

UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Vanja N. Opačić-Galić

ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI
NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA
NA BAZI AKTIVNIH KALCIJUM
SILIKATNIH SISTEMA I
HIDROKSIAPATITA

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Vanja N. Opačić-Galić

**BIOCOMPATIBILITY OF
NANOSTRUCTURAL BIOMATERIALS
BASED ON ACTIVE CALCIUM SILICATE
SYSTEMS AND HYDROXYAPATITE**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2014

Mentor:

Prof. dr Slavoljub Živković, redovni profesor, Klinika za bolesti zuba, Stomatološki fakultet Beograd, Univerzitet u Beogradu

Komentor:

Dr Vukoman Jokanović, naučni saradnik, Institut nuklearnih nauka
Vinča

Članovi komisije:

Prof. dr Mirjana Vujašković,
Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Vesna Danilović,
Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr sci Dragana Mitić-Ćulafić,
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Zahvalnost

Ova doktorska teza je sa uspehom dovedena do kraja zahvaljujući timskom radu i velikoj pomoći vrhunskih stručnjaka u svojim oblastima iz različitih naučnih institucija.

Pre svega, zahvaljujem se svom mentoru, profesoru dr Slavoljubu Živkoviću, na ukazanom poverenju, na uloženom trudu, motivaciji i najviše, prijateljskoj podršci tokom rada na disertaciji. Zbog toga sam privilegovana.

Zahvalna sam dr Vukomanu Jokanoviću koji je sintetisao novi materijal i ukazao mi čast da ga uključim u ispitivanja.

Posebno se zahvaljujem brojnim kolegama sa Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i sa Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, na pomoći u eksperimentalnom delu ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem doc. dr Jeleni Sopti i dr Relji Kovačeviću sa Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu uz čiju sam pomoć i kompetenciju uspela da prezentujem histološke rezultate.

Zahvaljujem se profesorki dr Vesni Danilović uz čiju sam pomoć i prijateljske savete prezentovala obilje histoloških podataka i informacija.

Zahvaljujem se dr Dragani Ćulafić koja me je gurala i hrabrila do završetka ovog rada. Bez njene stručnosti i kolegijalnosti ovaj rad ne bi bio ostvaren.

Od početka rada na izradi teze sam imala potpunu stručnu i prijateljsku podršku profesorke dr Mirjane Vujašković, kao i svih kolega sa Klinike za bolesti zuba, tako da je ovaj naporan posao, na kraju bio zadovoljstvo.

I na kraju, najvažnije...

Mojoj porodici, kojoj ne treba sa mnogo reči da kažem da su moja inspiracija i motiv, oslonac i stalna podrška. Moja zahvalnost je beskrajna.

Ovaj rad posvećujem Aleksu.

SAŽETAK

Usavršavanje materijala koji bi mogli da se koriste kao biološke «zamene» kosti, danas je jedna od najznačajnijih i najaktivnijih oblasti istraživanja biomaterijala. Biokompatibilnost i bioaktivnost ovih materijala obezbeđuje interakciju sa biološkim sistemima, a time i obnavljanje funkcije oštećenih tkiva i/ili organa u ljudskom organizmu.

Poslednjih godina razvijen je veliki broj materijala za endodontsku primenu, koji osim biokompatibilnosti imaju ulogu i bio-induktora u očuvanju zdravlja pulpe i periodontalnog tkiva, ali i stimulišu regeneraciju oštećenih tkiva.

Cilj ovog istraživanja je bio da se proveriti biokompatibilnost i biofunkcionalnost novih nanostrukturnih materijala na bazi kalcijum silikatnih sistema (CS) i hidroksiapatita (CS-HA).

Prvi korak u ovom istraživanju je bilo analiziranje sastava, određivanje veličine čestica, merenje vremena vezivanja i određivanje čvrstoće novosintetisanih materijala.

Strukturu kalcijum silikata čine uglavnom aglomerati veličine nekoliko mikrometara koji su izgrađeni od manjih partikula (čestica) sa dimenzijama između 117 i 477nm. Ove partikule su uglavnom sferičnog ili elipsoidnog oblika, manje ili više izdužene u jednom pravcu. Partikule HA su bile nepravilnog oblika, većinom okruglaste, sa dimenzijama od 60 nm do 470nm.

EDS analiza je pokazala da je hemijski sastav kalcijum silikata (Ca 22.21, Si 8.22, O 69.7 u atomskim%) odgovarao odnosu Ca/Si od približno 2.7 (atomske%). Vreme vezivanja za CS je započinjalo 3 minuta nakon dodavanja dejonizovane vode, a kompletno vezivanje se završava nakon 10 minuta. Za CS-HA ove vrednosti su bile 5 i 15 minuta, respektivno.

Za proveru biokompatibilnosti ovih materijala korišćeni su predklinički *in vitro* i *in vivo* testovi.

Genotoksični potencijal materijala proveren je alkalnom verzijom Komet testa na humanim limfocitima iz periferne krvi. Ovim testom nije utvrđena indukcija genotoksičnih oštećenja DNK molekula nanostrukturnim materijalima, osim u individualnim slučajevima (donor 1), na šta je uticala genetska osnova i potencijali reparacije svakog donora individualno.

Biokompatibilnost materijala proveravana je potkožnom implantacijom polietilenskih tubica ispunjenih sveže zamešanim materijalima na 40 Wistar pacova, starosti oko 3 meseca. Životinje su žrtvovane u evaluacionim periodima od 7, 15, 30 i 60 dana. Subkutanom implantacijom uočena je dobra tolerancija tkiva na nove nano-materijale. Smeša CS-HA pokazala je najbolje organizovanu fibroznu kapsulu oko materijala, bez znakova zapaljenja i narušenosti strukture vezivnog tkiva.

Treći deo istraživanja bio je provera biofunktionalnosti i bioaktivnosti novih materijala, direktnim prekrivanjem eksponirane pulpe kunića (4 kunića-*Oryctolagus cuniculus*) iz kaviteta V klase, vestibularno. U svim uzorcima uočeno je formiranje reaktivnog kalcifikovanog tkiva i na zubima maksile i mandibule posle opservacionom perioda od 15 dana. Uzorci, gde je CS korišćen kao materijal za direktno prekrivanje pulpe, pokazali su najbolje organizovano kalcifikovano tkivo, odnosno formiranje tzv. osteodentina.

Rezultati ovih istraživanja ohrabruju dalja testiranja nanostrukturnih biomaterijala i čine ih pogodnim za eventualne kliničke aplikacije i primenu u endodonciji kao vrste endodontskih cemenata.

Ključne reči: nanomaterijali, kalcijum silikatni sistemi, hidroksiapatit, biokompatibilnost, bioaktivnost.

Naučna oblast: Stomatologija

Uža naučna oblast: Kliničke stomatološke nauke

UDK broj: 615.46:616.314(043.3)

ABSTRACT

Development of new materials, that could be used as biological bone "replacement", is today one of the most important and the most active research areas of biomaterials. Bioactivity and biocompatibility of these materials provides the interaction with biological systems, and thereby enables restoring the function of damaged tissues and/or organs in the human body.

In recent years, a large number of materials for endodontic applications have been developed. Besides biocompatibility, these materials have an additional role as bio- inducers in health preservation of the periodontal and pulpal tissue, as well as stimulation of damaged tissues regeneration.

The aim of this study was to examine the biocompatibility and bioactivity of new nanostructured materials based on calcium silicate systems (CS) and hydroxyapatites (CS-HA).

The first step in this research was to analyze the composition, particle sizing, and to determine the setting time and the strength of the newly synthesized material.

The structure of calcium silicates is mainly composed of agglomerates with few micrometers in size, which are made of smaller particles with sizes between 117 and 477nm. These particles are generally spherical or ellipsoidal shape, more or less elongated in one direction. HA particles were irregular in shape, mostly rounded, with dimensions of 60 nm to 470nm.

EDS analysis showed that the chemical composition of calcium silicate (Ca 22.21 , 8.22 Si , O 69.7 in atomic %) corresponded to the Ca/Si ratio in about 2.7 (in atomic %). The setting time of the CS began 3 minutes after addition of deionized water, and the bonding was completed within 10 minutes after. For HA-CS these values were 5 and 15 minutes, respectively.

To test the biocompatibility of these materials pre-clinical *in vitro* and *in vivo* assays were used.

Genotoxic potential of the material was checked by alkaline version of the Comet assay in human peripheral blood lymphocytes. This test did not induce genotoxic damage of DNA molecules by nanostructured materials, except in individual cases (donor 1), where genetic basis and potential reparations of each donor individually were of influence.

