristala CaCO_3 između neodreagovanih zrna cementa, tokom perioda od približno dve nedelje, dok konačno ne dostigne svoj maksimum. Ovaj proces kristalizacije čini strukturu relativno nepropustljivom za vodu i usporava efekte daljih reakcija. [41]

Kompletna reakcija hidratacije je prikazana u sledećoj formuli:



Struktura potpuno vezanog materijala se sastoji od hidratizovanog kalcijum silikatnog gel matriksa sa kristalima CaCO_3 interponiranim između neodreagovanim zrnima cementa. [41]

Vreme vezivanja Biodentina iznosi 9-12 min što je prednost u odnosu na druge materijale na bazi kalcijum- silikata. Skraćeno vreme vezivanja je postignuto povećanjem veličine čestica, dodavanjem kalcijum hlorida i smanjujući sadržaj tečne komponente.[37] Međutim, istraživanja su pokazala da do potpunog vezivanja materijala dolazi tek nakon 2 nedelje, jer se u tom periodu kristali CaCO_3 i dalje stvaraju. [41]

1.3.4. Glas jonomer cementi

Glas jonomer cementi su patentirani šezdesetih godina 20.veka, a u stomatološkoj praksi su u upotrebi od ranih sedamdesetih godina.[42] Od tada su se pojavile mnoge modifikacije originalnog sastava. Sastoje se iz dve komponente, praha kalcijum-fluoro-aluminosilikatnog stakla i vodenog rastvora poliakrilne kiseline. Reakcijom neutralizacije ove dve komponente, dolazi do polimerizacije glas jonomer cemenata. [43] Jedna od najvažnijih karakteristika GJC je njihova sposobnost da se hemijski vežu za tvrda zubna tkiva, kao i otpuštanje fluorida. [42]

Studije biokompatibilnosti su pokazale da ovi materijali imaju inicijalnu citotoksičnost zbog niskog pH, koji kod sveže zamešanih materijala iznosi između 0,9 i 1,6. Sporo vezivanje GJC dovodi do toga da se $\text{pH}>3$ postiže tek nakon 10min, što je i dalje u zoni citotoksičnih vrednosti. Ipak, tokom vezivanja, dolazi do smanjenjem citotoksičnosti. [44]

Antonucci i saradnici su prvi opisali smolom modifikovane glas jonomer cemente, koji su poznati i kao svetlosno polimerizujući GJC. Ideja je bila da se poboljšaju karakteristike konvencionalnih GJC i da se omogući još lakše rukovanje. Oni sadrže monomer kao što je hidroksietil metakrilat (HEMA) ili bisfenol-A-glicidil metakrilat (bis-GMA) zajedno sa fotoinicijatorom kao što je kamforkinon.[42] Oni poseduju veću čvrstoću u odnosu na konvencionalne glas-jonomere ali njihov sastav, tj. kompozitne smole i agensi za pripremu dentina mogu dovesti do potencijalno toksičnih reakcija sa okolnim tkivima. Sa druge strane, smolom modifikovani glas-jonomeri se znatno brže vezuju od konvencionalnih, pa je i stepen stvaranja kiselih produkata manji. [45]

Konvencionalni GJC se sporo vezuju i nisu najpogodniji za rukovanje, takođe su veoma osetljivi na vlagu. Zbog toga nisu baš najadekvatniji materijal za korišćenje u apikalnoj hirurgiji. Smolom

modifikovani glas-jonomeri su donekle prevazišli ove nedostatke, pokazali su bolje zaptivanje od amalgama i konvencionalnih GJC, manje mikrocurenje zbog manje osetljivosti na vlagu, kao i dublju penetraciju polimera u površinu dentina. [42]

1.3.5. Diaket

Diaket je materijal na bazi polivinil smole, koji se prvobitno koristio u endodonciji, kao siler, a tek kasnije se počeo koristiti i kao materijal za retrogradno zatvaranje kanala korena zuba. *Tetsh* je 1986.godine prvi put zabeležio njegovu upotrebu kao materijala za retrogradno zatvaranje i predložio da se za tu namenu koristi diaket gušće konzistencije, zamešan sa 2 porcije praha i 1 porcijom tečnosti. [46,47] Diaket se sastoji iz 2 komponente, praha I tečnosti. Prah sadrži 90% ZnO I 3% bizmut fosfata, a tečnost 76% propionil acetofenona, 23,3% vinil kopolimera, 0,5 dihlorofena I 0,2% triethanolamina. [26]

Studije u kojima se ispitivala marginalna adaptacija i mikrocurenje ovog materijala su pokazale da on ima vema dobro zaptivanje. Studije biokompatibilnosti na ćelijskim kulturama su pokazale da diaket, kada se koristi kao endodontski siler, pokazuje izvestan stepen citotoksičnosti i da dovodi do dugotrajnog, hroničnog zapaljenja koštanog i potkožnog tkiva. Međutim, kada se zameša gušće i kada se koristi kao materijal za retrogradno zatvaranje, diaket pokazuje dobru biokompatibilnost. Ovako zamešan, diaket je veoma lak za rukovanje i ima radno vreme od 30 minuta ili duže, što je velika prednost. [46] Još jedna od prednosti ovog materijala je njegova vidljivost na rtg snimcima, koja je veća nego kod MTA. [47]

1.3.6. Super EBA

Super ethoxy benzoic acid (SuperEBA) je cement na bazi cink oksid eugenola, ojačan sa benzoevom kiselinom (EBA), koji se uglavnom koristi za cementiranje krunica i mostova. kao podloga ispod ispuna. Ojačani cementi na bazi cink oksid eugenola, kao što su SuperEBA i IRM (*Intermediate restorative material*) su rešili problem apsorpcije, koji su imali cementi na bazi cink oksid eugenola. Super EBA sadrži samo 1/3 od količine eugenola koju sadrži IRM, pa se zbog toga mnogo bolje ponaša u vlažnoj sredini i dobro adherira za zub. Još jedna dobra osobina ovog cementa je to da se može postepeno dodavati u manjim porcijama. [44,48] Super EBA je patentiran oko 1960. godine kao zamena za cink fosfatni cement, a kao kao materijal za retrogradno zatvaranje kanala korena zuba se koristi od 1978. godine, kada su ga za tu namenu prvi put koristili

OynickiOynick. [49]

Super EBA se sastoji od dve komponente, praha i tečnosti. Cink oksid i aluminijum oksid su glavne komponente praha, a tečnu komponentu čine ortoetoksibenzoeva kiselina i eugenol.[50] Kompletan sastav super EBA cementa se nalazi u Tabeli 2.

Tabela 2. Komponente praha i tečnosti Super EBA

Prah	Tecnost
Cink oksid 60%	Ortoetoksibenzoeva kiselina 62,5%
Aluminijum oksid 34%	Eugenol 37,5%
Prirodna smola 6%	

Istraživanjama životinjama i testovi prodora boje su pokazali da ovaj materijal poseduje veoma dobre osobine kada se koristi kao materijal za retrogradno zatvaranje.

Sveže zamešan, Super EBA indukuje blagu do umerenu toksičnost, najverovatnije zbog eugenola u svom sastavu ali citotoksičnost se smanjuje ubrzo nakon vezivanja materijala i kao potpuno vezan, ovaj materijal pokazuje veoma mali dugotrajni inflamatorni potencijal. [50]

Oynick i Oynick su opisali ovaj materijal kao biokompatibilan i prijavili formiranje kolegenih vlakana iznad postavljenog materijala. [44]

Pored dobrih osobina, mnogi autori prijavljuju teško rukovanje ovim cementom ukoliko nije dobro zamešan. Potrebno je više truda i vežbe, kako lekara koji ga unosi u retrogradni kavitet, tako i pomoćnika koji ga priprema za rad kako bi se izbegle greške. Takođe, manji problem predstavlja i to što je vidljivost cementa na rtg snimku veoma slična gutaperki, a idealni materijal za retrogradno zatvaranje bi morao imati dobru vidljivost i biti lako primetan na rtg snimku. [50]

1.4. Biokompatibilnost

Biokompatibilnost se odnosi na sposobnost biomaterijala da obavi željenu funkciju u skladu sa medicinskom terapijom, bez izazivanja bilo kakve, lokalne ili sistemske reakcije domaćina i pri tome generišući najbolji mogući ćelijski i tkivni odgovor u datoj situaciji. Imajući u vidu da ostvaruju direktan kontakt sa tkivom, dentalni materijali moraju biti biokompatibilni. [51,52]

Pod biokompatibilnošću podrazumevamo svojstvo materijala da izazove poželjan odgovor organizma. [26] Takvi materijali moraju biti bez ikakvih rizika po zdravlje i prilikom direktnog

kontakta sa tkivom ne bi trebalo da pokazuju bilo kakav negativan efekat. Idealan materijal za retrogradno zatvaranje kanala korena zuba bi trebalo da pored biokompatibilnosti poseduje i druge karakteristike koje uključuju: bioaktivnost, zadovoljavajući kvalitet marginalnog zaptivanja, dimenzionalnu stabilnost, antimikrobno dejstvo, kao i jednostavnost primene. [21-25]

Biokompatibilnost materijala se uglavnom posmatra kroz oslobađanje supstanci usled rastvorljivosti ili korozije. Oslobodene supstance mogu oštetiti ćelije ili dovesti do zapaljenske reakcije.

Biokompatibilnost je sposobnost materijala da izazove odgovarajući odgovor domaćina, kada se primeni kako je predviđeno. Biokompatibilan materijal ne može biti potpuno inertan, u stvari, dobar odgovor domaćina na njega je neophodan. Pored ovog klasičnog koncepta biokompatibilnosti, sve više se polemše o pojmu bioaktivan materijal. To je pre svega materijal koji ima ciljani uticaj na metabolizam ćelija sa kojima je u kontaktu. [53]

Biomaterijal je bilo koji neživi materijal koji se koristi u medicini i u interakciji je sa biološkim sistemima. Dentalni materijali stoga pripadaju grupi biomaterijala. [26,53]

Toksičnost materijala predstavlja njegovu sposobnost da dovede do oštećenja biološkog sistema hemijskim sredstvima. Kod viših organizama (životinje, ljudi) razlikujemo dva pojma- lokalnu i sistemsku toksičnost. Lokalna toksičnost nekog materijala podrazumeva javljanje neželjene reakcije na mestu aplikacije, a sistemska toksičnost podrazumeva negativno dejstvo i posledičnu reakciju na materijal na području udaljenom od mesta aplikacije. U stomatologiji, lokalne reakcije se prvenstveno javljaju u pulpi, periapikalnom parodontijumu i oralnoj mukozi. [53]

1.4.1. Osnovni principi ispitivanja citotoksičnosti *in vitro*

Stomatološki materijali mogu dovesti do oštećenja tkiva, s toga, potrebno je izvršiti niz različitih testova pre kliničke primene, kako bi se procenio rizik od nastanka štete. Rezultati ispitivanja ne zavise samo od ispitivanog materijala, već i od samih testova. Svaki pojedinačni metod ispitivanja je primenljiv samo za ispitivanje jedne neželjene reakcije tkiva. Tako, na primer, testovi na ćelijskim kulturama će otkriti samo uticaj materijala na izolovane ćelije, a legure koje ne dovode do reakcije u ćelijskim kulturama mogu dovesti do ozbiljnih reakcija u ustima pacijenta. I pored ovoga, testovi na ćelijskim kulturama su veoma značajni jer nam mogu objasniti mehanizam nastanka neželjene reakcije kod pacijenata. [26]

Ispitivanje citotoksičnosti materijala počinje jednostavnim, *in vitro* testovima na ćelijskim kulturama. Ako ova ispitivanja pokažu da je određeni materijal biokompatibilan, prelazi se na ispitivanja *in vivo*, na eksperimentalnim životinjama i ispitivanjima upotrebe. Kliničke studije su poslednji korak ispitivanja materijala pre njegovog puštanja u upotrebu.

Biokompatibilnost materijala se može odrediti direktno ili pomoću "ekstrakta". U prvom slučaju je tkivo direktno izloženo ispitivanom materijalu, dok se u drugom slučaju materijal čuva pod specifičnim uslovima, pri određenoj temperaturi u tečnosti (npr. fiziološkom rastvoru). Ta tečnost se naziva ekstrakt ili eluat i koristi se za dalja ispitivanja.[26]

Postoji veći broj testova koji ispituju biokompatibilnost stomatoloških materijala. I pored svega toga, osnovni problem ovih testova je da oni ne mogu biti široko primenjeni, onako kako želimo. Već nekoliko decenija američka uprava za hranu i lekove (FDA- *U.S. Food and Drug Administration*), istraživači i organizacije za standardizaciju predlažu stepenastu šemu ispitivanja biokompatibilnosti nosintetisanih materijala. Na dnu ove šeme se nalaze *in vitro* ispitivanja, zatim slede ispitivanja na eksperimentalnim životinjama i na kraju klinička ispitivanja na ljudima kako bi se predvidio klinički biološki učinak novih materijala.

Svi ovi testovi imaju svoje prednosti i mane, a poenta ovog stepenastog pristupa je da će svaki sledeći nivo testiranja eliminisati neadekvatne materijale, a materijali visokog rizika po zdravlje ljudi će biti eliminisani na samom početku. Ovaj proces ispitivanja materijala bi trebao biti brži i jeftiniji. Uprkos dobroj zamisli, tokom vremena se pokazalo da ova stepenasta šema ne funkcioniše kako bi trebalo. [54]

I pored svih prednosti ispitivanja *in vitro*, mane ove metode su što je veoma teško potpuno oponašati *in vivo* farmakokinetiku apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja. Takođe, kulture ćelija, posebno kontinuirane su sklone genetskoj nestabilnosti. Kulturama ćelija nedostaje kompleksnost tkiva koje se sastoji iz više tipova ćelija i time nedostaju specifične ćelijske interakcije. [55]

1.4.2. Testovi za ispitivanje biokompatibilnosti

Za procenu biokompatibilnosti stomatoloških materijala uglavnom se koriste *in vitro* testovi na determinisanim ćelijskim linijama kao primarnim ćelijama. Najčešće korišćeni testovi su: kolorimetrijski test sa tetrazolijum solima (MTT test), test odbacivanja boje (DET test) i agar difuzioni test. Njima se daje prednost u odnosu na ostale testove za ispitivanje biokompatibilnosti materijala koji se koriste u stomatologiji, zbog brzine dobijanja rezultata, niske cene istraživanja i jednostavnosti procedure. [56] Ovi testovi pružaju informacije u vezi sa različitim ćelijskim funkcijama na osnovu kojih se procenjuje biokompatibilnost materijala.