Biocompatibility of the materials was evaluated by subcutaneous implantation of a polyethylene tubes filled with freshly mixed material in 40 Wistar rats, aged about 3 months. Animals were sacrificed at evaluation periods of 7, 15, 30 and 60 days. A good tissue tolerance to the new material was observed after subcutaneous implantation. A mixture of CS - HA showed the best organized fibrous capsule around the material, with no signs of inflammation and no structure erosion of connective tissues.

The third part of the study was to check the bio functionality and bioactivity of new materials, by pulp capping the teeth of rabbits (4 - rabbits *Oryctolagus cuniculus*) in Class V cavities, vestibular access. After the observation period of 15 days, formation of reactive calcified tissue was observed in all samples (both maxillar and mandibular teeth). Samples, in which CS was used as a material for direct pulp capping, showed the best organized calcified tissue, and the formation of the so-called osteodentine.

The results of this study encourage further testing of nanostructural biomaterials and making them suitable for potential clinical applications and applications in endodontics as a kind of endodontic cements.

Keywords: nanomaterials, calcium silicate systems, hydroxyapatite, biocompatibility, bioactivity.

Scientific field: Dentistry

Field of Academic

Expertise: Clinical Dental Science

UDK number: 615.46:616.314(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	5
2.1. Nanotehnologija	5
2.2. Nanomedicina	6
2.3. Rizici nanotehnologije	13
2.4. Nanomaterijali – biokeramički materijali	15
2.4.1. Hidroksiapatit	18
2.5. Biokompatibilnost materijala za stomatološku primenu	22
2.5.1. Čelijske linije i vrste testova (<i>in vitro</i>)	24
2.5.2. Testovi <i>in vivo</i>	31
2.5.3. Ispitivanje biokompatibilnosti mineral trioksid agregata i hidroksiapatita	33
2.6. Biomaterijali – budućnost i perspektive	38
Radna hipoteza	43
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	44
4. MATERIJAL I METODOLOGIJA	46
4.1. Sinteza i metode karakterizacije za dobijanje neorganske faze	46
4.2. Ispitivanje genotoksičnog efekta novosintetisanih kalcijum silikatnih sistema, hidroksiapatita i njihove mešavine: <i>in vitro</i> studija	49
4.2.1. Testiranje genotoksičnosti	49
4.2.1.1. <i>Ispitanici</i>	49
4.2.1.2. <i>Pripremanje ćelija</i>	50
4.2.1.3. <i>Čelijska vijabilnost</i>	50
4.2.1.4. <i>Određivanje genotoksičnog efekta nanomaterijala u humanim limfocitima</i>	51
4.2.1.5. <i>Komet test</i>	52
4.2.1.6. <i>Vizuelizacija kometa</i>	53
4.2.1.7. <i>Statistička obrada</i>	54
4.3. Ispitivanje biokompatibilnosti kalcijum silikatnih sistema i hidroksiapatita implantacijom u potkožno tkivo: <i>in vivo</i> studija	55
4.3.1. Subjekti	55
4.3.2. Testirani materijal	55
4.3.3. Test procedura	56
4.3.3.1. <i>Anestezija</i>	56
4.3.3.2. <i>Randomizacija</i>	56
4.3.3.3. <i>Hirurška procedura</i>	57

4.3.3.4. <i>Obrada tkiva za histološku analizu</i>	58
4.3.3.5. <i>Statistička analiza</i>	60
4.4. Ispitivanje biokompatibilnosti i biofunkcionalnosti novosintetisanih kalcijum silikatnih sistema i hidroksiapatita u direktnom prekrivanju eksponirane pulpe kunića: <i>in vivo</i> studija	60
4.4.1. Subjekti	60
4.4.2. Testirani materijal	61
4.4.3. Test procedura	61
4.4.3.1. <i>Anestezija</i>	61
4.4.3.2. <i>Raspodela testiranih materijala</i>	62
4.4.3.3. <i>Hirurška procedura</i>	62
4.4.4. Preparacija tkiva za patohistološku analizu	63
4.4.5. Histološko ocenjivanje	63
4.4.6. Statistička analiza	65
5. REZULTATI	66
5.1. Karakterizacija materijala	66
5.1.1. Analiza difraktometrijom rendgenskih zraka (XRD)	66
5.1.2. Skening elektronska mikroskopija (SEM) i energetska disperzivna analiza (EDS)	67
5.1.3. Vreme vezivanja i pritisna čvrstoća	69
5.2. Rezultati ispitivanja genotoksičnog potencijala nanostrukturnih biomaterijala	69
5.2.1. Ispitivanje genotoksičnog potencijala HA	70
5.2.2. Ispitivanje genotoksičnog potencijala CS	71
5.2.3. Ispitivanje genotoksičnog potencijala CS-HA	75
5.3. Rezultati ispitivanja biokompatibilnosti nanostrukturnih biomaterijala implantacijom u potkožno tkivo: <i>in vivo</i> pretklinički test na animalnom modelu	78
5.3.1. Opis i karakteristike uzorka	78
5.3.2. Rezultati histološke analize u eksperimentalnom periodu od 7 dana	78
5.3.3. Rezultati histološke analize u eksperimentalnom periodu od 15 dana	85
5.3.4. Rezultati histološke analize u eksperimentalnom periodu od 30 dana	93
5.3.5. Rezultati histološke analize u eksperimentalnom periodu od 60 dana	100

5.4. Rezultati ispitivanja bioaktivnosti nanostrukturnih biomaterijala: <i>in vivo</i> studija direktnog prekrivanja pulpe na zubima kunića	107
5.4.1. Inflamacija pulpnog tkiva ispod MTA	107
5.4.2. Inflamacija pulpnog tkiva ispod CS	110
5.4.3. Inflamacija pulpnog tkiva ispod CS-HA	113
5.4.4. Formiranje novog kalcifikovanog tkiva	115
6. DISKUSIJA	120
6.1. Diskusija biokompatibilnosti novosintetisanih nanomaterijala na bazi kalcijum silikatnih sistema i hidroksiapatita: Procenom genotoksičnosti	127
6.2. Diskusija biokompatibilnosti novosintetisanih nanomaterijala na bazi kalcijum silikatnih sistema i hidroksiapatita: Implantacijom u potkožno tkivo pacova	134
6.3. Diskusija biofunkcionalnosti novosintetisanih nanomaterijala na bazi kalcijum silikatnih sistema i hidroksiapatita: Direktnim prekrivanjem pulpe zuba kunića	139
7. ZAKLJUČAK	150
8. LITERATURA	152
9. BIOGRAFIJA	175

1. UVOD

Istraživanja dentalnih materijala vode ka razumevanju toksičnih ograničenja i biokompatibilnosti novih materijala sa dentalnim i drugim oralnim tkivima. Biološka kompatibilnost ovih materijala je veoma važna, jer citotoksični materijali prouzrokuju zapaljensku reakciju kad su u kontaktu sa okolnim tkivom, što može da utiče na ishod preduzete terapije (Camargo i sar. 2009, Nedel i sar. 2011).

Sintetski materijali koji se koriste u medicinske svrhe, zahtevaju mnogobrojna testiranja da bi se obezbedila pouzdanost primene i kvalitet materijala za svakodnevnu kliničku praksu. Dugi niz godina u naučnim krugovima akcenat se stavlja na neophodnost predkliničke evaluacije njihovih bioloških osobina sa namerom da se svi novi materijali testiraju različitim *in vitro* i *in vivo* metodama.

Veliki broj zemalja, a naročito zemlje Evropske Unije, razvile su svoje nacionalne standarde i objedinile ih u zajedničke standarde, poput ISO (International Standard Organization), čime je stvorena jedinstvena osnova za biološku evaluaciju materijala.

Jedan od osnovnih zadataka biološke evaluacije sintetskih materijala je procena njihove biokompatibilnosti.

Biokompatibilnost je svojstvo materijala da aplikovan na odgovarajući način izazove odgovarajuću, prikladnu reakciju organizma, bez znakova toksičnosti, iritacije, zapaljenja ili alergije (Willians 1987).

Činjenica da na tržištu ne postoji idealni endodontski materijal, sa idealnim karakteristikama biokompatibilnosti, ohrabruje razvoj velikog broja novih materijala, sa ciljem da se kreira cement sa blagom i kratkotrajnom zapaljenskom reakcijom okolnog tkiva (Scarparo i sar. 2010).

Danas se veliki akcenat stavlja na **biomaterijale** koji se mogu opisati kao materijali koji su dizajnirani tako da, nakon implantacije u ljudski organizam,

zamene delove živog sistema ili ispune odgovarajuću biološku funkciju u bliskom kontaktu sa živim tkivom (Connor i sar. 2007). To su materijali koji se koriste u medicinske svrhe, sa ciljem da razviju aktivnu interakciju sa biološkim sistemom (Chen i sar. 2007).

Prvi korak u testiranju biokompatibilnosti su laboratorijski citotoksični i genotoksični testovi (*in vitro*). Procena *in vitro* može da da brže podatke o biološkim inercijama, a testovi nisu skupi. Međutim uvek se postavlja pitanje da li *in vitro* testovi zaista valorizuju pojave koje će nastati u mnogo složenijoj *in vivo* sredini. *In vitro* testovi u najmanjoj meri prethode testovima na životinjama. Ukoliko se materijal ne pokaže kao izrazito toksičan, prelazi se na drugi nivo ispitivanja, na *in vivo* testove na animalnim modelima (implantacija u subkutano, mišićno, koštano ili druga tkiva), odnosno na testove na ciljanim tkivima životinja ili na kliničke testove na ljudima (Modareszadeh i sar. 2011).

Primena jedinstvene metodologije istraživanja i dobijanje komparabilnih rezultata od velikog je značaja za kliničku praksu. Standardi koji su preporučeni za ispitivanje biokompatibilnosti materijala su objedinjeni u ISO 10993 («Biološka evaluacija sredstava za medicinsku upotrebu»).

Potencijalni negativni učinak koji mogu izazvati biomaterijali sličan je učinku koji mogu izazvati lekovi ili hemikalije: iritacija tkiva, senzibilizacija organizma, toksični efekat na organe ili tkiva, genotoksični efekat, mutageni efekat, karcinogeni efekat ili uticaj na reproduktivne sposobnosti primaoca (Marković 2009).

Važno je znati da, generalno, biokompatibilnost svakog materijala zavisi od tkiva i tipa ćelija, odnosno mesta na kom će delovati (Scelza i sar. 2012).

Inicijalni korak za izradu ove studije bio je inovativni i po prvi put primenjeni način sinteze biokeramičkih materijala (sa česticama merljivim na nano-skali) od strane dr V. Jokanovića (Institut za nuklearna istraživanja Vinča, Srbija). Još je Schmalz (1994) istakao da materijali primenjeni u stomatologiji deluju ne samo farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim putem, već njihova efikasnost zavisi i od njihovih fizičko-mehaničkih svojstava.

Materijali, čija će se biokompatibilnost i bioaktivnost, ispitivati u ovoj studiji su na bazi kalcijum silikatnih sistema (β -C₂S i C₃S) i hidroksiapatita (HA).

Poznata je činjenica da bioaktivni materijali izazivaju specifičan biološki odgovor na dodirnoj površini tkivo/materijal. Kad se bioaktivni materijal implantira u telo, on ostvaruje interakciju sa okolnom kosti ili drugim tkivima. Reakcija jonske izmene između bioaktivnog implanta i okolnih tkivnih fluida dovodi do formiranja biološki aktivnog karbonatnog HA sloja na implantu, koji je hemijski i kristalografski sličan mineralnoj komponenti kostiju (Liu i sar. 2008).

Slično drugim bioaktivnim materijalima, bioaktivna keramika ostvaruje direktnu vezu sa živim tkivom. Tipičan primer konvencionalne bioaktivne keramike su sintetski HA, koji su izrazito biokompatibilni, ali sa lošim mehaničkim svojstvima, jer su kruti i slabo otporni na mehaničke stresove. Mehaničke osobine sintetskog HA uglavnom zavise od načina njegove sinteze (visina temperature, pritisak, pH, kao i načina sinterovanja) (Petrović 2012). Čelijski nosači na bazi poroznog kalcijum hidroksiapatita, već se nalaze u širokoj upotrebi u kliničkoj praksi (u stomatologiji i ortopediji), jer su biokompatibilni i osteokonduktivni materijali (Petrović 2012).

U poslednjih 20 godina, se intenzivno istražuje i ispituje nova bioaktivna keramika na bazi CaO-SiO₂, koja se koristi kao prevlaka/film preko HA.

Dikalcijum silikatnu keramiku karakteriše dobra zatezna čvrstoća (97.1 MPa) i tvrdoća po Vickers-u (4.34 GPa). Bioaktivnost i biokompatibilnost ispoljava stvaranjem karbonatnog HA na svojoj površini. U kontaktu sa tkivima ova keramika daje podršku za adheziju i proliferaciju mezenhimalnih stem ćelija (Gou i sar. 2005, Liu i sar. 2008).

Budućnost endodontske terapije je *regenerativna endodoncija* koja će objединiti znanja o interakciji između pažljivo dizajniranog trodimenzionalnog poroznog skafolda i stem ćelija koje su odgovorne za morfogenetske signale, proliferaciju i diferencijaciju koja vodi nastanku novih tkiva.

Otkriće dentalnih stem ćelija je znatno unapredilo ovo polje istraživanja. Napredak u tkivnom inženjeringu će obezbediti potencijalni biološki pristup terapiji, gde će se sa dentalnim stem ćelijama omogućiti kreiranje ili rekonstrukcija zubnih tkiva uz korišćenje biorazgradivih skafolda i uz pomoć faktora rasta (Nedel i sar. 2011).

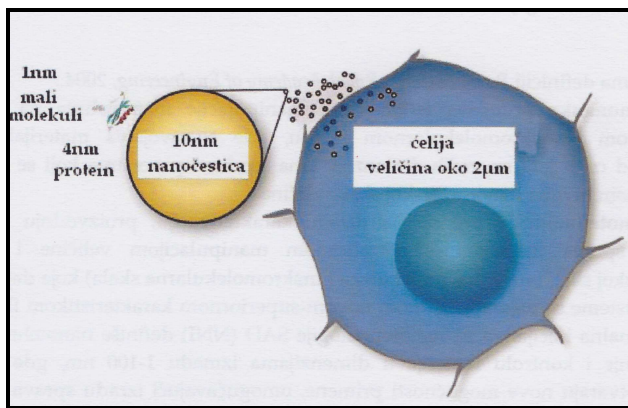
Proliferacija i diferencijacija ćelija dentalne pulpe je ključna za razvoj, morfologiju i reparaciju povreda pulpnog tkiva. Različiti faktori rasta, signalne molekule i transkriptivni faktori su uključeni u proliferaciju i odontoblastnu diferencijaciju iz ćelija dentalne pulpe. U te procese su uključeni koštani morfogenetski protein 2 (BMP-2), dentin sijaloprotein, osnovni faktori rasta fibroblasta i drugi (Qi i sar. 2013).

Razumevanje delovanja ovih ćelija, kao i mehanizama i faktora koji ih regulišu aktuelna su tema daljih istraživanja.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. NANOTEHNOLOGIJA

Nanotehnologija je polje primenjene nauke bazirana na dizajnu, sintezi i primeni materijala i uređaja reda veličine *nano* (jedan nanometar je milijarditi deo metra). U prirodi postoje brojni primeri objekata nanometrijskih dimenzija, kao što su molekuli DNK, crvena krvna zrnca, molekuli vode, virusi, bakterije i sl.



Slika 1. Nanočestica (Papić i sar. 2009)

Nanotehnologija predstavlja proizvodnju i aplikaciju struktura, sprava ili sistema kontrolisanom manipulacijom veličine i oblika na nanometrijskoj skali (atomska, molekulska i makromolekularna skala) koja daje strukture, sprave ili sisteme sa najmanje jednom novom superiornom karakteristikom ili svojstvom. Nacionalna inicijativa za nanotehnologije SAD (NNI) definiše nanotehnologiju kao «razumevanje i kontrolu materije u dimenzijama između 1-100 nm», gde jedinstveni fenomeni otvaraju nove mogućnosti primene i izrade sprava na nano nivou (Papić i sar. 2009).

Ova nova oblast nauke bavi se kontrolisanjem materije, energije i/ili informacije na atomskom i molekularnom nivou. Ovo omogućava pravljenje

novih materijala koji su sve sličniji prirodnim biomolekularnim strukturama. Nanotehnologija je veoma različita jer se prostire od ideje nastale u klasičnoj fizici i nekih praktičnih primena koje se baziraju na molekularnom samoorganizovanju, pa sve do pravljenja novih materijala sa dimenzijama koje imitiraju nultu dimenziju.

Prema definiciji *Royal Society* i *Royal Academy of Engineering*: nanonauka proučava fenomene i manipulacije materijalima na anatomskom, molekularnom i makromolekularnom nivou, gde su svojstva materijala značajno drugačija od onih sa većim dimenzijama (Papić i sar. 2009).