- **Test odbacivanja boje (DET- Dye exclusion test)**

Test odbacivanja boje se koristi za određivanje broja preživelih ćelija. Metoda se zasniva na mogućnosti određenih boja (kao npr. tripan plava, eozin ili propidijum) da prođu kroz oštećenu ćelijsku membranu nevijabilnih ćelija i da oboje citoplazmu. Neoštećene ćelije su bezbojne, a oštećene pokazuju difuznu ili zrnastu plavu obojenost. Procenat neobojenih ćelija jeste indeks celularne vitalnosti (*cell viability*).

Test odbacivanja boje je jednostavna i brza tehnika za merenje preživljavanja ćelija ali ima i određene nedostatke. Osnovni problem ove tehnike je taj što vijabilnost ćelija procenjuje na osnovu stanja ćelijske membrane, jer vijabilnost ćelije može biti ugrožena čak i onda kada je njena ćelijska membrana intaktna i obrnuto. Drugi potencijalni nedostatak ove metode je subjektivnost. Mali prodor boje, koji ukazuje na oštećenje ćelijske membrane, može ostati neprimećen. Zamenom transmisioh za fluorescentni mikroskop i upotrebom fluorescentnih boja rešen je i ovaj problem. Još preciznija metoda procene vijabilnosti ćelija je *flow* citometrija. [57,58]

- **Kolorimetrijski test sa tetrazolijum solima (MTT- test)**

Kolorimetrijski test sa tetrazolijum solima je prvi opisao *Mossmann* 1983. godine na većem broju ćelijskih linija. Metoda određivanja citotoksičnosti materijala zasnovana na sposobnosti vijabilnih ćelija da redukuju 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazol bromid (MTT), supstancu žute boje, rastvorljivu u vodi, kidanjem tetrazoliumovog prstena uz pomoć sukcinat dehidrogenaze koja se nalazi u mitohondrijama, u ljubičasti formazan koji je nerastvorljiv u vodi. Ova reakcija se može dogoditi samo u metabolički aktivnim ćelijama, a količina stvorenog formazana je u korelaciji sa brojem živih i metabolički aktivnih ćelija.

Novija istraživanja navode da redukcija MTT-a može biti posredovana uz pomoć NADH ili NADPH, unutar ćelije i van mitohondrija. [59,60]

- **Agar difuzioni test**

Agar difuzioni test se upotrebljava za početnu proveru biokompatibilnosti materijala. Dizajniran je tako da demonstrira nespecifičnu toksičnost ispitivanih materijala nakon difuzije kroz agar ili agarozu. Ima definisane kriterijume za nivo citotoksičnosti koji zavise od tri parametra: indeksa lize, indeksa dekolorizacije i ćelijskog odgovora.

Zona dekolorizacije oko ispitivanih materijala se ispituje pomocu invertnog mikroskopa sa kalibriranim ekranom. [61]

Iako se *in vitro* testovi najčešće koriste za ispitivanje dentalnih materijala, relevantnost rezultata dobijenih na ovaj način je diskutabilna. Prava ocena o nekom materijalu može se dati tek nakon dužeg korišćenja u kliničkoj praksi.

1.4.3. Ćelijske kulture

Ćelijske kulture su veoma vazne za istraživače u mnogim poljima nauke, one olaksavaju analizu bioloških svojstava i procesa koji nisu lako dostupni na nivou intaktnog organizma. Podaci proizvođača o biokompatibilnosti njihovih proizvoda se najčešće zasnivaju na studijama na kulturama ćelija. Ćelije ili tkiva koja se koriste u ovim studijama mogu biti sveže izolovane, porekla životinja ili ljudi i takve kulture se nazivaju primarne ćelijske kulture. Ovakve, sveže izolovane primarne ćelije će se brzo diferencirati u kulturi, imaju ograničen kapacitet umnožavanja i veoma teško se standardizuju.

Danas se najčešće koriste laboratorijski adaptirani sojevi ili linije koje se nazivaju kontinuirane ćelijske linije. One su homogene, stabilnije, slabo diferencirane, lako se serijski umnožavaju i veoma su dobro ispitane. Najčešće se koriste kontinuirane ćelijske linije mišijih fibroblasta (kao npr. L929, 3T3) i humane epitelne ćelije (HeLa), mada se mogu koristiti i primarne kulture ćelija iz eksplantata (biopsije) ciljanih tkiva, kao npr. fibroblasti gingive ili pulpe.

Nedostatak kontinuiranih ćelijskih linija je u tome što one zadržavaju veoma malo fenotipskih diferencijacija i ne predstavljaju realnu situaciju *in vivo*. Takođe, ove ćelijske linije se distribuiraju širom sveta nekontrolisano, stvarajući prostor za greške prilikom identifikacije i uvođenje zagađivača. Moguće je čak da uzorci sa istim nominalnim identitetom iz različitih izvora pokažu fenotipske razlike koje odražavaju odstupanje koji proizilazi iz različite istorije kultura. Moguće je i da različite banke istih ćelijskih linija, proizvedene u istim skladištima mogu pokazati male

razlike koje mogu biti veoma bitne u kontekstu određene studije. [54, 62]

1.5. Marginalna adaptacija

Osnovni zadatak materijala koji se koriste u periapikalnoj hirurgiji je da obezbede hermetičko zatvaranje kanala korena zuba, tj. da spreče prodor bakterija iz kanala korena zuba u okolna tkiva. [10] Stoga su kvalitetno rubno zaptivanje, odnosno adekvatna marginalna adaptacija među najznačajnijim faktorima za dugoročan uspeh tretmana.

Rubno zaptivanje materijala za retrogradno zatvaranje kanala je veoma bitan faktor uspesnosti endodonsko-hirurškog tretmana. [63-65] Idealan materijal bi trebao da obezbedi apsolutno zaptivanje ali do danas takav materijal nije proizveden. Za ispitivanje kontinuiteta veze i širine mikropukotine na spoju ispitivanih materijala i zubnog tkiva se koriste mnoge in vitro metode, metoda penetracija boja (*Indian ink*, metilensko plavo), radioizotopa, bakterija, tehnika filtracije tečnosti, konfokalnom i skening elektronskom mikroskopijom. [65] Ispitivanje marginalne adaptacije metodom penetracijom boje se danas smatra zastarelom i neadekvatnom tehnikom jer sama boja može uticati na sposobnost zaptivanja materijala. [66]

Sredina u kojoj se nalazi materijal takođe može uticati na marginalnu adaptaciju i mikročurenje, kao i mikrostruktura i površinska morfologija ispitivanog materijala. Istraživanja su pokazala da varijacije u pH vrednosti okolnog tkiva, usled postojanja inflamacije u trenutku postavljanja materijala mogu uticati na fizičke i hemijske osobine materijala. [63]

2. CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja su:

1. Ispitati biokompatibilnost amalgama, MTA i trikalcijum-silikatnog cementa na osnovu tri standardna testa citotoksičnosti: kolorimetrijskog testa sa tetrazolijum solima (MTT test), testa odbacivanja boje (DET test) i agar difuzionog testa.
2. Utvrditi da li postoji razlika u biokompatibilnosti između ispitivanih materijala.
3. Utvrditi marginalnu adaptaciju ispitivanih materijala za retrogradno zatvaranje kanala korena zuba.

2.2. Hipoteze istraživanja

1. Sva tri ispitivana materijala (amalgam, MTA i trikalcijum-silikatni cement) su biokompatibilni.
2. Ne postoji razlika u biokompatibilnosti između ispitivanih materijala.
3. MTA i trikalcijum-silikatni cement pokazuju bolju marginalnu adaptaciju u odnosu na amalgam.

3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

Eksperimentalni deo istraživanja je podeljen na dva dela. U prvom delu istraživanja je vršeno ispitivanje biokompatibilnosti materijala, dok je u drugom delu vršeno ispitivanje marginalne adaptacije na osnovu mikrofotografija dobijenih skening elektronskim mikroskopom.

3.1. Metode za ispitivanje biokompatibilnosti:

3.1.1. Izbor i priprema uzoraka

Istraživanjem su obuhvaćene tri vrste materijala (amalgam, MTA i trikalcijum-silikatni cement), a ispitivanja su izvršena na dve ćelijske linije, liniji mišjih fibroblasta (L929) i liniji humanih fibroblasta (MRC-5) koje rastu zalepljene za podlogu suda u medijumu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Gibco BRL, UK) sa 4,5 g/l glukoze i 10% FCS (fetal calf serum, NIVNS). Medijum je sadržao antibiotike: penicilin 100 IJ/ml i streptomycin 100 µg/ml. Ćelijska linija je održavana pod standardnim uslovima: na temperaturi od 37 °C u atmosferi zasićenoj vlagom sa 5% CO₂ presađivana dva puta nedeljno, a u eksperimentima je korišćena u logaritamskoj fazi rasta između trećeg i desetog presađivanja. U eksperimentima su korišćene samo žive (vijabilne) ćelije. Broj ćelija i njihova vijabilnost je određena testom odbacivanja boje sa 0,1% tripan plavim. Vijabilnost ćelija korišćenih u eksperimentu je bila veća od 90%.

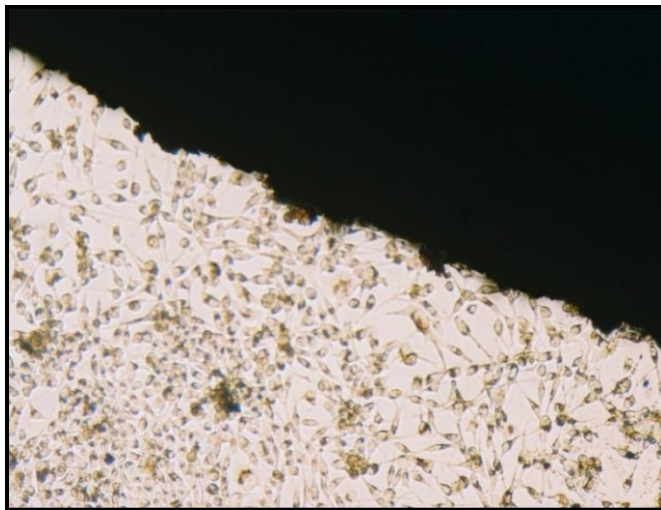
Biokompatibilnost sve tri vrste materijala će biti ispitana na osnovu standardnih testova biokompatibilnosti: DET testa, MTT testa, Agar difuzionog testa.

3.1.2. Ćelijske linije korišćene u *in vitro* uslovima

Ispitivanja su izvršena na dve ćelijske linije, liniji mišjih fibroblasta (L929) i liniji humanih fibroblasta (MRC-5) koje rastu zalepljene za podlogu suda u medijumu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Gibco BRL, UK) sa 4,5 g/l glukoze i 10% FCS (fetal calf serum, NIVNS).

L929

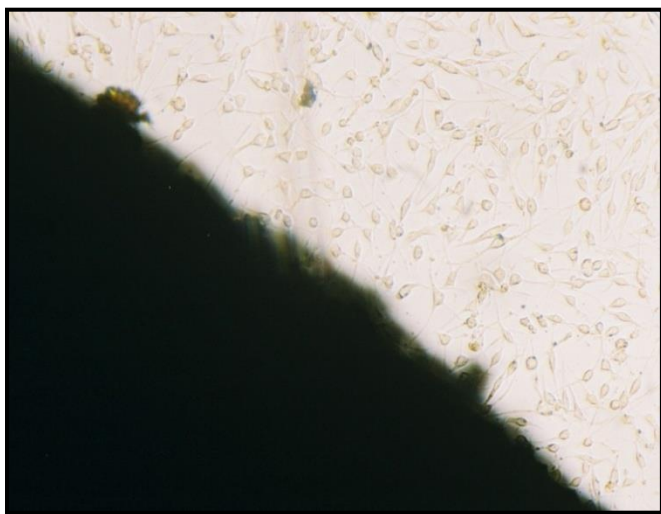
Slika 1 prikazuje ćelijsku kulturu mišijih fibroblasta L929 (ECCAC No 85011425). Ova ćelijska kultura je uspostavljena iz normalnog subkutanog masnog tkiva, 100 dana starog C3h/An miša. Liniju je uspostavio *W. R. Earle* u institutu za patologiju, u Oxfordu 1940.godine. Ćelije rastu zalepljene za podlogu. Sterilnost je dokazana testiranjem na mikoplazmu, bakterije i gljivice.



Slika 1. Ćelijska kultura fibroblasta L929, zasejana na podlozi, fokusirane ćelije u okolini materijala

MRC-5

Slika 2 prikazuje ćelijsku kulturu mišijih fibroblasta MRC5 (ECCAC No 84101801). Ova ćelijska kultura je uspostavljena iz normalnog plućnog parenhima 14 nedelja starog muškog fetusa po metodi *J.P Jacobsa* u Londonu septembra 1966.godine. Morfološki se ćelije karakterišu kao *fibroblast-like* ćelije. Ćelijska linija je diploidna sa muškim humanim kariotipom. Ćelije se multipliciraju 3-5 puta u nedelju dana. Rastu zalepljene za podlogu. Sterilnost je dokazana testiranjem na mikoplazmu, bakterije i gljivice.



Slika 2. Ćelijska kultura fibroblasta MRC-5, zasejana na podlozi, fokusirane ćelije u okolini materijala

Medijum sadrži antibiotike: penicilin 100 IJ/ml i streptomycin 100 µg/ml. Čelijska linija je održavana pod standardnim uslovima: na temperaturi od 37 °C u atmosferi zasićenoj vlagom sa 5% CO₂. Presađivana je dva puta nedeljno, a u eksperimentima je korišćena u logaritamskoj fazi rasta između trećeg i desetog presađivanja. U eksperimentima su korišćene samo žive (vijabilne) ćelije. Broj ćelija i njihova vijabilnost je određena testom odbacivanja boje sa 0,1% tripan plavim. Vijabilnost ćelija korišćenih u eksperimentu je veća od 90%. Materijali su pripremljeni prema uputstvu proizvođača, nakon čega su stavljeni u kalup prečnika 10 mm i dubine 2mm i ostavljeni da se vežu.

3.1.3. Testovi za ispitivanje biokompatibilnosti

3.1.3.1. Test odbacivanja boje *dye exclusion test*- DET test

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, tripsinizirane, resuspendovane i izbrojane u 0,1% tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u Petrijeve šolje na ispitivane supstance/diskove u koncentraciji 2x10⁵/1 ml. U kontrolnim uzorcima nije bilo supstanci. Petrijeve šolje sa zasejanim ćelijama su ostavljene u termostatu na 37 °C, sa 5% CO₂ narednih 24 časa (h). Po isteku inkubacije, nakon 24h vršilo se brojanje ćelija uz pomoć invertnog mikroskopa u komoricama za brojanje. Korišćena je *Neubauer*-ova komorica gde se ćelije broje u četiri kvadrata. Svaki kvadrat je podeljen na 16 manjih kvadrata tako da ih ima ukupno 64. Nakon toga se uzima 100 µl ćelija i tome dodati 100 µl boje 0,1% tripan-plavo. Nakon intenzivnog mućkanja nekoliko kapi se nanosina oba polja komorice za brojanje. Tripan- plavo boji mrtve ćelije, dok žive ćelije ostaju neobojene.