Nauka o nanomaterijalima i tehnologija njihove proizvodnje stara je koliko i sama hemija, a potiče još iz perioda upotrebe cemenata kod Rimljana, ili od formulacija koloidnih plemenitih metala koji su se koristili za bojenje stakla u srednjem veku. Kao posebne discipline, nanonauka i nanotehnologija razvijaju se tek u poslednjih 20-tak godina. One se bave materijalima čije su dimenzije male odn. veličinama koje se ne mogu posmatrati jednostavnim optičkim, ali ni konfokalnim mikroskopom.

Pionir ove tehnologije je Kim Eric Drexler, američki inženjer poznat po popularizaciji ideje o molekularnoj nanotehnologiji, 70-tih godina prošlog veka. Sam termin «nanotehnologija» je 1974. godine potpuno nezavisno, upotrebio profesor Taniguchi sa Univerziteta u Tokiju, da bi opisao proizvodnju materijala sa nanometarskom preciznošću.

2.2. NANOMEDICINA

Termin nanotehnologija se već više decenija koristi najčešće u naučnim oblastima kao što su elektronika, fizika i inženjerstvo. U ovim oblastima ona je pokazala ogroman napredak, ali u biomedicini i farmaciji, njene mogućnosti tek treba istraživati.

Ona je ostvarila snažan uticaj u raznim oblastima medicine, uključujući oftalmologiju, kardiologiju, endokrinologiju, onkologiju, imunologiju, ali pre

svega u visokospecijalizovanim oblastima kao što su isporuke gena, targetiranje mozga, tumora i formulisanje oralne vakcine. Ova tehnologija stvara ineligentne sisteme, uređaje i materijale za bolje farmaceutske aplikacije i predstavlja najznačajniju tehnološku podršku individualno prilagođenoj terapiji i personalizovanoj medicini. Veliki pomak je napravljen u oblasti dijagnostike i terapije tumora. Tu se koriste različiti nanomaterijali kao što su polimeri, lipozomi, kvantne čestice, oksidi gvožđa, nanotube, nanožice i nanočestice zlata (Chen, Cui 2013).

Nanomedicina je grana medicine koja se zasniva na medicinskoj primeni nanotehnologija, kroz primenu nanomaterijala, nanoelektronskih biosenzora i molekulske nanotehnologije (Gui i sar. 2011, Jokanović 2012).

Sama veličina čestica nanomaterijala (<100nm), koja je slična veličini bioloških molekula i struktura (proteini 5nm, organele 100-200nm), upućuje na moguću primenu nanomaterijala u *in vivo* i *in vitro* biomedicinskim istraživanjima (Fan i sar. 2014).

Imajući u vidu da nanomedicinski lekovi napravljeni od nanomaterijala i nanopartikula (u odnosu na lekove napravljene od istih materijala na klasičan način) imaju i do deset puta veću interaktivnu površinu, nedvosmisleno ukazuje o mogućem poboljšanju farmakokinetičkih i farmakodinamičkih osobina leka.

Nanomedicina predstavlja medicinsku primenu različitih materijala i aparata/uređaja nano-dimenzija u proceni, očuvanju i poboljšanju zdravlja i opšte dobrobiti. Leary (2006) smatra da će femto-sekundni laserski sistemi, nanoigle i nanopincete npr. revolucionarno unaprediti neurohirurgiju.

Ova nova grana medicine koristi prednosti formulacija sa nanomaterijalima da bi se postiglo optimalno oslobađanje leka i da bi se olakšalo neinvazivno snimanje.

Chen i sar. (2013) su ispitivali nesferične nanočestice zlata za targetiranje i snimanje kancera. Zbog činjenice da su ove čestice veoma fotostabilne i biokompatibilne koriste se i u fototermalnoj terapiji, gde se energija fotona

konvertuje u toplotu koja indukuje oštećenja malignih ćelija. Oni sa velikim optimizmom gledaju na aplikacije nanočestica zlata u CT dijagnostici i terapiji tumora.

Zhou (2013) ističe da je molekularno snimanje (vizualizacija i kvantitativno i kvalitativno analiziraju ćelijske funkcije i ekspresije gena ili proteina) interdisciplinarna oblast koja se veoma brzo razvija, a ima veliki potencijal da se primeni u ranoj dijagnostici kancera, neuroloških i kardiovaskularnih oboljenja. U tu svrhu razvijaju se nanomaterijali sa novim svojstvima kao što su fluorescentne magnetne čestice, nanočestice zlata i sl. Poslednjih nekoliko godina, Zhou i sar. (2013) ispituju konvertovane nanočestice (UCNPs) lantanida i smatraju da imaju brojne prednosti kao što su manja toksičnost, veća otpornost na foto izbeljivanje i degradaciju. Osim toga dublje prodiru u tkiva sa manje štetnih efekata po ćeliju, što omogućava njihovu primenu ne samo za molekularna snimanja, već i za simultano otpuštanje lekova u ciljanoj (targetiranoj) terapiji.

Različiti sistemi za oslobađanje leka na nano nivou mogu se izraditi od bezbrojnih kombinacija nanomaterijala i molekula, tako da mogu delovati kod pojedinačnog pacijenta na specifičnom mestu-tkivu pomoću specijalnog vezivanja za površinu molekula nosača-liganda.

Uskoković (2011) je opisao široku upotrebu HA/CAP (hidroksiapatit/kalcijum fosfat) nanočestica kao nosača za isporuku lekova ili kao nosača u genskoj terapiji. Takav primer su inkapsulirani antibiotici koji deluju i na aerobne i na anaerobne bakterije (*gatifloxacin*), a koristi se u terapiji osteomijelitisa, gde je teško ordinirati klasičan lek zbog oštećenih krvnih sudova. Razvijaju se antibiotici impregnirani CAP nanočesticama koji će posle isporuke antibiotika, podržati remineralizaciju izgubljene kosti.

Mulder i sar. (2014) su dizajnirali i testirali lipoprotein (HDL) obogaćen nanočesticama u kombinaciji sa statinima (lekovima za regulisanje nivoa holesterola). Studije na miševima su pokazale da je sa HDL nanoterapijom

moguće ciljano delovati i smanjiti zapaljenje u krvnim sudovima, što će smanjiti rizik od ponovljenog srčanog ili moždanog udara.

Distribucijom modifikovanih nanočestica srebra u organima miša posle ciljane aplikacije na koži bavili su se Keleştemur i sar. (2012). Histološkim analizama su utvrdili da nanočestice srebra znatno poboljšavaju ćelijsku infiltraciju, proliferaciju fibroblasta i sintezu novog kolagena delujući lokalno, bez oštećenja drugih organa.

Nanomaterijali nude i nove mogućnosti za dijagnozu i lečenje tumora. Troyer (2013) je ispitivao različite vrste ćelija (neuralne stem ćelije, monocit-makrofag slične ćelije) za isporuku namagnetisanih nanočestica gvožđe oksida u tumorska tkiva pre izazivanja hipertemije naizmeničnim magnetnim poljem (AMF). Utvrdio je da su nanočestice migrirale u tumorska tkiva, ali ne i u zdrava, i dovela do značajnog smanjenja (43%) veličine tumora na miševima. Očekuje se da će do 2015. godine, više od polovine svih novootkrivenih lekova i tehnologija otpuštanja leka biti bazirano na nanotehnologiji.

Zajedno sa genskom, individualizovanom terapijom, nanomedicina bi uskoro mogla da pokrene i razvoj mnogo očekivane personalizovane medicine. Ona predstavlja novu strategiju dostizanja i očuvanja zdravlja u kojoj se neće koristiti lekovi koji leče 80% populacije pacijenata, već će na osnovu molekularnog profila i genetske mape, donositi odluka o tretmanu prilagodjenom svakom pojedinačnom pacijentu.

Chen (2012) smatra da kalcijum fosfatne nanočestice mogu biti dizajnirane kao druga generacija vektora za gensku terapiju. Sintetisao je nanostrukturni HA cvetastog izgleda koji je, u stvari nosač za isporuku anti-kancer lekova (*mitoxantron*) direktno u ćeliju.

Inovacije u ovoj oblasti mogu čak stvoriti multifunkcionalna sredstva koja istovremeno postavljaju dijagnozu, otpuštaju lek na željeno mesto i prate efekte tretmana.