Broj ćelija u 1 ml suspenzije se izračunava iz formule:

$$X = x \cdot 10 \cdot 2 \cdot 1000$$

10- dubinakomora

2 - faktor dilucije

1000 - zapreminski koeficijent

x - broj ćelija u 16 kvadrata (prosečan broj ćelija u 4x16 kvadrata). Citotoksičnost će biti izražena procentom, prema formuli:

$CI = (1 - N_s/N_k) \times 100$, pri čemu je N_k broj ćelija kontrolnih uzoraka, a N_s broj ćelija uzoraka sa ispitivanom supstancom.

Frakcija preživelih ćelija izražava se kao procenat od kontrolne vrednosti, prema formuli:

$\%K = (Ns/Nk) \times 100$, pri čemu je Nk broj ćelija kontrolnih uzoraka, a Ns broj ćelija uzoraka sa ispitivanom supstancom.

3.1.3.2. Kolorimetrijski test sa tetrazolijum solima- MTT test

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, tripsinizirane, resuspendovane i izbrojane u 0,1% tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u Petrijeve šolje u kojima se nalazi ispitivane supstance/ diskovi, u koncentraciji 2×10^5 /ml. Kontrolni uzorci ne sadrže ispitivane supstance. Petrijeve šolje sa zasejanim ćelijama ostavljaju se u termostat na $37\text{ }^\circ\text{C}$, sa 5% CO_2 naredna 24h. Po isteku inkubacije, vrši se presejavanje ćelija sa ispitivanih supstanci u svež medijum. Vijabilne ćelije će biti posejane (5×10^3 / $100\text{ }\mu\text{l}$) u kvadriplikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora. Ploče sa zasejanim ćelijama ostavljaju se u termostat na $37\text{ }^\circ\text{C}$, sa 5% CO_2 naredna 24, 48, 72 časa. Rastvor MTT je pripremljen neposredno pre dodavanja, i dodaje se u sve otvore na ploči u zapremini od $10\text{ }\mu\text{l}$ /otvoru i inkubacija je nastavljena naredna 3h (u termostatu na $37\text{ }^\circ\text{C}$, sa 5% CO_2). Po isteku 3h u svaki otvor je dodato po $100\text{ }\mu\text{l}$ 0.04 mol/l HCl u izopropanolu. Apsorbancija je očitavana odmah po isteku inkubacije na čitaču za mikrotitar ploče (Multiscan, MCC/340) na talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj od 690 nm . Otvori na ploči koji sadrže samo medijum i MTT, ali ne i ćelije, služe kao slepa proba ("blank").

Citotoksičnost će biti izražena procentom prema formuli:

$$CI = (1 - As/Ak) \times 100,$$

pri čemu je Ak apsorbancija kontrolnih uzoraka, a As apsorbancija uzoraka sa ispitivanim diskom.

Frakcija preživelih ćelija izražava se kao procenat od kontrolne vrednosti prema formuli:

$$\%K = (Ns/Nk) \times 100,$$

pri čemu je Nk broj ćelija kontrolnih uzoraka, a Ns broj ćelija uzoraka sa ispitivanom supstancom.

3.1.3.3. Agar difuzioni test

U istraživanju je korišćen *Eagle's Basal Medium* koji sadrži 2,2 g/l natrijum bikarbonata, 3,0 g/l HEPES-a i 50 ml/l seruma.

Pripremljena je dupla koncentracija medijuma bez HEPES-a i redukovati Na₂CO₃ na 1 g/l I bilo koji 3% agar ili 3% agarozu u destilovanoj vodi.

Agar je sterilisan autoklaviranjem, a medijum filtriranjem. Osnovna boja je pripremljena rastvaranjem stok solucije 1% vodenog rastvora *neutral red* u 1/100 ml/l slanog fosfatnog pufera, neposredno pre korišćenja. Rastvor *neural red* je čuvan zaštićen od svetla.

Korišćene su Petri šolje prečnika 100 mm pogodne za ćelijsku kulturu.

Test procedura

Koriscene su ćelije u logaritamskoj fazi rasta. Pripremljeno je po 10 ml ćelijske suspenzije (2,5x10⁵ ćelija/ml) u Petri šoljama i inkubirano na 37 °C, 5% CO₂, 24h.

Sterilni agar je otopljen na 100 °C u vodenom kupatilu i ohlađen na 48 °C. Agar je pomešan sa dva puta koncentrovanim, sveže pripremljenim medijumom (1:1) i zagrejan na 48 °C. Aspiriranje medijum iz svake Petri šolje i zamenjen je sa 10 ml svežom agar/medijum mešavinom. Agar je ostavljen da očvrstne na sobnoj temperaturi (oko 30 min), a zatim je dodato 10 ml *neutral red* rastvora i ostavljeno 15 – 20 min. Višak *neutral red* rastvora je usisan. Petri šolja je zaštićena od svetla, da se u prisustvu *neutral red*-a ćelije ne bi oštetile. U svaki sud je dodato po dva uzorka test materijala i kontrole, pazeći da uzorci budu udaljeni jedan od drugog i od zidova Petri šolje. Inkubirano je na 37 °C, 5% CO₂, 24h. Ispitivan materijal je ispitan u kvadriplikatu (dva suda po test materijalu).

Obezbojenost zone oko testiranog materijala i kontrola je procenjena pomoću invertnog mikroskopa sa kalibrisanom pregradom, a indeks obezbojavanja (*Decolorization Index*) i indeks liziranja (*Lysis Index*) će biti određeni za svaki uzorak.

Izračunavanje:

Obezbojenost zone oko testiranog materijala se procenjuje invertnim mikroskopom sa kalibrisanom pregradom, a Indeks obezbojavanja (*Decolorization Index*) i indeks liziranja (*Lysis Index*) se određuje za svaki uzorak (proverava se slaganje sa određenim kriterijumima).

Indeks obezbojavanja

- 0 - nema vidljivog obezbojavanja
- 1 - Obezbojavanje samo ispod testirane supstance
- 2 - Zona obezbojavanja nije veća od 5mm oko testirane supstance
- 3 - zona obezbojavanja nije veća od 10mm oko testirane supstance
- 4 - zona obezbojavanja je veća od 10mm oko testirane supstance
- 5 - cela kultura je obezbojena

Indeks liziranja

- 0 - nema detektovane lize ćelija
- 1 - manje od 20% ćelija lizirano
- 2 - 20%-40% ćelija lizirano
- 3 - 40%-60% ćelija lizirano
- 4 - 60%-80% ćelija lizirano
- 5 - više od 80% ćelija lizirano.

3.2. Metode za ispitivanje marginalne adaptacije:

3.2.1. Izbor i priprema uzoraka

Istraživanje je sprovedeno na 90 ekstrahovanih jednokorenih zuba interkaninog sektora gornje vilice sa intaktnom pulpom, završenim rastom korena, bez frakture i resorpcije korena zuba. Iz istraživanja su izuzeti zubi sa velikom apikalnom zakrivljenosti. Svi zubi su ekstrahovani zbog terminalnog stadijuma parodontopatije. Do početka eksperimenta su čuvani u destilovanoj vodi, koja je menjana na svake dve nedelje. Nakon ekstrakcije, zubi su isprani destilovanom vodom, a hirurskom kiretom je uklonjeno zaostalo meko tkivo.

Zubi su naizmenično podeljeni u 3 grupe (30 zuba po grupi). Prvu grupu su činili zubi kojima

je apikalni kavitet ispunjen amalgamom, u drugoj grupi apikalni kavitet je ispunjen MTA, a u trećoj trikalcijum-silikatnim cementom.

Upotreba humanih zuba odobrena je odlukom Etičke komisije Klinike za stomatologiju i Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

3.2.2. Mehaničko-medikamentozna obrada i opturacija kanala korena zuba

Pre endodontskog tretmana, svim zubima je uklonjena anatomska krunica zuba, na cementno-gleđnoj granici i njihova dužina će biti standardizovana na 15mm. Intrakanalno tkivo je ekstirpirano pulpektiratorom, a dalja obrada kanala će biti vršena ručnim endodontskim instrumentima, tehnikom *Crown-down*, uz stalnu irigaciju 4% rastvorom natrijum hipohlorita.

Svi kanali su u apikalnoj trećini zuba obrađeni proširivačem ISO 40, do radne dužine. Srednji i koronarni deo kanala su prošireni proširivačem ISO 50. Nakon irigacije, kanali su sušeni papirnim poenima.

Opturacija kanala svih zuba je vršena gutaperkom i pastom AH-26 (DeTrey, Dentsply, Konstanz, Germany), tehnikom lateralne kondenzacije. Nakon opturacije, zubi su ostavljeni u vlažnoj sredini na 48h, da bi se sprečile frakture prilikom sečenja.

3.2.3. Resekcija i retrogradna opturacija kanala korena zuba

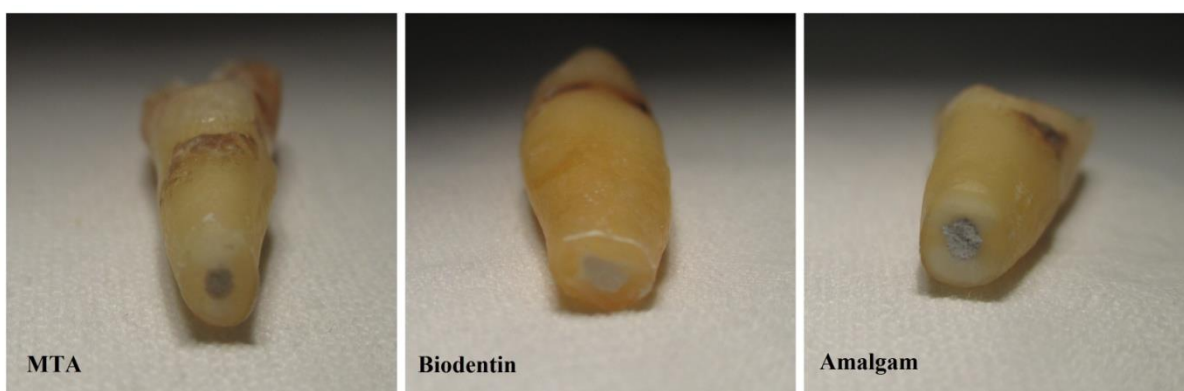
Nakon mehaničko medikamentozne obrade i opturacije kanala korena zuba, vršena je resekcija vrha korena zuba. Vrhovi korena zuba su skraćivani 3mm i preparisati do dubine od 3 mm unutar kanala, ultrazvučnim nastavcima (EMS, miniMaster Piezon scaler). (Slika 3)

Retrogradna opturacija je vršena ispitivanim materijalima u zavisnosti od grupe kojoj pripadaju. (Slika 4)

Nakon retrogradne opturacije, zubi su ostavljeni u vlažnoj sredini 48h, do potpunog vezivanja ispitivanih materijala. Nakon vezivanja ispitivanih materijala, zubi su sečeni longitudinalno, finom dijamantskom šajbnom uz prisustvo vode. Marginalna adaptacija ispitivanih materijala je procenjena skening elektronskim mikroskopom (SEM).



Slika 3. Preparacija retrogradnog kaviteta ultrazvučnim nastavcima



Slika 4. Retrogradna opturacija ispitivanim materijalima

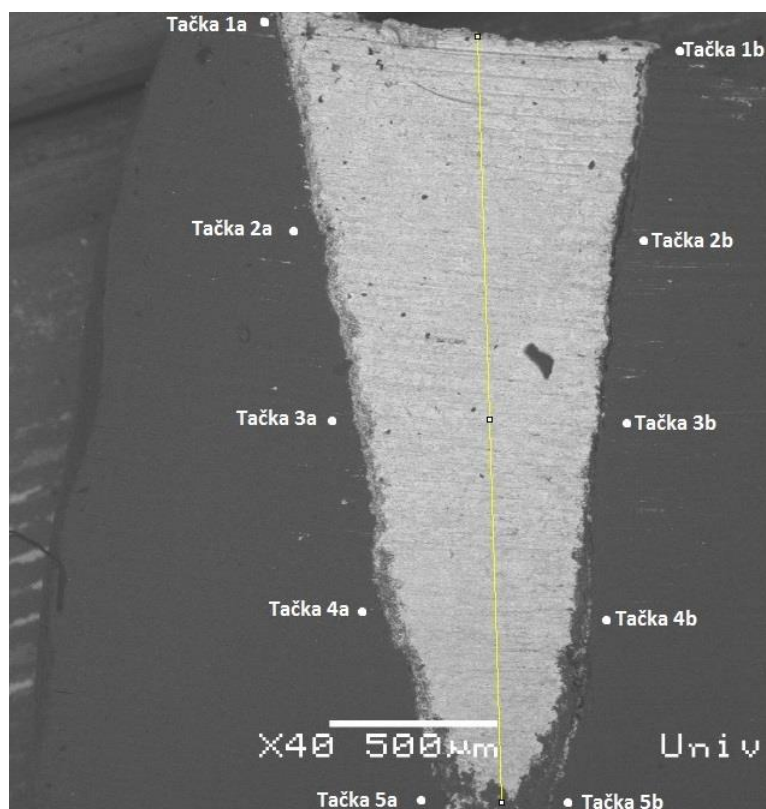
3.2.4. Skening elektronska mikroskopija

Snimanje je urađeno u Univerzitetskom centru za elektronsku mikroskopiju Novi Sadelektronskim skenirajućim mikroskopom (SEM) niskog vakuma (JEOL-JSM 6460 *Low Vacuum*, Tokyo, Japan).

Pripremljeni uzorci su posmatrani pod uvećanjima 30x, 40x, 80x i 100x. Uvećanje 30x je rađeno radi prikaza celokupnog retrogradnog punjenja jednom snimku, tj. spoja materijal-zub. Nakon toga je napravljeno višeuzastopnih snimakasa uvećanjem 80x do pune dužine materijala. Na taj način je utvrđeno postojanje i izvršeno merenje marginalne pukotine u mikrometrima. Dopunska ispitivanja su vršena pod uvećanjem 100x, radi boljeg uvida u kvalitet marginalne adaptacije ispitivanih materijala.