Cilj nanotehnologije je i kreiranje samo-izgradivih struktura nanočestica koje će ostvariti interakciju sa prirodnim makromolekulama kao što su DNK,

RNK ili peptidi. Sonay (2012) je ispitivao dvodimenzionalnu strukturu zlatnih nanočestica (13nm) i njihovo vezivanje za DNK segmente u cilju bolje isporuke gena, lekova, ali i u fototermalnoj terapiji. Najveće ograničenje za upotrebu struktura na bazi DNK u biološkim aplikacijama, je njihova neotpornost na delovanje enzima. Nanočestice zlata su po mišljenju Sonay-a zaštitile DNK od delovanja DNaze, vezivanjem za njena receptorska mesta i smanjile cepanje lanaca za 80%.

Poslednjih godina posebno težište nanofarmacije je razvoj odn. izrada novih modela aplikacije. Nove mogućnosti otpuštanja lekovitih supstanci i formulisanje preparata pomoću nanotehnologija predstavlja prekretnicu ali i budućnost u lečenju. Transport lekova, na klasičan način, putem krvi je visoko nespecifičan, lekovi se akumuliraju u zdravim organima, što za posledicu ima nižu toleranciju i znatan morbiditet. Savremeni sistemi za otpuštanje lekova olakšali su pristup lekovite supstance u tačno određena tkiva. Primenom ove napredne tehnologije mete postaju specifične organele unutar pojedinačnih ćelija. Ovi materijali imaju mogućnost da prevaziđu probleme rastvorljivosti i stabilnosti i obezbede otpuštanje leka u željeno tkivo.

Lipozomi i polimeri su prve nanoplatforme razvijene za biomedicinske aplikacije koje treba da unaprede isporuku lekova do ciljnih organa ili tkiva. Blanco (2011) ističe da su anti-kancer lekovi, bilo da su obloženi nanočesticama ili su inkorporirani u njih, zaštićeni od degradacije, ali sa povećanom rastvorljivošću. Takođe, čestice ovako malih veličina izbegavaju RES (retikuloendotelijalni sistem zadužen za uklanjanje stranih čestica) što ih održava duže u cirkulaciji.

Izuzetno sitne nanočestice koje predstavljaju nosače lekova pokazuju vrlo brzo otpuštanje lekovite supstance i sposobnost penetracije u ciljano tkivo. Nanonosai lekova čije su dimenzije manje od 200 nm mogu proći filtriranje u plućima i slezini i olakšati leku prodor iz krvnog suda u tumorsko tkivo ili kroz različite fiziološke membrane (Jokanović 2012).

Smanjenje veličine je fundamentalna operacija koja ima važnu primenu u farmaciji. Ona poboljšava rastvorljivost i bioraspoloživost, smanjuje toksičnost, proširuje distribuciju i pruža bolje mogućnosti za formulisanje lekova. Konstantno se razvijaju nanomaterijali za aplikacije u farmaceutskoj industriji, kao što su karbonske (ugljenične) nanotube, grafeni, nanočestice zlata, srebra i dr.

Liu (2012) ističe da će elektrode od karbonskih nanotuba sa uređenom strukturom predstavljati novu generaciju elektroda za dijagnostikovanje specifičnih, osetljivih sekvenci DNK, što će predstavljati važan pomak za dijagnozu i tretman genetskih oboljenja i otkriće novih lekova. Kombinacijom jedinstvenih svojstava nanotuba sa DNA hibridizacijom stvara mogućnosti konstrukcije DNA biosenzora koji su jednostavni, jako osetljivi i multifunkcionalni. Biosenzori se mogu primeniti na mnogim poljima, a većina ih je razvijena za detekciju glukoze, proteina, pesticida i drugih malih molekula. Gui i sar. (2011) su ispitivali upotrebu karbonskih nanotuba, ali i nanočestica zlata i platine kao biosenzora.

Grafeni i grafenski oksidi su skoro otkriveni ugljenični nanomaterijali sa dvodimenzionalnom atomskom strukturom. Wu (2012) ističe njihovu primenu kao nanonosača za anti-kancer lekove ili gene, za detekciju biomolekula (DNK ili enzima), ali i za snimanje ćelija zbog njihovih jedinstvenih optičko-elektronskih svojstava (fotoluminiscencija). S druge strane, o štetnim efektima grafena se još diskutuje, ali Wu smatra da kad se prevaziđu problemi eventualne citotoksičnosti grafena i nanomaterijala na bazi grafena, njihova praktična upotreba biće neograničena (Wu i sar. 2012).

Nanočestice se mogu izrađivati na više načina: mlevenjem ili homogenizacijom pod visokim pritiskom velikih čestica kristala, kontrolisanom precipitacijom i kombinacijom mikroprecipitacije i homogenizacije.

Chen (2012) ističe da su bioaktivnost, biokompatibilnost, stabilnost i mehanička svojstva nanomaterijala, obično određena njihovom kompozicijom, strukturom, morfologijom i veličinom kristala, što zavisi od načina sinteze.

Poseban deo nanomedicine posvećen je tkivnom inženjeringu (*tissue engineering*).

Cilj tkivnog inženjeringa i regenerativne medicine usmeren je ka razvoju bioloških «zamena» koje bi se koristile za reparaciju, održavanje i/ili poboljšanje oštećenih tkiva.

Nanomaterijali obećavaju preokret u medicini i sve se više koriste u ovoj oblasti. Ovi materijali imaju sposobnost da oponašaju površinska svojstva prirodnih tkiva, izrazito su citokompatibilni i biokompatibilni, pa pokazuju odlična svojstva za upotrebu u inženjeringu tkiva i regenerativnoj medicini. U ovoj oblasti najdalje se otišlo u koštano tkivnom inženjeringu, gde je fokus istraživanja na razvoju skafolda (matriksa) koji će obezbediti ćelijsku podršku i vođenje formiranja koštanog tkiva (Saiz i sar. 2013).

Za biomedicinske aplikacije najdalje se otišlo u istraživanjima kalcijum fosfatne keramike i HA koji čini mineralnu komponentu kalcifikovanih tkiva kičmenjaka. Kalcijum fosfati su biokompatibilni, ne deluju kao strana tela i integrišu se u tkiva u procesima koštanog remodelovanja. Istražuju se i mešavine HA i TCP (trikalcijum fosfata) poznate kao bifazni kalcijum fosfati, za optimalnu restauraciju tvrdih tkiva (Uskoković 2011).

Razvoj nanotehnologija je unapredio i kalcijum fosfate kao biomaterijale. Chen (2012) ističe da nanostrukturni kalcijum fosfatni materijali (koji su sad sličnih dimenzija kao neorganske komponente kalcifikovanih tkiva) imaju bolju bioaktivnost nego konvencionalni materijali. Od prednosti se posebno ističu bolja biokompatibilnost, biodegradacija i odlična osteokonduktivna i osteoinduktivna sposobnost.

Nanostrukturno bioaktivno staklo i HA su najčešće korišćeni u koštano tkivnom inženjeringu kao nanopunioci za skafolde ili kao prevlake implanta. Fan i sar. (2014) su sintetisali bioaktivno staklo (sa nanočesticama od 30-60 nm) i upoređivali njegovu biokompatibilnost na humanim osteoblastima, poredeći ga sa HA i silikonom substituisanim HA, sa sličnom veličinom čestica. Ovo nanostrukturno bioaktivno staklo sintetisano sol-gel procesima pokazuje visoku

bioaktivnost, brzo formiranje apatitnog sloja na površini i povoljno utiče na proliferaciju osteoblasta.

Nanomaterijali osim što su veoma slični biološkim tkivima, imaju i veoma povoljnu površinu za regeneraciju tkiva kostiju i hrskavice zbog dobrog adheriranja proteina i njihove važne uloge u ćelijskoj regeneraciji. Ovo im je glavna prednost u odnosu na konvencionalne ili mikronske materijale.

2.3. RIZICI NANOTEHNOLOGIJE

Nanotehnologija ima potencijala da napravi mnoge nove materijale i uređaje sa širokim spektrom primene u medicini, biomaterijalima, elektronici i na polju proizvodnje energije. Sa druge strane, ovde se postavljaju ista pitanja kao kod uvođenja svake nove tehnologije, što podrazumeva brigu o toksičnosti i uticaju nanomaterijala na okolinu, odnosno njihovog uticaja na ekonomiju.

Pored prednosti, primena nanotehnologija uključuje i različite, do danas nepoznate, rizike vezane za čovekovu okolinu, zdravstvenu sigurnost, kao i druge različite negativne efekte (Jokanović 2012).