Merenja ukupne dužine marginalne pukotine u mikrometrima u 5 tačaka sa obe strane

preparata su vršena u softverskoj aplikaciji *Image J software* (*National Institutes of Health, Bethesda, USA*). Tačke su izabrane tako da tačka 1a i tačka 5a predstavljaju gornju i donju ivicu preparata. Tačka 3a predstavlja sredinu rastojanja između tačke 1a i tačke 5a. Tačka 2a i tačka 4a predstavljaju sredinu razmaka između tačke 1a i 3a, odnosno 3a i 5a. Tačke 1b-5b su naspramne tačke. (Slika 5)



Slika 5. Primer merenja u pet tačakavršena softverskom aplikacijom ImageJ

4. REZULTATI

4.1. Biokompatibilnost ispitivanih materijala

4.1.1. Rezultati testa odbacivanja boje- *dye exclusion test*(DET)

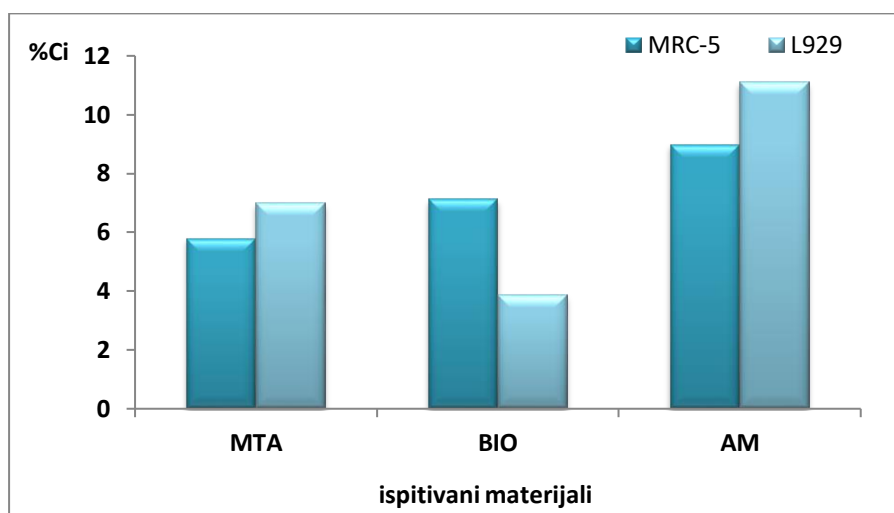
Srednja vrednost nivoa citotoksičnosti na ćelijskoj liniji MRC5 za MTA je iznosila 5,79%, za biodentin 7,12%, a za amalgam 8,99%, što je ujedno i najveća vrednost indeksa citotoksičnosti u ovoj ćelijskoj kulturi. Srednja vrednost indeksa citotoksičnosti na ćelijskoj liniji L929 za biodentin je iznosila 3,85%, za MTA 7,00%. I u ovoj ćelijskoj kulturi amalgam je pokazao najveći indeks citotoksičnosti 11,10%. (Tabela 3, Grafikon 1)

Rezultati biokompatibilnosti ukazuju na visok stepen ćelijske kompatibilnosti svih ispitivanih materijala. Međutim, nije utvrđena statistički značajna razlika u citotoksičnosti između istovetnih ispitivanih materijala u obe ćelijske linije (T test, MRC5-L929, $p=,99$), niti između sva tri ispitivana materijala u obe ćelijske kulture (T test, amalgam-biodentin $p=,16$; amalgam-MTA, $p=,12$; biodentin-MTA, $p=,68$).

Osnovni pokazatelji deskriptivne statistike za ispitivanje citotoksičnosti uz pomoć DET testa su prikazani u Tabeli 4.

Tabela 3. Indeks citotoksičnosti ispitivanih materijala

Vrsta materijala	Indeks citotoksičnosti (% Ci) na ćelijskoj liniji MRC 5	Indeks citotoksičnosti (% Ci) na ćelijskoj liniji L929
MTA	5,79	7,00
BIODENTIN	7,12	3,85
AMALGAM	8,99	11,10



Grafikon 1. Grafički prikaz indeksa citotoksičnosti ispitivanih materijala na ćelijskim linijama

*%Ci- indeks citotoksičnosti

*MTA- mineral trioksid agregat

*BIO- biodentin

*AM- amalgam

Tabela 4. Osnovni pokazatelji deskriptivne statistike za sve ispitivane grupe

DET test	MTA	BIO	AM
%Ci na ćelijskoj kulturi MRC5	5.79	7.12	8.99
%Ci na ćelijskoj kulturi L929	7,00	3.85	11.10
Srednja vrednost	6.40	5.49	10.05
SD *	0.86	2.31	1.49
SE*	0.61	1.64	1.06

*SD - standardna devijacija (odstupanje)

*SE - standardna greška srednje vrednosti

*MTA- mineral trioksid agregat

*BIO- biodentin

*AM- amalgam

4.1.2. Rezultati kolorimetrijskog testa sa tetrazolijum solima- MTT test

Uticaj ispitivanih materijalana rast ćelija meren je MTT testom 24h, 48h i 72h nakon inkubacije. Ćelijski odgovor dve ćelijske linije, L929 i MRC 5 prikazuje procenat preživljavanja ćelija nakon inkubacije.

Nakon 24h, u ćelijskoj liniji MRC 5 najveći procenat citotoksičnosti je pokazao MTA sa

12,81%, dok je najmanju citotoksičnost pokazao amalgam sa 10,15%. U ćelijskoj liniji L929 najveći procenat citotoksičnosti je pokazao amalgam sa 21,59%, a najmanje citotoksičan je biodentin sa indeksom citotoksičnosti 14,62%. (Tabela 5)

Tabela 5. Rezultati MTT testa nakon 24h inkubacije sa ispitivanim materijalima

Vrsta materijala	Indeks citotoksičnosti (%Ci) na ćelijskoj liniji MRC 5	Indeks citotoksičnosti (%Ci) na ćelijskoj liniji L929
MTA	12,81	15,30
BIODENTIN	10,79	14,62
AMALGAM	10,15	21,59

Nakon 48h, došlo je do smanjenja indeksa citotoksičnosti kod svih ispitivanih materijala i na obe ćelijske linije, što ukazuje na oporavak ćelijskog metabolizma.

Amalgam je pokazao najmanji procenat citotoksičnosti u obe ćelijske linije. Na ćelijskoj liniji MRC 5 indeks citotoksičnosti je iznosio 3,48%, a na ćelijskoj liniji L929 8,95%. Na ćelijskoj liniji MRC 5, indeks citotoksičnosti za MTA je iznosio 9,83%, a za biodentin 6,76%. Na ćelijskoj liniji L929 te vrednosti su nešto više, te indeks citotoksičnosti MTA iznosi 11,93%, a za biodentin 12,60% (Tabela 6).

Tabela 6. Rezultati MTT testa nakon 48h inkubacije sa ispitivanim materijalima

Vrsta materijala	Indeks citotoksičnosti (%Ci) na ćelijskoj liniji MRC 5	Indeks citotoksičnosti (%Ci) na ćelijskoj liniji L929
MTA	9,83	11,93
BIODENTIN	6,76	12,60
AMALGAM	3,48	8,95

Nakon 72h, nastavlja se trend smanjenja indeksa citotoksičnosti u svim grupama. MTA pokazuje najveće vrednosti indeksa citotoksičnosti i to na ćelijskoj liniji MRC 5 sa 4,41%, a na ćelijskoj liniji L929 8,32%. Indeksi citotoksičnosti amalgama iznose -0,62% na ćelijskoj liniji MRC 5 i 2,06% na L929, što je ujedno najmanja vrednost za tu ćelijsku kulturu. Biodentin pokazuje najmanju citotoksičnost na ćelijskoj liniji MRC 5 sa -3,95% i 2,67% na ćelijskoj liniji L929 (Tabela 7).

Osnovni pokazatelji deskriptivne statistike za ispitivanje citotoksičnosti uz pomoć MTT testana obe ćelijske linije su prikazani u Tabelama 8 i 9.

Na grafikonima 2 i 3 prikazano je kretanje vrednosti indeksa citotoksičnosti na ćelijskim kulturama L929 i MRC5 u funkciji vremena. Uočava se smanjenje tih vrednosti tokom

vremena za sve ispitivane materijale.

Tabela 7. Rezultati MTT testa nakon 72h inkubacije sa ispitivanim materijalima

Vrsta materijala	Indeks citotoksičnosti (%Ci) na ćelijskoj liniji MRC 5	Indeks citotoksičnosti (%Ci) na ćelijskoj liniji L929
MTA	4,41	8,32
BIODENTIN	-3,95	2,67
AMALGAM	-0,62	2,06

Tabela 8. Osnovni pokazatelji deskriptivne statistike na ćelijskoj liniji MRC5

	MTA	BIO	AM
24h	12.81	10.79	10.15
48h	9.83	6.76	3.48
72h	4.41	-3.95	-0.62
Srednja vrednost	9.02	4.53	4.34
SD *	4.26	7.62	5.44
SE*	2.46	4.4	3.14

*SD - standardna devijacija (odstupanje)

*SE - standardna greška srednje vrednosti

*MTA- mineral trioksid agregat

*BIO- biodentin

*AM- amalgam

Tabela 9. Osnovni pokazatelji deskriptivne statistike na ćelijskoj liniji L929

	MTA	BIO	AM
24h	21.59	14.62	15.3
48h	8.95	12.6	11.93
72h	2.06	2.67	8.32
Srednja vrednost	10.87	9.96	11.85
SD *	9.91	6.4	3.49
SE*	5.72	3.69	2.02

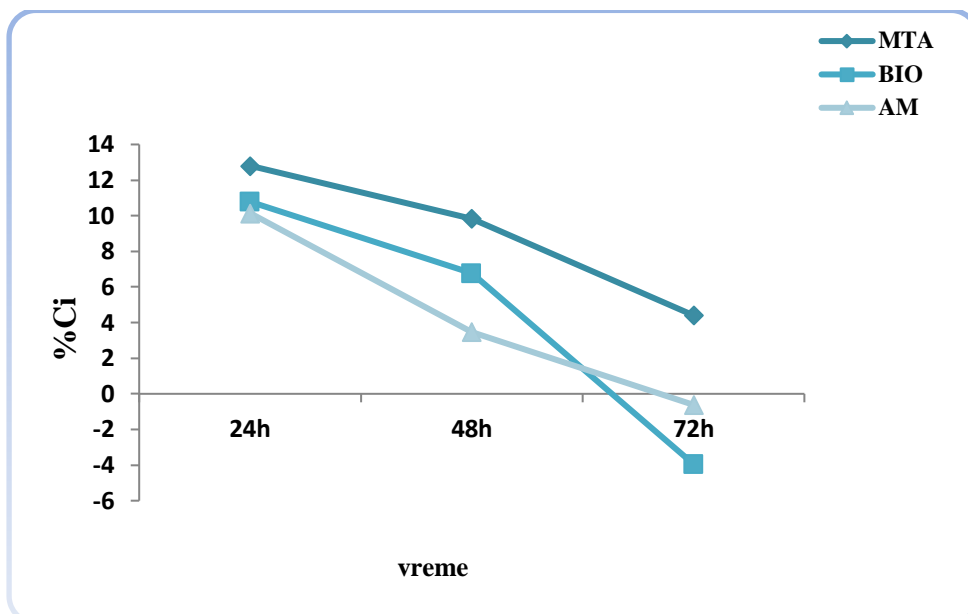
*SD - standardna devijacija (odstupanje)

*SE - standardna greška srednje vrednosti

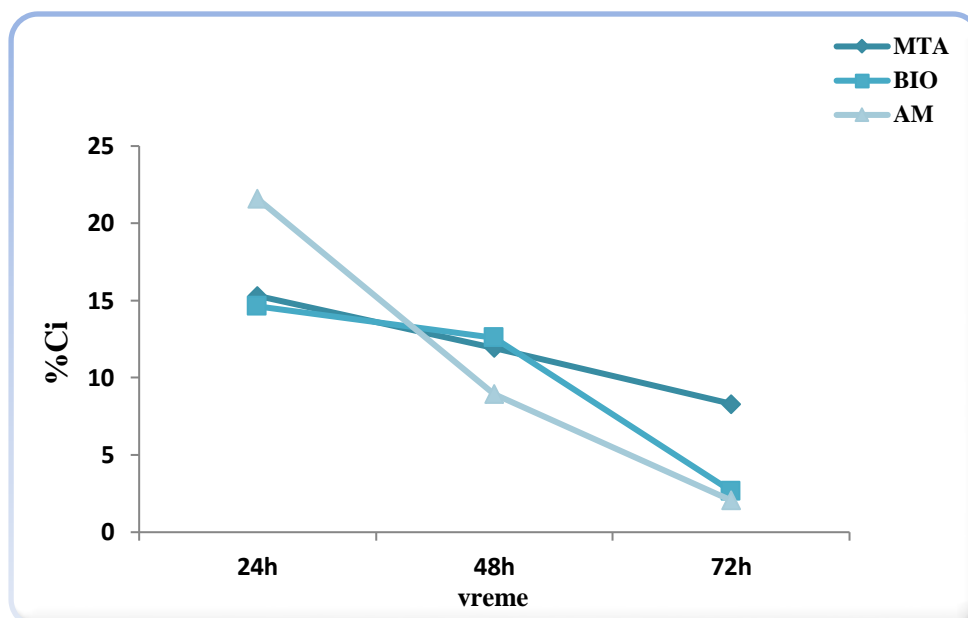
*MTA- mineral trioksid agregat

*BIO- biodentin

*AM- amalgam



Grafikon 2. Indeks citotoksičnosti ispitivanih materijala ispoljen na ćelijskoj liniji MRC5 prikazan u funkciji vremena



Grafikon 3. Indeks citotoksičnosti ispitivanih materijala ispoljen na ćelijskoj liniji L929 prikazan u funkciji vremena

Poređenjem rezultata nakon 24h i 48h, kao i nakon 48h i 72h uočava se da su dobijene srednje vrednosti indeksa citotoksičnosti kod sva tri ispitivana materijala i na obe ćelijske linije manje nakon 48h, odnosno nakon 72h.

Poređenjem rezultata nakon 24h i nakon 72h, uočava se znatno veći pad vrednosti indeksa citotoksičnosti nakon 72h kod sva tri ispitivana materijala i na obe ćelijske linije.

U kulturi ćelija MRC5, kod sva tri ispitivana materijala postoji statistički značajna razlika između indeksa citotoksičnosti izmerenog nakon 24h i nakon 72h, stepen značajnosti iznosi 0.013 ($p < .05$). (Tabela 10)

U kulturi ćelija L929 takođe postoji statistički značajna razlika između indeksa citotoksičnosti izmerenog nakon 24h i nakon 72h, stepen značajnosti iznosi $p=.008$ ($p < .05$).

(Tabela 11)

Tabela 10. Rezultati parametarskog ANOVA testa za indeks citotoksičnosti u funkciji vremena na ćelijskoj liniji MRC5

%Ci	SS	df	Mean square	F	p
Između grupa	194.031	2	97.016	9.791	.013
Unutar grupa	59.450	6	9.908		
Ukupno	253.482	8			

*SS- sredina kvadrata (sum of squares)

*df- stepen slobode (degrees of freedom)

*F- F test

Tabela 11. Rezultati parametarskog ANOVA testa za indeks citotoksičnosti u funkciji vremena na ćelijskoj liniji L929

%Ci	SS	df	Mean square	F	p
Između grupa	246.849	2	123.424	12.157	.008
Unutar grupa	60.914	6	10.152		
Ukupno	307.762	8			

*SS- sredina kvadrata (sum of squares)

*df- stepen slobode (degrees of freedom)

*F- F test

4.1.3. Rezultati agar difuzionog testa

Pri očitavanju rezultata nije uočena dekolorizacija, niti liza ćelija ispod ispitivanih materijala. Ćelijski odgovor je 0/0 što ukazuje da ovim testom nije utvrđeno postojanje citotoksičnog efekta ispitivanih materijala na ćelijske linije L929 i MRC-5. (Tabela 12)

Tabela 12. Rezultati agar difuzionog testa

	Ćelijska linija MRC5			Ćelijska linija L929		
	index lize	index dekolorizacije	ćelijski odgovor	index lize	index dekolorizacije	ćelijski odgovor
MTA	0	0	0/0	0	0	0/0
BIODENTIN	0	0	0/0	0	0	0/0
AMALGAM	0	0	0/0	0	0	0/0

4.2. Marginalna adaptacija

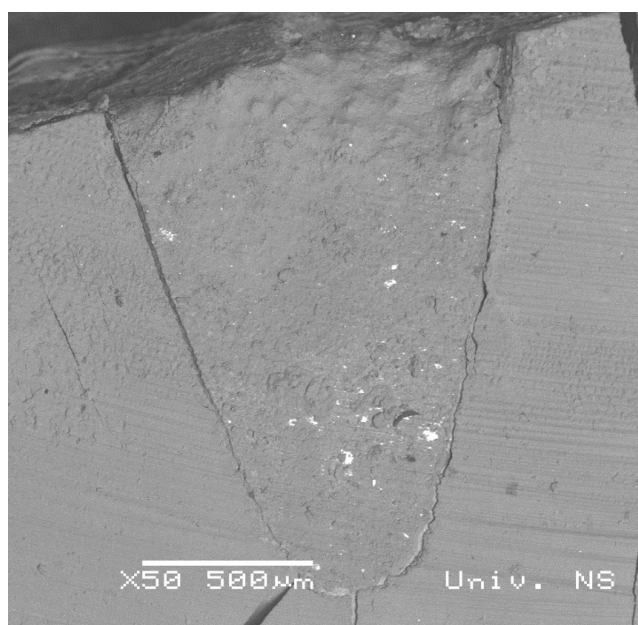
4.2.1. Rezultati merenja marginalne pukotine MTAprimenom skening elektronske mikroskopije

Slika 6 predstavlja SEM mikrofotografiju preparata na kom je kao materijal za retrogradno zatvaranje korišćen MTA sa uvećanjem 50x.

U Tabeli 13 prikazane su srednje vrednosti, standardna devijacija, medijana, kao i minimalne i maksimalne vrednosti merenja ukupne dužine marginalne pukotine u mikrometrima u 5 tačaka sa obe strane preparata.

Srednja vrednost za sve ispitivane tačke kod preparata kod kojih je kao materijal za retrogradno zatvaranje korišćen MTA iznosi 8,17 μ m.

Aritmetička sredina izmerenih dužina marginalne pukotine je najveća u tačkama 1a i 1b (11,85 μ m i 11,17 μ m), a nakon toga dolazi do smanjenja tih vrednosti do tačaka 5a i 5b kada su ove vrednosti najmanje (4,61 μ m i 5,17 μ m). Maksimalne vrednosti dužine marginalne pukotine su takođe najveće na tačkama 1a i 1b (47,83 μ m i 61,39 μ m), a najmanje na tačkama 5a i 5b (18,64 μ m i 17,75 μ m).



Slika 6. SEM mikrofotografija preparata na kom je kao materijal za retrogradno zatvaranje korišćen MTA-uvećanje 50x

Tabela 13. Osnovni pokazatelji deskriptivne statistike za merenje marginalne pukotine MTA (n=30)

	AS (μm)	SD (μm)	M (μm)	MAX (μm)	MIN (μm)
Tačka 1a	11,85	10,38	9,36	47,83	0
Tačka 2a	10,33	7,48	8,16	25,41	0
Tačka 3a	10,16	8,52	8,07	29,78	0
Tačka 4a	7,53	6,68	7,81	25,55	0
Tačka 5a	4,61	5,83	3,52	18,64	0
Tačka 1b	11,17	14,55	5,38	61,39	0
Tačka 2b	7,67	8,37	5,13	34,32	0
Tačka 3b	7,78	9,42	5,59	32,47	0
Tačka 4b	5,41	6,87	4,47	27,98	0
Tačka 5b	5,17	5,22	3,41	17,75	0

AS- aritmetička sredina

SD- standardna devijacija

M- medijana

MAX- maksimalna ostvarena vrednost

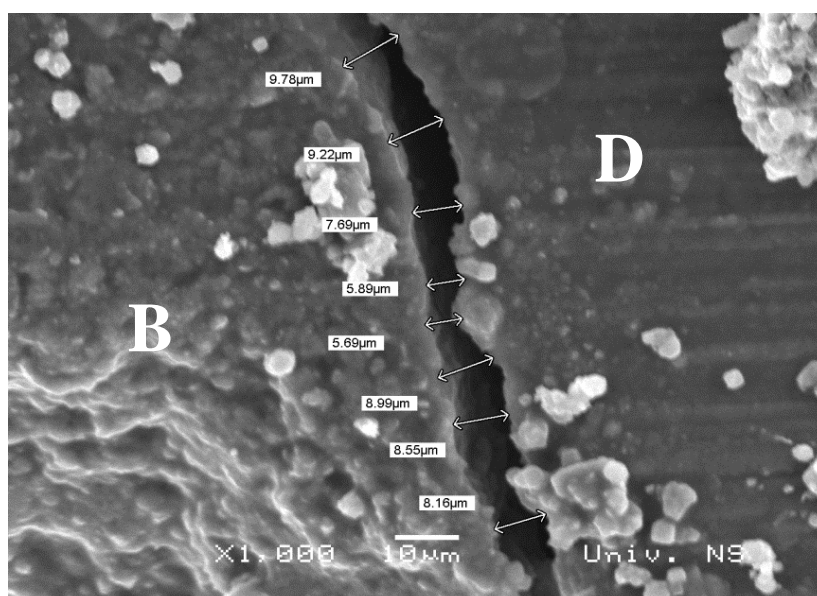
MIN- minimalna ostvarena vrednost

4.2.2. Rezultati merenja marginalne pukotine biodentinaprimenom skening elektronske mikroskopije

Slika 7 predstavlja SEM mikrofotografiju preparata na kom je kao materijal za retrogradno zatvaranje korišćen biodentin.

Srednja vrednost za sve ispitivane tačke kod preparata kod kojih je kao materijal za retrogradno zatvaranje korišćen biodentin iznosi 8,53 μm .

Aritmetička sredina izmerenih dužina marginalne pukotine je najveća u tačkama 2a i 1b (12,97 μm i 14,40 μm), a najmanja u tačkama 5a i 4b (4,61 μm i 5,17 μm). Maksimalne vrednosti dužine marginalne pukotine su takođe najveće na tačkama 2a i 2b (49,56 μm i 53,38 μm), a najmanje na tačkama 1a i 5b (27,78 μm i 22,81 μm). (Tabela 14)



Slika 7. SEM mikrofotografija uzorka zuba sa prikazom marginalne pukotine između biodentinai dentina-uvećanje 1000x. B-biodentin, D-dentin

Tabela 14. Osnovni pokazatelji deskriptivne statistike za merenje marginalne pukotine biodentina (n=30)

	AS (µm)	SD (µm)	M (µm)	MAX (µm)	MIN (µm)
Tačka 1a	11,13	12,25	9,06	27,78	0
Tačka 2a	12,97	14,66	6,59	49,56	0
Tačka 3a	8,62	11,91	3,45	44,60	0
Tačka 4a	7,59	10,53	2,14	37,28	0
Tačka 5a	6,63	12,08	2,86	47,93	0
Tačka 1b	14,40	14,90	8,39	52,63	0
Tačka 2b	7,70	12,14	3,29	53,38	0
Tačka 3b	6,26	8,57	3,06	30,51	0
Tačka 4b	4,63	6,18	3,25	26,32	0
Tačka 5b	5,34	6,71	3,37	22,81	0

AS- aritmetička sredina

SD- standardna devijacija

MAX- maksimalna ostvarena vrednost

MIN- minimalna ostvarena vrednost

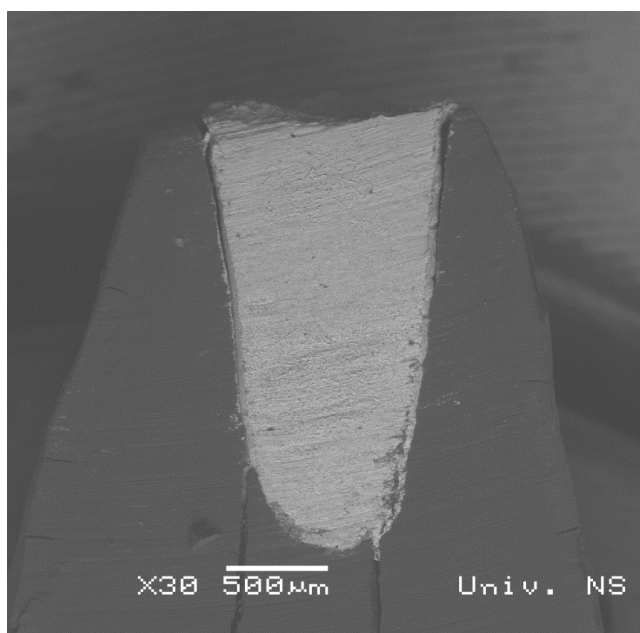
4.2.3. Rezultati merenja marginalne pukotine amalgamaprimenom skening elektronske mikroskopije

SEM mikrofotografija preparata na kom je kao materijal za retrogradno zatvaranje korišćen amalgam prikazana je na Slici 8.

U Tabeli 15 prikazani su osnovni statistički pokazatelji merenja dužine marginalne pukotine kod preparata gde je kao materijal za retrogradno zatvaranje korišćen amalgam.

Srednja vrednost za sve ispitivane tačke kod preparata kod kojih je kao materijal za retrogradno zatvaranje korišćen amalgam iznosi $9,13\mu\text{m}$.

Aritmetička sredina izmerenih dužina marginalne pukotine je najveća u tačkama 1a i 1b ($26,64\mu\text{m}$ i $19,74\mu\text{m}$), a nakon toga dolazi do smanjenja tih vrednosti do tačkaka 5a i 5b kada su ove vrednosti najmanje ($2,06\mu\text{m}$ i $2,13\mu\text{m}$). Maksimalne vrednosti dužine marginalne pukotine su takođe najveće na tačkama 1a i 1b ($75,25\mu\text{m}$ i $74,89\mu\text{m}$), a najmanje na tačkama 5a i 5b ($14,25\mu\text{m}$ i $19,32\mu\text{m}$).



Slika 8. SEM mikrofotografija preparata na kom je kao materijal za retrogradno zatvaranje korišćen amalgam-uvećanje 30x

Tabela 15. Osnovni pokazatelji deskriptivne statistike za merenje marginalne pukotine amalgama (n=30)

	AS (μm)	SD (μm)	M (μm)	MAX (μm)	MIN (μm)
Tačka 1a	26,64	25,16	17,28	75,25	0
Tačka 2a	9,87	14,09	3,88	48,46	0
Tačka 3a	4,93	8,76	0,00	35,44	0
Tačka 4a	5,39	10,12	0,00	31,25	0
Tačka 5a	2,06	4,37	0,00	14,25	0
Tačka 1b	19,74	22,16	13,70	74,89	0
Tačka 2b	8,38	11,36	5,63	50,17	0
Tačka 3b	6,96	9,27	4,24	32,61	0
Tačka 4b	5,23	7,39	0,00	20,71	0
Tačka 5b	2,13	4,73	0,00	19,32	0

AS- aritmetička sredina

SD- standardna devijacija

M- medijana

MAX- maksimalna ostvarena vrednost

MIN- minimalna ostvarena vrednost

4.2.4. Poređenje kvaliteta marginalne adaptacije ispitivanih materijala

Najpre su tačke merenja s leve i desne strane uprosečene. Naime, tačka 1 je posmatrana kao srednja vrednost tačaka 1a i 1b i na isti način su posmatrane tačke 2, 3, 4 i 5. Rezultati *Kolmogorov-Smirnov* testa (K-S) pokazuju da distribucije svih mera značajno odstupaju od normalne distribucije (Tabela 16). S obzirom na to, u daljim analizama su primenjeni neparametrijski statistički testovi.

Tabela 16. Deskriptivni pokazatelji marginalne adaptacije ispitivanih materijala i testiranje normalnosti distribucije ($N = 90$).

	<i>AS</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	Skjunis (<i>SG = 0,25</i>)	Kurtozis++ (<i>SG = 0,50</i>)	<i>K-S(90)</i>
Tačka 1	15,82	15,62	9,48	1,81	3,74	0,19***
Tačka 2	9,49	9,52	6,42	1,91	4,50	0,16***
Tačka 3	7,45	7,38	5,25	1,39	1,80	0,17***
Tačka 4	5,96	6,47	3,78	1,57	2,59	0,18***
Tačka 5	4,33	5,95	2,73	3,22	13,79	0,23***
Tačke 2-4	7,63	6,49	6,15	1,90	4,74	0,16***
Tačke 1- 5(ukupno)	8,61	6,59	6,69	2,06	5,23	0,16***

AS - aritmetička sredina

SD - standardna devijacija

M – medijan

SG -standardna greška

K-S - Kolmogorov-Smirnovljev test za $df = 90$

*** $p < 0.001$.

U cilju testiranja razlike u pogledu marginalne adaptacije ispitivanih materijala, primenjena je neparametrijska analiza varijanse. Najpre su testirane razlike na prvoj tački merenja. Rezultati pokazuju da postoje značajne razlike između materijala, $p < ,05$ (Tabela 17). Za *post hoc* test je korišćen *Mann-Whitney* test (M-W) (Tabela 18). Rezultati ovog testa pokazuju da amalgam ima značajno više vrednosti u odnosu na preostala dva materijala(u poređenju sa MTA $M-W = 285,00$, $p = ,015$, a u poređenju sa biodentinom $M-W = 301,50$, $p = ,028$), dok se vrednosti za MTA i biodentin međusobno značajno ne razlikuju ($M-W = 439,00$, $p = ,871$).

Kao još jedna referentna tačka uzeta je tačka merenja 5. U odnosu na vrednosti u ovoj tački merenja zabeležene su značajne razlike između materijala. *Post hoc Mann-Whitney* test pokazuje da se amalgam značajno razlikuje od preostala dva materijala (u poređenju sa MTA $M-W = 187,00$, $p = ,000$, a u poređenju sa biodentinom $M-W = 225,00$, $p = ,001$), dok nema značajnih razlika između MTA i biodentina ($M-W = 401,00$, $p = ,469$). Na osnovu medijane (Tabela 15) može se videti da amalgam ima niže vrednosti u ovoj tački merenja u odnosu na preostala dva materijala. U tačkama 2-4, kao i u tačkama 1-5 (ukupno), ne postoji statistički

značajna razlika u marginalnoj adaptaciji ispitivanih materijala $p > ,05$ (Tabela 17).