Iz ugla bezbednosti upotrebe novih lekova razmatra se, pre svega toksičnost, jer reaktivnost nano-čestica potiče od njihove velike aktivne površine u odnosu na masu i zapreminu. Nanočestice će imati različit efekat na zdravlje u poređenju sa česticama uobičajene veličine iako imaju sličnu hemijsku strukturu. U prilog tome idu i nalazi studija o toksičnim efektima ultrafinih/nanočestica na pluća pacova, gde izazivaju toksična oštećenja u poređenju sa česticama većih dimenzija. Studije na pacovima, gde su korišćene ultrafine čestice polimera (od 18 nm), su pokazale da inhalacija ovih gasova indukuje vrlo visoku toksičnost pluća i smrt već posle 15 min. (Oberdörster 2000, Oberdörster i sar. 2005). Sa ovim se ne slažu Warheit i sar. koji su ispitivali uticaj različitih veličina čestica kvarca (12, 50, 300 i 500 nm) na pluća pacova i zaključili da inflamacija pluća i citotoksičnost ne zavise samo od veličine čestica, već i od njihove površinske aktivnosti (Warheit i sar. 2007). Povećanje

površinske zone ultrafinih/nanočestica je veoma važno za njihovu povećanu biološku aktivnost. On takođe ističe da toksikolozi moraju prvo ispitati fizičko-hemijska svojstva nanočestica (veličina čestica, njihova distribucija, kristalna struktura, površinska reaktivnost, metode sinteze nanomaterijala i sl.), pa tek onda testirati toksičnost materijala sa nanočesticama (Warheit i sar. 2008).

Ponašanje nano-čestica unutar ćelije je još uvek enigma. Takođe se još uvek ne razumeju svi metabolički i imunološki odgovori izazvani ovim česticama.

Buzea ističe da su makrofagi manje efikasni u procesima «čišćenja» pluća od inhaliranih nanočestica, u poređenju sa većim česticama. Zbog toga nagomilane nanočestice oštećuju pluća, a mogu se cirkulacijom, limfom ili nervnim sistemom translocirati i do udaljenih tkiva i organa. Ove čestice su manje od ćelija i organela, prolaze kroz biološke strukture i remete funkcionisanje ćelije (Buzea i sar. 2007).

Manipulišući materijalima na atomskoj skali, nanotehnologija je kreirala mnoge nove materijale sa specifičnim karakteristikama, čije se ponašanje ne može lako predvideti.

Li i Cui (2012) ističu da svi nanomaterijali (karbonske nanotube, grafeni, nanočestice zlata ili srebra) izazivaju značajan ćelijski oksidativni stres, koji dovodi do ćelijske apoptoze ili smrti. S ciljem da prevaziđu ovaj problem istraživali su superoksid dismutazu (SOD), kao i nanonosače na bazi lipida, polimera ili proteina, koji će je transportovati do ciljnog mesta u antioksidativnoj terapiji. SOD je jedna vrsta enzima (jetreni protein ili orgotein) koji ima specijalnu funkciju unutar ćelije, gde može popraviti oštećenja nastala delovanjem ROS (reaktivne kiseoničke vrste) i vodonik peroksida (H_2O_2).

Naučnici ističu da antioksidativne molekule kao što su SOD ili koenzim Q10 mogu biti nanotehnološki modifikovane i tako ubačene u ćeliju mogu dovesti do obnavljanja tkiva i produženja životnog veka ljudi (Li, Cui 2012).

Nanotoksikologija se suočava i sa izazovom da može da dešifruje molekularna zbivanja koja regulišu bioakumulaciju i toksičnost nano-čestica (AshaRani i sar. 2009).

Zbog toga sa nano-farmaceutskim proizvodima treba biti oprezan, jer lek pripremljen na klasičan način neće imati toksična dejstva, ali će zato biti manje efikasan, dok će se kod leka pripremljenog na nanotehnološki način možda pojaviti toksičnost, ali će imati mnogo snažnije ciljno dejstvo. Sa aspekta bezbednosti najprihvatljivija su nanotehnološka rešenja kod kojih je prisutna biorazgradljivost (Papić i sar. 2009).

2.4. NANOMATERIJALI - BIOKERAMIČKI MATERIJALI

Nanotehnologija je multidisciplinarna oblast i predstavlja spoj osnovnih nauka i primenjenih disciplina kao što su biofizika, molekularna biologija i biotehnika. Materijali sa nanočesticama imaju bar jednu dimenziju manju od 100 nm, što je veličina prosečnog virusa. Nanočestice se ne ponašaju ni kao čvrsti, tečni niti gasoviti materijali i ne podležu zakonima Njutnove, već kvantne fizike. Čestice ovih materijala pokazuju drugačija svojstva od čestica istog materijala-supstance, većih dimenzija, i razlikuju se po boji, električnim, magnetnim, mehaničkim i drugim svojstvima. Otuda i njihove specifične karakteristike, u smislu provodljivosti, reaktivnosti, odnosno optičke osetljivosti itd. (Papić i sar. 2009).

Warheit ističe da, npr. čestice titanijum dioksida gube svoju belu boju i postaju bezbojne kad im se veličina smanji na vrednosti manje od 50 nm, drugi materijali koji su izolatori, postaju provodnici kad se smanje na nano-skalu, a nerastvorljive supstance postaju rastvorljive kad su im čestice manje od 100 nm (Warheit 2008).

Nanomaterijali i na njima zasnovani poboljšani proizvodi, imaju sasvim drugačije karakteristike od tzv. »krupnih» materijala. Razlog tome je što ovi materijali imaju mnogo veću specifičnu površinu i unapređena mehanička

svojstva (elastičnost i krtošć). Chen (2012) u svojim istraživanjima ističe da loša mehanička svojstva kalcijum fosfatne keramike ograničava njihovu upotrebu. S druge strane, novi keramički materijali sinterovani sa česticama nano-veličine pokazuju mnoge prednosti vezane za unapređena mehanička svojstva (čvrstoća, modul elastičnosti, mikrotvrdoća po Vickers-u) ali i bolju bioaktivnost (adheziju i proliferaciju ćelija).

Ova napredna tehnologija poboljšava osobine materijala, smanjuje njihovu masu, povećavajući njihovu stabilnost i unapređujući njihovu funkcionalnost (Jokanović 2012).

Biomaterijali se mogu definisati kao materijali koji su dizajnirani tako da, nakon implantacije u ljudski organizam, zamene delove živog sistema ili ispune odgovarajuću biološku funkciju u bliskom kontaktu sa živim tkivom (Connor i sar. 2007).

Na konferenciji Evropskog udruženja za biomaterijale, ovi materijali su definisani kao neživi materijali koji se koriste u medicinske svrhe, sa ciljem da aktivno reaguju sa biološkim sistemom (Chen i sar. 2007).

Da bi ovi materijali mogli biti primenjeni u terapiji koštanog tkiva ili nekog drugog tkiva moraju ispuniti nekoliko osnovnih zahteva:

- biokompatibilnost materijala: materijal ili proizvodi nastali njegovim razlaganjem u fiziološkom okruženju, ne smeju da izazovu zapaljensku niti alergijsku reakciju, odnosno da deluju toksično na ćelije okolnog tkiva,
- mehanička svojstva materijala: osobine materijala treba da budu što sličnije osobinama tkiva koje treba da regenerišu, da obezbede odgovarajuću podršku, ali i da kasnije mogu da izdrže i neophodna opterećenja,
- poroznost i brzina degradacije materijala: ova svojstva su u najvećoj meri odgovorna za rast tkiva i vaskularizaciju unutar materijala,

- mogućnost lake sterilizacije materijala: ova osobina ne bi smela dovesti do promena u njihovom hemijskom sastavu ili bioaktivnosti (Chen i sar. 2007).

Biokeramički materijali se smatraju biokompatibilnim, tvrdim, sa relativno slabom otpornošću na naprezanje, odličnom pritiskom čvrstoćom i visokom otpornošću na habanje. Ovi materijali (prirodni ili sintetički), korišćeni samostalno ili u kombinaciji sa polimerima, su najpogodniji od svih biomaterijala za tkivno inženjerstvo tvrdih i mekih tkiva (Jokanović 2012).

Među biokeramičkim materijalima posebno mesto pripada kalcijum ortofosforim sistemima.

Kalcijum ortofosfati su hemijska jedinjenja koja se sastoje iz tri osnovna hemijska elementa - jona: kalcijuma (Ca^{2+}), fosfora (P^{5+}) i kiseonika (O^{2-}). Većina ortofosfata je slabo rastvorljiva u vodi, nerastvorljiva u alkalnoj sredini, a dobro rastvorljiva u kiselinama. Biološki posmatrano, kalcijum ortofosfati su glavna komponenta svih koštanih tkiva sisara.

Najpoznatiji kalcijum fosfati koji se koriste u biomedicinskim aplikacijama su oktakalcijum fosfat (OCP), amorfni kalcijum fosfat (ACP), α/β TCP i HA.