Tabela 17. Medijane i testiranje značajnosti razlike marginalne adaptacije između materijala u ispitivanim tačkama

	MTA	Biodentin	Amalgam	K-W test (2)	p
Tačka 1	7,03	7,36	17,11	7,2	,027
Tačke 2-4	6,71	5,08	4,03	3,09	,213
Tačka 5	3,94	3,75	0,00	18,29	,000
Tačke 1-5 (ukupno)	7,00	5,78	7,85	1,50	,472

K-W= Kruskal-Wallis test za $df= 2$.

Tabela 18. Post hoc test razlika marginalne adaptacije između ispitivanih materijala

	Materijal	M-W test	p
mera 1	amalgam-MTA	285.00	.015
	amalgam-biodentin	301.50	.028
	MTA-biodentin	439.00	.871
mera 5	amalgam-MTA	187.00	.000
	amalgam-biodentin	225.00	.001
	MTA-biodentin	401.00	.469

5. DISKUSIJA

5.1.DISKUSIJA METODOLOGIJE

5.1.1. Dikusija izbora materijala uključenih u ispitivanje

Sa razvojem stomatološke industrije, došlo je i do sintetisanja velikog broja novih materijala za retrogradno zatvaranje kanala korena zuba. U okviru našeg istrživanja ispitivana tri materijala za retrogradnu opturaciju, amalgam, MTA i trikalcijum-silikatni cement.

Amalgam, kao materijal koji je u upotrebi dugi niz godina bio je predmet velikog broja istraživanja. Mnoge studije su istraživale njegovu citotoksičnost, zbog potencijalno toksičnih elemenata koji ulaze u sastav legure. [24,29-31] Međutim, nijedno relevantno istraživanje nije dokazalo citotoksičnost amalgama. Lošija biokompatibilnost, sklonost ka koroziji, loše zaptivanje zbog odsustva hemijske veze sa tvrdim zubnim tkivima, prebojavanje okolnog mekog tkiva su samo neke od loših osobina amalgama. I pored svih nedostataka, amalgam ima puno dobrih osobina. Sklonost ka koroziji je u isto vreme i prednost i nedostatak ovog materijala. Nagomilavanje produkata korozije tokom vremena poboljšava marginalnu adaptaciju i doprinosi boljoj vezi za dentin korena zuba. Zbog svega ovoga, amalgam je materijal koji se najduže i najviše koristi u našoj zemlji kao material za retrogradno zatvaranje kanala korena i upravo zato predstavlja standard sa kojim smo poredili preostala dva, novija materijala.

MTA je prvobitno dizajniran za retrogradno zatvaranje kanala korena zuba, kao materijal koji bi zamenio amalgam. Patentirao ga je *Torabinejad* 1993.Godine. Do danas, MTA je materijal koji je ispitivan u veoma velikom broju studija. [29, 31-35] Pokazano je da je MTA ima dobru biokompatibilnost, da indukuje osteo i odontogenezu, dobro zaptiva usled prisustva hidrofilnih čestica praha u njegovom sastavu koje apsorbuju vodu tokom hidratacije i dolazi do bubrenja materijala. MTA ima i nedostatke, od kojih se najčešće navode veoma sporo vreme vezivanja i teško rukovanje materijalom. I pored loših osobina, od svih materijala koji se koriste za retrogradno zatvaranje, čini se da se MTA najčešće preporučuje kao materijal izbora, i zbog toga je predmet našeg istraživanja.

Biodentin pripada grupi cemenata na bazi kalcijuma, baš kao i MTA. Studije pokazuju da je to biokompatibilan i bioaktivan materijal, sa kraćim vremenom vezivanja i većom čvrstoćom u odnosu na cimente iste grupe. [36] S obzirom na to da je ovaj materijal najkraće vreme u upotrebi, želeli smo da ispitamo njegove osobine i da ga uporedimo sa preostala dva materijala.

5.1.2. Diskusija metodologije ispitivanja biokompatibilnosti

Stomatološki materijali koji se koriste za retrogradno zatvaranje kanala korena bi trebalo da imaju dobru marginalnu adaptaciju, da budu biokompatibilni i netoksični, bez uticaja na ćelijsku morfologiju. [67,68] Iako savremeni materijali za retrogradnu opturaciju imaju većinu od ovih osobina, nijedan od od sintetisanih materijala nije idealan.

Ispitivanje biokompatibilnosti materijala za retrogradno zatvaranje bilo je predmet mnogih istraživanja. Amalgam, glas jonomer cementi, super EBA, diaket, MTA i biodentin su samo neki od materijala na kojima su vršena ispitivanja. U okviru našeg istraživanja ispitivana tri materijala za retrogradnu opturaciju, od kojih je amalgam u upotrebi dugi niz godina i veoma često se koristi za poređenje sa drugim materijalima. Preostala dva materijala, MTA i biodentin, su novijeg datuma. Biodentin kao “najmladji” od sva tri materijala posebno je zanimljiv jer još uvek ne postoji veliki broj radova koji objedinjuju ispitivanje njegove biokompatibilnost i marginalne adaptacije, kao dva najbitnija svojstva materijala za retrogradno zatvaranje kanala.

Ispitivanje citotoksičnosti materijala se mora vršiti po strogo definisanim standardima (ISO10993-5). Metode koje se najčešće koriste su testovi citotoksičnosti na kulturama ćelija ili tkiva (*in vitro*), kao i implantacija ispitivanih materijala u potkožno vezivno tkivo ili kosti eksperimentalnih životinja (*in vivo*). [44] Ispitivanja na kulturama ćelija su polazna tačka za procenu biološkog odgovora na novosintetisane materijale. Ovaj vid ispitivanja ima niz prednosti, među kojima su velika osetljivost kultura ćelija na toksične agense, mogućnost ispitivanja specifičnih interakcija na ćelijskom ili molekularnom nivou, kao i mogućnost ponavljanja eksperimenata pod istim uslovima. Glavni nedostatak *in vitro* ispitivanja je nemogućnost potpunog oponašanja uslova *in vivo*.

In vitro ispitivanje u stvari predstavlja pojednostavljeni deo kompleksnih *in vivo* mehanizama. [69] Kulture ćelija koje se najčešće koriste su humani i mišiji fibroblasti, ćelijske

kulture periodontalnog ligamenta, ćelije humanog osteosarkoma, ćelije zubne pulpe i druge. *Kawahara* i sar. su koristili ćelijske kulture za ispitivanje citotoksičnosti stomatoloških materijala još pedesetih godina prošlog veka. Koristeći metode viseće kapi i monoslojeva na ćelijskoj liniji mišijih fibroblasta L929, ovi istraživači su ispitivali citotoksičnost stomatoloških materijala. [70] *Jeirskar i Helgelandsu* 1972. godine uradili prvu studiju rasta humanih epitelnih ćelija i mišijih fibroblasta L929 oko diskova stomatoloških amalgama, smola, silikatnih cemenata i legura zlata. [54,71]

U ovoj studiji, biokompatibilnost tri različita materijala je ispitivana *in vitro*, na permanentnim ćelijskim linijama humanih fibroblasta MRC 5 i fibroblasta miševa L929.

Ove ćelijske linije su odabrane pre svega zbog njihove pouzdanosti, brzog i lakog kultivisanja i umnožavanja.

Za ispitivanje citotoksičnosti postoji veliki broj testova. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti zavise pre svega od izbora kulture ćelija i testova. Veći broj testova i ćelijskih linija su definitivno korisni za preciznije ispitivanje citotoksičnosti materijala. Upravo zbog toga, u ovoj doktorskoj disertaciji su rađena tri testa za ispitivanje citotoksičnosti- MTT, DET i Agar difuzioni test.

Kolorimetrijski metil-tiazol-tetrazolijum (MTT) test se često koristi kao standardni test za procenu citotoksičnosti novih biomaterijala, kao i za testiranje dentalnih materijala u kulturama ćelija. [25] Ovaj test se zasniva na sposobnosti živih ćelija da redukuju 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazol bromid (MTT), tetrazolijumovu so, rastvorljivu u vodi, žute boje u nerastvorljivi ljubičasti formazan. Ova reakcija se može dogoditi samo u metabolički aktivnim ćelijama, a količina stvorenog formazana je u korelaciji sa brojem živih i metabolički aktivnih ćelija. [72] MTT meri citotoksičnost ispitivanih materijala nakon 24h, 48h i 72h. *Fotakis* i sar. u svom istraživanju navode da je MTT test najpouzdaniji u otkrivanju rane citotoksičnosti u poređenju sa ostalim testovima. Prednosti MTT postupka su jednostavnost, tačnost, pouzdanost i brzina. [60]

Pored MTT testa, često se u istraživanjima primenjuju i DET i agar difuzioni test, kao i *neutral red* test, LDH test i drugi.

Test odbacivanja boje (DET test) je jednostavan i brz test koji se koristi za određivanje broja vijabilnih ćelija. Zasniva se na tome da vijabilne ćelije imaju intaktnu ćelijsku membranu i da je određenim bojama, u ovom slučaju tripan plavoj, onemogućen prodor unutar ćelije.

Vijabilne ćelije zadržavaju žućkastu boju, dok se mrtve ćelije boje u ljubičastu. [73] Potencijalni nedostaci ove metode su subjektivnost, kao i procenjivanje vijabilnosti ćelija isključivo na osnovu intaktnosti ćelijske membrane. *Black i Berenbaum* su još 1964. godine u

svom istraživanju zaključili da četiri faktora mogu uticati na rezultate DET testa i to koncentracija ćelija u rastvoru, koncentracija boje, vreme bojenja i koncentracija seruma. [58]

5.1.3. Diskusija metodologije ispitivanja marginalne adaptacije

Adekvatna marginalna adaptacija, tj. rubno zaptivanje je veoma bitna odlika materijala koji se koriste za retrogradno zatvaranje kanala korena zuba. *Johnson* je 1999. godine definisao tri najvažnije osobine materijala za retrogradno zatvaranje. To su biokompatibilnost, rubno zaptivanje i lakoća rukovanja samim materijalom. Kao četvrtu, veoma bitnu osobinu, naveo je dugoročan uspeh terapije. [50] Nijedan materijal koji je trenutno na tržištu ne poseduje osobine idealnog materijala.

Kvalitet marginalne adaptacije materijala je procenjivan studijama prodora boje (kao npr. eozin i metilensko plavo), bakterijskog curenja, tehnikom filtracije tečnosti i radioizotopa. Ove tehnike se zasnivaju na pretpostavci da je dubina prodora boje (tečnosti, bakterija ili radioizotopa) u korelaciji sa veličinom pukotine između materijala za retrogradno zatvaranje i dentina. [16,63,66] Kvalitet marginalne adaptacije se takođe procenjuje uz pomoć konfokalnog i skening elektronskog mikroskopa (SEM). [30,64,65,74] U našem istraživanju kvalitet marginalne adaptacije ispitivanih materijala je procenjivana uz pomoć SEM-a. Kvalitet marginalne adaptacije je u najvećem broju studija ispitivan na zubima iste morfološke grupe i to najčešće na jednokorenim zubima obe vilice [18,30,65,75] ili na jednokorenim zubima samo gornje vilice, što je slučaj i u našem istraživanju. [64,74] Istraživanje je sprovedeno na 90 ekstrahovanih jednokorenih zuba interkaninog sektora gornje vilice sa završenim rastom korena, intaktnom pulpom, bez frakture i resorpcije korena. Zubi interkaninog sektora gornje vilice su izabrani zbog širokih i pravih kanala i zbog manjeg broja varijacija u pogledu broja kanala i korenova u odnosu na zube donje vilice.

Ultrazvučni nastavci se sve više koriste za retrogradnu preparaciju kaviteta zbog niza prednosti, uključujući manje dimenzije instrumenata, potrebu za manjim uklanjanjem kosti i lakši pristup korenu zuba. Zbog njihovog dizajna, moguće je pratiti uzdužnu osu zuba, a nakon preparacije broj izloženih dentinskih kanalića je smanjen, a samim tim i mogućnost reinfekcije. I pored velikog broja prednosti, određena istraživanja ukazuju da preparacija ultrazvučnim nastavcima može dovesti do pukotina i odlamanja tkiva zuba. Navodi se da usled velike snage, produženog vremena rada, korišćenja nastavaka više puta ili vrste

nastavaka postoji rizik od nastanka mikropukotina. [76-79] *De Bruyne* i *De Moorsu* ispitivali uticaj intenziteta ultrazvučne preparacije na površinu reseciranih korenova i utvrdili da je smanjenje intenziteta ultrazvučne preparacije rezultovalo većim pukotinama i odlamanjima tvdog zubnog tkiva. [80] *Liu* i sar.su zaključili da je kvalitet preparacije mnogo bolji kad se koriste novi nastavci u poređenju sa nastavcima koji se koriste deset i više puta. [12]

Takođe, u mnogobrojnim studijama ispitivana je razlika između ultrazvučne i preparacije retrogradnog kaviteta svrdlima. [16,81,82] Površina dentina nakon retrogradne preparacije ultrazvučnim nastavcima je nepravilnija od površine dentina nakon preparacije karbidnim svrdlima. Upravo ovo neki autori navode kao prednost ultrazvučne preparacije jer nepravilnija površina obezbeđuje bolji kontakt materijala i dentina, poboljšava retenciju i stabilnost materijala za retrogradnu opturaciju. [16,83]

Marginalna adaptacija materijala za retrogradno zatvaranje može biti posmatrana na osnovu transverzalnih i longitudinalnih preseka korena. U ovom istraživanju su korišćeni longitudinalni preseki korena zuba jer su jednostavniji za izvođenje, zbog dužine ispitivanog polja, to jest retrogradnog kaviteta koji iznosi 3mm. Transverzalno preseki na prvom, drugom i trećem milimetru su mogući samo uz upotrebu mikrotoma za tvrda tkiva, ali ne i uz pomoć dijamantske šajbne. Mikrotom za tvrda tkiva je svakako superiorniji način sečenja jer formira glatke i pravilne linije, u poređenju sa dijamantskim šajbnama. [84]

U velikom broju studija, za ispitivanje marginalne adaptacije je korišćena SEM. [30,63-65,74,85,86] Pored velikog broja prednosti ove metode, postupak pripreme zuba za SEM podrazumeva fiksaciju i dehidraciju preparata, usled čega može doći do oštećenja preparata, što je i najveći nedostatak ove metode. Posmatranje preparata u uslovima visokog vakuuma može dovesti do pucanja tvrdih zubnih tkiva, kao i pucanja i pomeranja materijala iz preparisanih ležišta. Upravo zbog toga, u našem istraživanju uzorci su posmatrani u uslovima niskog vakuuma (*Low vacuum SEM*).