Kalcijum fosfatni materijali koji imaju odnos Ca/P manji od 1, a veći od 2, nisu prihvatljivi za implantaciju u tkiva (Chen i sar. 2012).

Ponašanje kalcijum fosfata u bioaplikacijama zavisi mnogo od njihove morfologije i hemijske kompozicije. Biokeramički materijali za biomedicinske aplikacije se dele od bioinertnih keramika kao što su cirkonija i alumina, pa do bioaktivnih keramika, kao što su bioaktivna stakla i kalcijum fosfatne keramike. Fan (2014) ističe da su bioinertni materijali neaktivni i ne formiraju direktnu vezu sa tkivom domaćina, dok s druge strane bioaktivni materijali stimulišu formiranje kalcifikovanog tkiva tako što hemijski reaguju sa okolnim tkivom. Bioaktivni materijali formiraju apatitni sloj na površini kad dođu u kontakt sa tkivnim fluidima i ostvaruju direktnu vezu sa tkivom. To potvrđuju i nalazi

Matsumota (2011) koji smatra da cirkonija (ZrO_2) ima dobra mehanička svojstva i malu toksičnost, ali da ima slab afinitet prema ćelijama i tkivima. Ta njena inertnost se može prevazići stvaranjem ZrO_2/HA materijala koji će biti bioaktivni.

2.4.1. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit hemijske formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, (Ca/P odnos 1,67) je najstabilnija i najmanje rastvorljiva faza kalcijum ortofosfata posle fluorapatita. On je istovremeno najznačajnija so kalcijuma i fosfora. HA je osnovna mineralna komponenta kostiju. Sintetički se proizvodi od ranih 70-tih, a u kliničkoj upotrebi je poslednjih 20 godina (Hassan i sar. 2011).

Najpoznatija je njegova upotreba u bioaplikacijama za supstituciju oštećenog koštanog tkiva, ali njegove aplikacije prevazilaze polje biomedicine. Koristi se kao adsorbent u hromatografiji za separaciju proteina i DNA, kao hranljivi suplement ili sredstvo za rast u prehrambenoj industriji, odnosno kao sredstvo za prečišćavanje vode i za uklanjanje jona teških metala (Uskoković 2011).

Nanosferna keramika, posebno hidroksiapatit (HA) je vrlo popularan materijal, bilo da je obložen ili ispunjen drugom vrstom materijala, zato što ima veliku mogućnost propagiranja regeneracije tkiva. Nanometrijska veličina zrna predstavlja prednost zbog mnogo veće adhezije, proliferacije i diferencijacije ćelija.

Povećanje proliferacije i adhezije koštanih ćelija, koja je uočljiva sa smanjenjem veličina zrna je uočio Lin i sar. (2007), a potvrdio Fan (2014) koji ističe da su komparativne studije između nano- i mikrostrukturnog HA, ukazale na izraženiju ćelijsku proliferaciju kod nanostrukturnih materijala.

Za sintezu nanostrukturnog HA mogu se koristiti različite tehnike i metode kao što su mehanohemijske sinteze, sol-gel sinteza (Fan i sar. 2014), preparacija sagorevanjem, kao i metode «mokre» hemije, koje uključuju

precipitaciju (Chen i sar. 2012), hidrotermalnu metodu (Lin i sar. 2007) i metode hidrolize drugih kalcijum ortofosfata. Hidrotermalni metod sinteze je jedan od najjednostavnijih i najefikasnijih metoda sinteze hidroksiapatita.

Biološki HA, koji ulazi u sastav kostiju i zuba, razlikuje se od sintetskog HA i to po svom sastavu, fizičkim i mehaničkim osobinama. Biološki apatiti se razlikuju hemijski od idealnog HA po tome što uvek sadrže katjone kao što su Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- i F^- , koji mogu da se ugrade i rešetku HA supstitucijom jednog ili više jona Ca^{2+} . Biološki apatit je najčešće deficitaran u Ca^{2+} i uvek karbonatno supstituisan, što utiče na njegove mehaničke osobine. S druge strane, mehaničke osobine sintetskog HA uglavnom zavise od načina njegove sinteze i uslova sinterovanja (Jokanović 2012).

Hidroksiapatit, sa stanovišta primene ima interdisciplinarni značaj, zbog čega su još uvek intenzivna istraživanja svih specifičnosti strukturnog dizajna i njegovog uticaja na osobine materijala u oblasti medicine, stomatologije, tehnologije, hemije, životne sredine itd.

Sa stanovišta stomatologije HA spada u grupu biokeramičkih materijala koji se koriste za obnavljanje obolelih ili oštećenih delova zubno-koštanog sistema.

Razvijena je, a tema je i daljih istraživanja, tehnika nazvana «sintetska gleđ» ili adhezija kristala. Ona uključuje aplikaciju gel paste na bazi kalcijum/fosfatnih jona u kiselom medijumu na površinu gleđi, koja će dovesti do rasta kristala direktno iz neorganske strukture zubne gleđi. Oliveira i sar. (2007) su primenili pastu na bazi fluor-hidroksiapatita (F-HA) i dobili formiranje i rast nanokristala. Ova formirana F-HA prevlaka je potpuno imitirala biološki materijal (gleđ), a dalja istraživanja će omogućiti potpuni uvid u hemijsku kompoziciju, kristalnu strukturu i morfologiju na nano-skalskom nivou. Potencijalne aplikacije ove sintetske gleđi, po mišljenju autora, su reparacija početnih karioznih lezija, beljenje zuba, zalivanje fisura i sl.

Danas, zahvaljujući nauci kreiranja nanočestica, pojavile su se alternativne strategije za remineralizaciju kiselinama oštećene gleđi ili dentina.

To se može postići ili direktnom zamenom izgubljenih minerala ili preko nanočestica, koje su nosači jona (Ca, P, F) koji se oslobađaju prilikom rastvaranja čestica/nosača. Nanomaterijali koji dovode do povećanja mineralnih komponenti u gleđi i/ili dentinu su kalcijum fluoridi, HA, karbonatni apatit, bioaktivno staklo, nano prekursori amorfnih kalcijum fosfata i sl. (Besinis i sar. 2014).

U reparaciji i regeneraciji tkiva stomatognatnog sistema, HA se može koristiti u dve forme: *porozni* (sa porama od najmanje 100 μm) kroz koje prožima koštano tkivo ili *mikroporozni* (sa mikroporama od 1 μm i kristalima veličine preko 200 nm).

Aplikacije poroznog HA su široko rasprostranjene i prevazilaze njegovu najčešću primenu kao skafolda u koštanoj regeneraciji. U tkivnom inženjeringu se koristi zbog njegove dobre biokompatibilnosti, osteokonduktivnosti i različitog stepena biodegradacije. Danas se koristi i kao sredstvo za otpuštanje lekova (Sopyan i sar. 2007) ili ćelijsku proliferaciju.

Sopyan (2007), je opisao različite metode za dizajniranje i proizvodnju poroznog HA sa kontrolisanom poroznošću, dobrom povezanošću pora, mehaničkom otpornošću (koja raste od 2 do 20 MPa posle 3 meseca implantacije) i površinskim karakteristikama od kojih i zavisi njegovo ponašanje u specifičnim aplikacijama. Svaka od ovih metoda kombinuje sintezu poroznog HA sa unapređenim svojstvima. Huang (2007) smatra da je osteokonduktivnost skafolda povezana sa poroznošću i veličinom pora. Takođe, ističe da postoji neslaganje oko veličine pora koje će obezbediti osteokonduktivnost skafolda (raspon od 40-400 μm) uz prihvatljiv stepen biodegradacije.

Teixeira (2008) je sintetisao porozni HA skafold koristeći metode polimerne replikacije, i dobio skafold sa homogenom mrežom pora koje se pružaju od periferije ka centru. Smatra da se ovakva porozna struktura može koristiti kao skafold za tkivni inženjering, ali i kao nosač za isporuku bioloških molekula.

Chen (2012) je u istraživanjima istakao da porozni 3D nanokompozitni skafold (HA/polimer) dobijen metodama precipitacije, ima izvrsna mehanička svojstva slična prirodnoj kosti. Ovi porozni materijali nemaju samo makropore, već i mikropore na zidovima makropora, što obezbeđuje dobru interakciju ćelija/materijal i što je u stvari ključ tkivnog inženjeringa.