Još jedan nedostatak SEM-a je taj što je slika koju dobijemo dvodimenzionalna, tj.pseudotrodimenzionalna. [65,87]

5.2.DISKUSIJA REZULTATA

5.2.1. Diskusija rezultata biokompatibilnosti

Biokompatibilnost predstavlja sposobnost materijala da izazove odgovarajući odgovor domaćina, kada se primenina propisani način. Idealan materijal za retrogradno zatvaranje kanala korena zuba bi trebalo da pored biokompatibilnosti bude i bioaktivan, da obezbeđuje adekvatno zaptivanje, dimenzionalnu stabilnost, antimikrobno dejstvo, kao i poseduje jednostavnost primene. [21-25] Nijedan materijal koji je trenutno na tržištu ne ispunjava sve navedene uslove.

Dentalni amalgami su materijali koji se dugi niz godina koriste kao materijali za retrogradnu opturaciju jer su laki za rukovanje, radiokontrastni i ne resorbuju se tokom vremena. Kao potencijalni nedostaci amalgama navode se prisustvo žive, cinka i kalaja u njegovom sastavu što može uticati na njegovu biokompatibilnost, zatim inicijalna propustljivost, kao i osetljivost na vlagu. [30] Prisustvo cinka u sastavu se smatra glavnim uzrokom citotoksičnosti amalgama, a studija *Kimure* je pokazala da su amalgami bez cinka manje citotoksični od amalgama koji sadrže cink. [88] *Kaga* i sar. su pokazali da amalgam, uprkos potencijalnom toksičnom dejstvu žive iz njegovog sastava, ima mali stepen citotoksičnosti i da imaju veoma mali uticaj na ćelijski rast i morfologiju, što je u skladu sa rezultatima ove studije. [89] *Badr* i sar. su ispitivanje citotoksičnosti amalgama, MTA i koštanog cementa polimetilmetakrilata (PMMA) vršili uz pomoć DET testa. Istraživanje je pokazalo da postoji statistički značajna razlika u broju vijabilnih ćelija između amalgama i preostala dva ispitivana materijala u smislu značajno manje biokompatibilnosti amalgama. [30]

U našem istraživanju rezultati DET testa ukazuju da amalgam pokazuje najveći indeks citotoksičnosti na obe ćelijske kulture i to na ćelijskoj liniji MRC5 8,99%, a na L929 11,10%. Međutim, nije utvrđena statistički značajna razlika u citotoksičnosti između amalgama i preostala dva ispitivana materijala u obe ćelijske kulture.

Novija istraživanja pokazuju da je MTA veoma dobar materijal za retrogradnu opturaciju, zatvaranje perforacija, kao i u terapiji zuba sa nezavršenim rastom korena. [67] U fiziološkim uslovima, MTA se vezuje progresivno, tokom nekoliko sati. Vezani materijal ima mali procenat citotoksičnosti i dobru biokompatibilnost, bez uticaja na ćelijsku morfologiju, a neka istraživanja pokazuju da MTA indukuje povoljan odgovor okolnog tkiva. [90-96] Ovo je u korelaciji sa rezultatima naše studije gde je MTA pokazao nizak indeks citotoksičnosti

(ispod 20%) u obe ćelijske kulture. MTA ima visoku inicijalnu pH vrednost, koja iznosi 10,2 i raste tokom vremena, tako da 3h nakon mešanja njegova pH vrednost iznosi 12,5.[83] Visoka pH vrednost i njen rast tokom vremena, smatraju se razlogom nastanka incijalne inflamatorne reakcije na ovaj materijal. [97] Time se možda može objasniti nešto viša citotoksičnost MTA u odnosu na ostale materijale nakon 24h ispitivanja citotoksičnosti. Nakon 24h, MTT test pokazuje da u ćelijskoj liniji MRC 5 najveći procenat citotoksičnosti ima MTA sa 12,81%, dok je u ćelijskoj kulturi L929 MTA imao procenat citotoksičnosti 15.30%, što je ujedno i najveća citotoksičnost koju je MTA imao u ovom istraživanju. Tokom vremena, dolazi do smanjenja indeksa citotoksičnosti ovog materijala ali MTA i dalje ostaje materijal koji ima najviše vrednosti indeksa citotoksičnosti u obe ćelijske linije.

S obzirom na to da je od sva tri ispitivana materijala Biodentin najkraće vreme u upotrebi, veoma je bitno ispitati njegove dobre i loše osobine. *Zhou* i sar. su u svojom ispitivanju pokazali da Biodentin i MTA imaju sličan efekat na ćelije, tj. da oba materijala pokazuju mali indeks citotoksičnosti, što odgovara i rezultatima naše studije. [25] *Garcia* i sar. su za ispitivanje citotoksičnosti biodentina i MTA koristili MTS test, koji je veoma sličan MTT testu koji je korišćen u ovom istraživanju. Oni su takođe pokazali da biodentin i MTA imaju sličan efekat na ćelije nakon 24h, dok je nakon 48h MTA izazvao veću proliferaciju ćelija u odnosu na biodentin. Kod biodentina je došlo do smanjenja proliferacije ćelija nakon 48h. [98] U našem istraživanju, nakon 48h i 72h, došlo je do smanjenja indeksa citotoksičnosti Biodentina na obe ćelijske linije, tako da ovaj materijal nakon 72h ima najmanji indeks citotoksičnosti u ćelijskoj liniji MRC 5 -3,95%.

Agar difuzioni test je dobar za početno ispitivanje biokompatibilnosti materijala. Rezultati ovog testa pokazuju da je ćelijski odgovor isti za sve ispitivane materijale, što govori u prilog biokompatibilnosti sva tri ispitivana materijala.

Rezultati MTT testa pokazuju da tokom vremena dolazi do smanjenja citotoksičnosti svih ispitivanih materijala, što ukazuje na oporavak ćelijskog metabolizma. Rezultati DET testa, kao i agar difuzionog testa su u skladu sa rezultatima MTT testa i pokazuju da su sva tri ispitivana materijala biokompatibilna.

5.2.2. Diskusija rezultata marginalne adaptacije

Marginalna adaptacija tri materijala za retrogradno zatvaranje kanala korena je ispitivana uz pomoć SEM-a. Veličina pukotine zavisi od ispitivanog materijala, njegove veze sa zubom ali i od načina sečenja zuba, kao i od pripreme zuba za SEM. U našem istraživanju marginalna adaptacija je ispitivana u uslovima niskog vakuuma, bez dehidracije preparata. Rezultati ukazuju da je na svih 90 preparata postojala marginalna pukotina u rasponu od 0 do 75,25 μ m. Još 1975.godine *Moodnik* i sar. su ispitivali marginalnu adaptaciju amalgama pomoću SEM-a i našli pukotine koje su se kretale između 6 i 150 μ m.[99] *Torabinejad* i sar. su u svom istraživanju 1995. merili marginalnu adaptaciju amalgama, MTA, super EBA i *Intermediate restorative material* (IRM) na longitudinalnim presecima preparata, u 4 tačke. Ovo istraživanje je pokazalo da MTA ima najbolju marginalnu adaptaciju, sa prosečnom širinom pukotine od $2.68 \pm 1.35\mu$ m i da je razlika u marginalnoj adaptaciji između MTA i ostalih ispitivanih materijala statistički značajna. Amalgam je pokazao bolje zaptivanje od IRM, a lošije od MTA. [86]

Metodologija ovog istraživanja je donekle ispraćena i u našoj disertaciji, s tim što nije vršena dehidracija uzoraka u etanolu da ne bi došlo do pucanja preparata, niti su merenja vršena u 4 tačke, u gornjoj i donjoj ivici preparata sa obe strane. U našem istraživanju merenja su vršena u 10 tačaka, tj.u 5 tačaka duž preparata, sa obe strane. Rezultati našeg ispitivanja su u skladu sa ispitivanjem koje su sproveli *Torabinejadi* sar.jer je MTA pokazao najbolje zaptivanje, sa prosečnom dužinom pukotine od 8,17 μ m.Ipak, srednja vrednost merenih pukotina je u našem istraživanju nešto viša nego u studijama slične metodologije. [30,74,86] Ovo se može objasniti metodom sečenja, bez fiksiranja preparata u blokove epoksi smole. Vibracije i sile tokom sečenja su mogle uticati na veličinu pukotine, što je i *Bidar* u svom istraživanju zaključio.[65]

Poređenjem vrednosti marginalne adaptacije u različitim tačkama merenja dobili smo da postoje značajne razlike između materijala u prvoj i petoj tački merenja. *Mann-Whitney* test je pokazao da je marginalna adaptacija amalgama značajno lošija u odnosu na preostala dva materijala u tački 1, dok se vrednosti za MTA i biodentin međusobno značajno ne razlikuju. To se može objasniti hidrofilnim česticama koje MTA prah sadrži i koje apsorbuju vodu tokom hidratacije, što znači da se materijal tokom vezivanja širi i obezbeđuje dobro zaptivanje za zidove retrogradnog kaviteta.[30,74] Sa druge strane, loša marginalna adaptacija amalgama se može objasniti površinskom kontrakcijom tokom procesa vezivanja materijala. [30] Postavlja se pitanje kakvi bi bili rezultati ove studije da su materijali duži

vremenski period držani u vlažnoj sredini, jer se zna da amalgam tokom vremena bolje zaptiva zbog nagomilavanja proizvoda korozije. *Ravichandra* i sar. su u svom istraživanju ispitivali marginalnu adaptaciju bidentina, MTA i glas jonomer cementa uz pomoć konfokalne laserske skening mikroskopije (*confocal laser scanning microscopy* –CLSM) i pokazali da je bidentin imao najbolje zaptivanje za zidove retrogradnog kaviteta. [39]

Kao još jedna referentna tačka u našem istraživanju, uzeta je tačka 5, tj. donja ivica preparata uz gutaperku. U odnosu na vrednosti u ovoj tački merenja zabeležene su značajne razlike između materijala i to tako da amalgam ima niže vrednosti pukotine u odnosu na preostala dva materijala. Ovo se možda može objasniti konzistencijom sveže zamešanih MTA i bidentina, jer ih je teže aplikovati i potisnuti do dna kaviteta u poređenju sa amalgamom.

Uprkos svojim ograničenjima, SEM predstavlja dobru metodu ispitivanja marginalne adaptacije stomatoloških materijala. Svakako, replika tehnika sa epoksi smolom predstavlja precizniju metodu određivanja pukotina u poredjenju sa longitudinalnim sečenjem koje je primenjeno u ovoj studiji. [30,86] Stvaranje artefakta usled sečenja se na ovaj način može svesti na minimum. Međutim i replika tehnika i transverzalno sečenje preparata imaju svoje mane, a to je pre svega posmatranje retrogradnog punjenja u samo jednoj ravni, bez uvida u zaptivanje materijala za zub celom dužinom retrogradnog kaviteta.

Iako su *in vitro* testovi mnogo doprineli u ispitivanju osobina materijala za retrogradno zatvaranje kaviteta, dodatna *in vivo* istraživanja su svakako potrebna da bi se ispitala biokompatibilnost i marginalna adaptacija, kao i kliničke performanse ova tri materijala.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ispitivanja biokompatibilnosti i marginalne adaptacije tri materijala za retrogradno zatvaranje kanala korena zuba mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Rezultati biokompatibilnosti ukazuju na visok stepen ćelijske kompatibilnosti svih ispitivanih materijala.
- Rezultati DET testa pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u citotoksičnosti između istovetnih ispitivanih materijala u obe ćelijske linije, niti između sva tri ispitivana materijala u obe ćelijske kulture
- Rezultati MTT testa pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u citotoksičnosti između ispitivanih materijala.
- MTT test pokazuje da u obe ćelijske kulture, kod istovetnih ispitivanih materijala postoji statistički značajna razlika između indeksa citotoksičnosti izmerenog nakon 24h i nakon 72h.
- Rezultati agar difuzionog testa su u skladu sa rezultatima DET i MTT testa i ukazuju na biokompatibilnost sva tri ispitivana materijala.
- Najbolju marginalnu adaptaciju izraženu kroz srednju vrednost izmerene ivične pukotine je imao MTA (8,17 μ m), a najlošiju amalgam (srednja vrednost ivične pukotine - 9,13 μ m).
- U tački 1 postoje statistički značajne razlike u marginalnoj adaptaciji između tri materijala. Najlošije rezultate pokazuje amalgam koji ima značajno više vrednosti dužine pukotine marginalne adaptacije u odnosu na preostala dva materijala tj. MTA i biodentin koji se međusobno značajno ne razlikuju.
- U tački 5 postoje statistički značajne razlike u marginalnoj adaptaciji između tri materijala. Rezultati pokazuju da amalgam ima značajno niže vrednosti dužine pukotine i samim tim pokazuje bolje rezultate u odnosu na preostala dva materijala koja se međusobno značajno ne razlikuju.
- U tačkama 2-4, kao i u tačkama 1-5 (ukupno), ne postoji statistički značajna razlika u marginalnoj adaptaciji ispitivanih materijala.

7. LITERATURA

1. Todorović Lj, Petrovic V, Jurišić M, Kafedžiska-Vračar V. Oralna hirurgija. 3. izd. Beograd: Nauka; 2007. str 145-58.
2. Perović J, Jojić B. Oralna hirurgija. Beograd: Univerzitetska štampa;2000.
3. Tronstad L. Klinička endodonticija: priručnik, prevod drugog dopunjenog izdanja. Beograd: Danubius dental;2005.
4. Ramachandran Nair P, Pajarola G, Schroeder H. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;81(1):93-102.
5. Petrović V, Čolić S. Periapikalne lezije. Beograd: Velarta; 2001.
6. Tsesis I, Faivishevsky V, Kfir A, Rosen E (2009) Outcome of surgical endodontic treatment performed by a modern technique: a meta-analysis of literature. *J Endod* 35, 1505-11.
7. Song M, Kim HC, Lee W, Kim E. Analysis of the cause of failure in nonsurgical endodontic treatment by microscopic inspection during endodontic microsurgery. *J Endod.* 2011;37:1516–9
8. Shahi S, Yavari H, Rahimi S, Eskandarinezhad M, Shakouei S, Unchi M. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate (MTA) and Portland cement as root-end filling materials: A scanning electron microscopy (SEM) study. *Afr J Biotechnol.*2011;10(71):16084-8.
9. Abella, F., de Ribot, J., Doria, G., Duran-Sindreu, F. and Roig, M. (2014). Applications of Piezoelectric Surgery in Endodontic Surgery: A Literature Review. *J Endod*, 40(3), 325-32.
10. Baranwal A, Paul M, Mazumdar D, Adhikari H, Vyavahare N, Jhajharia K. An ex-vivo comparative study of root-end marginal adaptation using grey mineral trioxide aggregate, white mineral trioxide aggregate, and Portland cement under scanning electron microscopy. *J Conserv Dent.*2015;18(5):399-404.
11. Song M, Chung W, Lee SJ, Kim E. Long-term outcome of the cases classified as successes based on short-term follow-up in endodontic microsurgery. *J Endod*2012;38:1192–6.
12. Liu, Z., Zhang, D., Li, Q. and Xu, Q. (2013). Evaluation of Root-end Preparation with a

- New Ultrasonic Tip. *J of Endod*, 39(6), 820-3.
13. Bernardes, R., Húngaro Duarte, M., Vivan, R., Baldi, J., Vasconcelos, B. and Bramante, C. (2015). Scanning electronic microscopy analysis of the apical surface after of root-end resection with different methods. *Scanning*, 37(2), 126-30.
 14. Kim S, Kratchman S. Modern endodontic surgery concepts and practice: a review. *J Endod* 2006;32:601–23.
 15. De Deus QD. Frequency, location, and direction of the lateral, secondary, and accessory canals. *J Endod* 1975;1:361–6.
 16. Rosales-Leal, J., Olmedo-Gaya, V., Vallecillo-Capilla, M. and Luna-del-Castillo, J. Influence of cavity preparation technique (rotary vs. ultrasonic) on microleakage and marginal fit of six end-root filling materials. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 185-9.
 17. Ishikawa H, Sawada N, Kobayashi C, et al. Evaluation of root end cavity preparation using ultrasonic retreaters. *Int Endod J* 2003;36:586–90.
 18. Shahi S, Yavari H, Rahimi S, Eskandarinezhad M, Shakouei S, Unchi M. Comparison of the sealing ability of mineral trioxide aggregate and Portland cement used as root-end filling materials. *J Oral Sci*. 2011;53(4):517-22.
 19. Orosco F, Bramante C, Garcia R, Bernardineli N, Moraes I. Sealing ability, marginal adaptation and their correlation using three root-end filling materials as apical plugs. *J Appl Oral Sci*. 2010;18(2):127-34.
 20. Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci*. 1998;106(2p2):696-706.
 21. Saxena P, Gupta S, Newaskar V. Biocompatibility of root-end filling materials: recent update. *Restor Dent Endod* 2013;38(3):119-27.
 22. Lee B, Son H, Noh H, Koh J, Chang H, Hwang I et al. Cytotoxicity of Newly Developed Ortho MTA Root-end Filling Materials. *J Endod*. 2012;38(12):1627-30.
 23. Kulan P, Karabiyik O, Kose GT, Kargul B. Biocompatibility of Accelerated Mineral Trioxide Aggregate on Stem Cells Derived from Human Dental Pulp. *J Endod*. 2015;42(2):276-9.
 24. Molin C. Amalgam- Fact and fiction. *Eur J Oral Sci*. 1992;100(1):66-73.
 25. Zhou HM, Shen Y, Wang ZI, Li L, Zheng YF, Hakkinen L, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod*. 2013;39(4), 478-83.
 26. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. *Biocompatibility of dental materials*. Berlin: Springer; 2009. p. 1-3.

27. Jerolimov V. Osnove stomatoloških materijala [Internet]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet; 2005[cited2018 Jan 20]. Available from: <http://bib.sfzg.hr/>
28. Anusavice K. Phillips' science of dental materials. 12th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2013
29. Chong B, Rhodes J. Endodontic surgery. *BDJ Open*. 2014;216(6):281-90.
30. Badr A. Marginal Adaptation and Cytotoxicity of Bone Cement Compared with Amalgam and Mineral Trioxide Aggregate as Root-end Filling Materials. *J Endod*. 2010;36(6):1056-60.
31. Baek S, Lee W, Setzer F, Kim S. Periapical Bone Regeneration after Endodontic Microsurgery with Three Different Root-end Filling Materials: Amalgam, SuperEBA, and Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*. 2010;36(8):1323-5.
32. Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent*. 2008;11(4):141-3.
33. Camilleri J. Hydratation mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2007;40:462-70.
34. Asgary S, Pairokh M, Eghbal M, Brink F. Chemical Differences Between White and Gray Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*. 2005;31(2):101-3.
35. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Pitt Ford TR. The constitution of Mineral trioxide aggregate. *Dent Mater* 2005;21:297-303.
36. 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):2-8.
37. Malkondu Ö, Kazandağ M, Kazazoğlu E. A Review on Biodentine, a Contemporary Dentine Replacement and Repair Material. *BioMed Res Int*. 2014:1-10.
38. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *Int Endod J*. 2013;46(7):632-41.
39. Ravichandra PV, Vemisetty H, Deepthi K, Reddy SJ, Ramkiran D, Krishna MJ, et al. Comparative evaluation of marginal adaptation of Biodentine(TM) and other commonly used root end filling materials – An in vitro study. *J Clin Diagn Res* 2014;8(3):243-5.
40. Camilleri J. Investigation of Biodentine as dentine replacement material. *J Dent*. 2013;41(7):600-10.
41. Bachoo IK, Seymour D, Brunton P. A biocompatible and bioactive replacement for dentine: is this a reality? The properties and uses of a novel calcium-based cement. *Br*

- Dent J. 2013; 214(2): E5.
42. Priyanka V. A Literature Review of Root-End Filling Materials. IOSR J Dent Med Sci. 2013;9(4):20-5.
 43. De Bruyne M, De Moor R. The use of glass ionomer cements in both conventional and surgical endodontics. Int Endod J. 2004;37(2):91-104.
 44. Bodrumlu E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: A review. Aust Endod J. 2008;34(1):30-5.
 45. Markovic D. Biocompatibility assessment of glass ionomer cement: Test of cytotoxicity. Stomatol glasnik Srb. 2002;49(3-4):75-80.
 46. Witherspoon D, Gutmann J. Analysis of the healing response to gutta-percha and Diaket when used as root-end filling materials in periradicular surgery. Int Endod J. 2000;33(1):37-45.
 47. Regan J, Gutmann J, Witherspoon D. Comparison of Diaket and MTA when used as root-end filling materials to support regeneration of the periradicular tissues. Int Endod J. 2002;35(10):840-7.
 48. Chittoni S, Martini T, Wagner M, Da Rosa R, Cavenago B, Duarte M et al. Back-scattered electron imaging for leakage analysis of four retrofilling materials. Microsc Res Tech. 2011;75(6):796-800.
 49. Ford T, Andreasen J, Dorn S, Kariyawasam S. Effect of super-EBA as a root end filling on healing after replantation. J Endod. 1995;21(1):13-5.
 50. Johnson B. Considerations in the selection of a root-end filling material. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999;87(4):398-404
 51. Caliscan MK, Tekin U, Kaval ME, Solmaz MC. The outcome of apical microsurgery using MTA as the root-end filling material: 2- to 6-year follow-up study. Int Endod J. 2016; 49(3):245-54.
 52. Cintra L, Ribeiro T, Gomes-Filho J, Bernaba P, Watanabe S, Facundo A et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of a new root canal sealer and root-end filling material. Dent Traumatol. 2013;29(2):145-50.
 53. Anderson JM. Biological responses to materials. Annu Rev Biomed Eng 2001;31:81-110.
 54. Wataha J. Predicting clinical biological responses to dental materials. Dent Mater. 2012;28(1):23-40.
 55. Stacey G, Doyle A, Ferro M. Cell culture methods for in vitro toxicology. Dordrecht: Springer; 2011.

56. Dammaschke T, Biodentine™ a new bioactive cement for direct pulp capping . Septodont case studies collection, March 2012 [cited 2013 Jun 28]; Available from: http://www.septodont.com.hr/pdf/biodentine_cs_1.pdf
57. Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr.Protoc. Immunol.* 2015;111:A3.B.1-A3.B.3.
58. Black L, Berenbaum M. Factors affecting the dye exclusion test for cell viability. *Exp Cell Res.* 1964;35(1):9-13.
59. Van Meerloo J, J.L. Kaspers G, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: A. Cree I, ed. by. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, Second Edition, Methods in Molecular Biology.* 2nd ed. Springer Science Business Media; 2011. p. 237-45.
60. Fotakis G, Timbrell J. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett.* 2006;160(2):171-7.
61. ISO 7405:2008, Dentistry — Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry
62. Pamies D. Advanced Good Cell Culture Practice for human primary, stem cell-derived and organoid models as well as microphysiological systems. *ALTEX.* 2018;;353-78.
63. Agrafioti A, Tzimpoulas N, Chatzitheodoridis E, Kontakiotis E. Comparative evaluation of sealing ability and microstructure of MTA and Biodentine after exposure to different environments. *Clin Oral Investig.* 2015;20(7):1535-40.
64. Al-Fouzan K, Al-Garawi Z, Al-Hezaimi K, Javed F, Al-Shalan T, Rotstein I. Effect of acid etching on marginal adaptation of mineral trioxide aggregate to apical dentin: microcomputed tomography and scanning electron microscopy analysis. *Int J Oral Sci.* 2012;4(4):202-7.
65. Bidar M, Moradi S, Jafarzadeh H, Bidad S. Comparative SEM study of the marginal adaptation of white and grey MTA and Portland cement. *Aust Endod J.* 2007;33(1):2-6.
66. Chittoni S, Martini T, Wagner M, Da Rosa R, Cavenago B, Duarte M. Back-scattered electron imaging for leakage analysis of four retrofilling materials. *Microsc Res Tech.* 2011;75(6):796-800.
67. Cintra L, Ribeiro T, Gomes-Filho J, Bernabé P, Watanabe S, Facundo A. Biocompatibility and biomineralization assessment of a new root canal sealer and root-end filling material. *Dent Traumatol.* 2012;29(2):145-50.
68. Haglund R, He J, Jarvis J, Safavi KE, Spångberg LS, Zhu Q. Effects of root-end filling

- materials on fibroblasts and macrophages in vitro. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.* 2003;95, 739.
69. Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola C, Granchi D et al. Cell culture methods for testing Biocompatibility. *Clin Mater.* 1994;15(3):173-90.
 70. Hanks C, Wataha J, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: A review. *Dent Mater.* 1996;12(3):186-93.
 71. Kawahara H, Yamagami A, Nakamura M. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int Dent J* 1968;18:443-67.
 72. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
 73. Ribeiro D, Duarte M, Matsumoto M, Marques M, Salvadori D. Biocompatibility In Vitro Tests of Mineral Trioxide Aggregate and Regular and White Portland Cements. *J Endod.* 2005;31(8):605-7.
 74. Shipper G, Grossman E, Botha A, Cleaton-Jones P. Marginal adaptation of mineral trioxide aggregate (MTA) compared with amalgam as a root-end filling material: a low-vacuum (LV) versus high-vacuum (HV) SEM study. *Int Endod J.* 2004;37(5):325-36.
 75. Weston GD, Moule AJ, Bartold PM. A scanning electron microscopic evaluation of root surfaces and the gutta-percha interface following root-end resection in vitro. *Int Endod J.* 1999; 32, 450-8.
 76. Layton CA, Marshall JG, Morgan LA, Baumgartner JC. Evaluation of cracks associated with ultrasonic root-end preparation. *J Endod.* 1996;22:157-60.
 77. Rainwater A, Jeansonne B, Sarkar N. Effects of Ultrasonic Root-End Preparation on Microcrack Formation and Leakage. *J Endod.* 2000;26(2):72-5.
 78. Aydemir S, Cimilli H, Hazar Yoruç A, Kartal N. Evaluation of two different root-end cavity preparation techniques: A scanning electron microscope study. *Eur J Dent.* 2013;7(2):186-90.
 79. Camargo Villela Berbert F, de Faria-Júnior N, Tanomaru-Filho M, Guerreiro-Tanomaru J, Bonetti-Filho I, Leonardo R. An in vitro evaluation of apicoectomies and retropreparations using different methods *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(4):57-63.
 80. De Bruyne M, De Moor R. SEM analysis of the integrity of resected root apices of cadaver and extracted teeth after ultrasonic root-end preparation at different intensities. *Int Endod Jou.* 2005;38(5):310-9.

81. Khabbaz MG, Kerezoudis NP, Aroni E, Tsatsas V. Evaluation of different methods for the root-end cavity preparation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98:237-42.
82. Wuchenich G, Meadows D, Torabinejad M. A comparison between two root end preparation techniques in human cadavers. *J Endod.* 1994;20(6):279-82.
83. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.*1995;21:349-53.
84. Gondim E, Zaia A, Gomes B, Ferraz C, Teixeira F, Souza-Filho F. Investigation of the marginal adaptation of root-end filling materials in root-end cavities prepared with ultrasonic tips. *Int End Jou.* 2003;36(7):491-9.
85. Zerbinati L, Tonietto L, de Moraes J, de Oliveira M. Assessment of Marginal Adaptation After Apicoectomy and Apical Sealing with Nd:YAG Laser. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(8):444-50.
86. Torabinejad M, Smith P, Kettering J, Pitt Ford T. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod.* 1995;21(6):295-9.
87. Premović M. Reološka svojstva endodontskih silera. Disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet; 2016.
88. Kimura JT. A comparative analysis of zinc and non-zinc alloys used in retrograde endodontic surgery. Part 1:apical seal and tissue reaction. *J Endod* 1982; 8: 359–63.
89. Kaga M, Seale NS, Hanawa T, Ferracane JL, Waite DE, Okabe T, Cytotoxicity of amalgams, alloys, and their elements and phases. *Dent. Mater.*1991;7, 68.
90. Perinpanayagam H, Cellular response to mineral trioxide aggregate root-end filling materials. *J. Can. Dent. Assoc.*2009;75, 369.
91. Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG, Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: A review of the literature. *DentMater.*2008;24, 149.
92. Torabinejad M, Hong CU, S. Lee SJ, Monsef M, Ford TRP, Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J. Endod.*1995;21, 603.
93. Torabinejad M, Hong CU, Ford TRP, Kettering JD, Cytotoxicity of four root end filling materials. *J. Endod.*1995;21,489.
94. Torabinejad M, Ford TRP. Root end filling materials: A review. *EndodDent. Traumatol.*1996;12,161.
95. Koh ET, McDonald F, Ford TRP, and Torabinejad M. Cellular response to mineral trioxide aggregate. *J. Endod.*1998;24, 543.

96. Koh ET, Torabinejad M, Ford TRP, Brady K, and McDonald F, Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997;37, 432.
97. Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 1997; 37: 432–9.
98. Escobar-García D, Aguirre-López E, Méndez-González V, Pozos-Guillén A. Cytotoxicity and Initial Biocompatibility of Endodontic Biomaterials (MTA and Biodentine™) Used as Root-End Filling Materials. *BioMed Research International*. 2016;2016:1-7.
99. Moodnik RM, Levey MH, Besen MA, Borden BG. Retrograde amalgam filling: a scanning electron microscopic study. *J Endodon* 1975;1:28-31.