Mikroporozni HA se često koristi u kompoziciji sa drugim materijalima koji imaju bolja mehanička svojstva. Matsumoto (2011) je predstavio materijal koji za osnovu ima cirkoniju čija su mehanička svojstva slična kortikalnoj kosti, a bioaktivnost mu obezbeđuje mikroporozni HA. *In vitro* i *in vivo* testovima na ćelijama koštane srži miša, kao i implantacijom u kalvariju miša, potvrđena je biokompatibilnost ovog materijala, pa autori smatraju da je to dobar materijal za reparaciju koštanog tkiva.

U mnogim kliničkim primenama upotreba biokeramičkih materijala je ograničena zbog neadekvatnih mehaničkih osobina. Da bi osobine implanta bile što sličnije osobinama kostiju i da bi se dobile odgovarajuće mehaničke osobine često se koriste bioaktivni materijali u kompozitima ili kao slojevi za prevlačenje drugih materijala. Kod kombinacije metal-keramika, metal daje dobra mehanička svojstva, a keramika dobru vezu sa kostima. Prevlake od keramike su najčešće veoma tanke (ispod 50 μm). Prevlake od hidroksiapatita se dobijaju plazma-raspršujućom tehnikom. Ovi sistemi pokazuju dobru sposobnost vezivanja za kosti i ubrzavaju osteointegraciju (Tredwin i sar. 2013). Danas se razvijaju i alternativne metode za dobijanje tankih HA filmova kao što je sol-gel tehnika, čije su prednosti hemijska homogenost, finija zrnasta struktura, niska temperatura proizvodnje, jednostavnost i jeftinija proizvodnja (Tredwin i sar. 2013).

HA keramika se najčešće koristi za prekrivanje površine dentalnih implanta, u blok formama kao koštani supstituent ili u formi granula za popunjavanje koštanih defekata (Matsumoto i sar. 2011, Uskoković i sar. 2011).

HA poseduje biokompatibilnost, koja se odlikuje odsustvom alergenskog dejstva, netoksičnošću, nekancerogenošću, dok po svojoj čvrstoći ispunjava

zahtev biofunkcionalnosti. Svojom poroznom strukturom dozvoljava mekim i čvrstim tkivima prorastanje, a time i direktan spoj tkiva na implant, čime se povećava njegova stabilnost.

On je izrazito biokompatibilan materijal, jer u sebi sadrži jone Ca, P i OH koji su u relativno visokoj koncentraciji prisutni unutar samog organizma.

2.5. BOKOMPATIBILNOST MATERIJALA ZA STOMATOLOŠKU PRIMENU

Pre kliničke primene novih materijala koji ulaze u sastav nekog medicinskog sredstva, neophodno je ispitati njihova neželjena dejstva u skladu sa međunarodnim standardima. Cilj ovakvog pristupa je da se na osnovu odgovarajućih eksperimenata na ćelijama ili životinjama predvide i procene svi rizici koji bi mogli nastati posle primene tih materijala na ljudima.

Svi neophodni testovi su standardizovani i definisani u međunarodnom standardu **ISO 10993** (Biological evaluation of medical devices). Testovi su zasnovani na naučno-prihvatljivim metodama sa jasnim kriterijumima za procenu efekta, jednostavni i izvodljivi u različitim laboratorijama.

Najnovija evropska regulativa koja se odnosi na ispitivanje biološke kompatibilnosti medicinskih sredstava zahteva pored navedenih testova i potpuno ispitivanje njihove toksičnosti i neželjenih dejstava. Zato je neophodno uraditi brojne testove, a pre svega akutne, subakutne, subhronične i hronične toksičnosti, genotoksičnosti, karcinogenosti i reproduktivne toksičnosti (Jokanović M. 2011).

Ispitivanja medicinskih sredstava i novih materijala koji se primenjuju u stomatologiji vrše se i prema standardu **ISO-Technical report 7405** (Biological evaluation of dental materials), što zavisi od predviđene namene.

Na osnovu dobijenih rezultata vrši se analiza rizika, što podrazumeva procenu mogućih efekata kod ljudi, i zasniva se na naučnim i etičkim principima.

Biokompatibilnost je svojstvo materijala koje treba da obezbedi odgovarajući odgovor tkiva domaćina na mestu njegove primene. To znači da tkivo koje je u kontaktu sa materijalom ne sme da pokazuje znake toksičnosti, iritacije, zapaljenja, alergije, odnosno ne sme imati genotoksične ili karcinogene efekte (Valey i sar. 1995, Zeferino i sar. 2010).

Kako primenjeni biomaterijali u većini slučajeva ostaju dugoročno u kontaktu sa lokalnim ćelijama i tkivima na mestu primene ili implantacije, stupajući s njima u interakcije, neophodno je da su što inertniji, kako ih organizam ne bi odbacio ili uništio (Raković i sar. 2010). Zbog toga što reakcija na strano telo nastupa neposredno nakon implantacije biomaterijala (prolazeći kroz faze zapaljenja i zarastanja i uz učešće raznih tipova ćelija), potrebno je izvršiti sva moguća testiranja biokompatibilnosti novih biomaterijala.

Početna faza u testiranju biokompatibilnosti su laboratorijski citotoksični i genotoksični testovi (*in vitro*). Po mišljenju White (1991) počinje se od prvih skrining testova baktericidnih svojstava novih formulacija cemenata (na bazi hidroksiapatita), a posle toga se ispituje uticaj veličine čestica i poroznosti HA na preživljavanje i proliferaciju ćelija humanih fibroblasta (Higashi i sar. 1996). I druge formulacije eksperimentalnih cemenata (na bazi kalcijum silikata) posle osnovnih citotoksičnih testova (MTT), testiraju se na ćelijskim linijama koje imaju osteoblastni fenotip (ćelije humanog osteosarkoma) (Gandolfi i sar. 2008) ili preosteoblastne linije MC3T3-E1 (Brayan i sar. 2010) da bi se ispitaio njihov osteogeni potencijal.

Procena *in vitro* može da da brže podatke o biološkim interakcijama, a testovi nisu skupi. Međutim uvek se mora postaviti pitanje da li *in vitro* testovi zaista mere pojave koje će nastati u mnogo složenijoj *in vivo* sredini. *In vitro* testovi u najmanjoj meri prethode testovima na životinjama, što je i poželjno. Ukoliko se ne pokaže da je materijal izrazito toksičan, vrše se dalji testovi na animalnim modelima (implantacija u subkutano, mišićno, koštano ili druga tkiva) - *in vivo* testovi i na kraju testovi na ciljanim tkivima životinja odn. *klinički testovi* na ljudima (Modareszadeh i sar. 2011).

Reakcija koštanog tkiva na implantirani materijal je čest način evaluacije bioloških potencijala endodontskih cemenata. Pissiotis (1990) je pratio tkivni odgovor na implantirani porozni HA sa kolagenom u mandibuli zamorčica, Torabinejad (1995, 1998) je MTA implantirao u mandibulu i tibiju zamorčica, McNamara (2010) je modifikovani MTA implantirao u mandibulu pacova i sl. Da bi se dobio još precizniji tkivni odgovor, materijali se implantiraju u specifična tkiva koja će na najbolji način simulirati kliničke uslove. Zubi pasa su često model za ispitivanje eksperimentalnih kalcijum fosfatnih i kalcijum silikatnih cemenata (MTA) za apeksifikaciju zuba za otvorenim apeksom (Felippe i sar. 2006) ili za praćenje reparacije furkacionih perforacija (Noetzel i sar. 2009). Zubi pacova su, takođe, model za furkacione perforacije (Silva i sar. 2009).

Treću fazu *in vivo* ispitivanja predstavljaju *klinička testiranja* novih materijala u različitim indikacijama. Kalcijum silikatni cement (MTA) je ispitivan kao sredstvo za direktno prekrivanje pulpe u kliničkim studijama Witherspoon-a (2008) i Shahravan-a (2011); za pulpotomiju u dugoročnim studijama na četiri i dve godine (Witherspoon i sar. 2006, Sonmez i sar. 2008); za reparaciju internih i eksternih resorpcija (Hsien i sar. 2003, Sari i sar. 2006, Yilmaz i sar. 2010) i sl.

Testiranje biomaterijala se obično vrši na životinjama, jer su one model sredine koja se može sresti i kod ljudi. Ipak kod životinja postoji ogroman opseg razlika u pogledu anatomije, biohemije, fiziologije i sl. Bez potvrde kroz kliničke studije na ljudima, često je teško izvesti potvrđan zaključak samo na osnovu testova na životinjama. Testiranja na živim sistemima uvek vode ka eksperimentalnoj varijabilnosti. Što je sistem složeniji (ljudske ćelije nasuprot ćelijama mikroorganizama) može se očekivati veća statistička varijabilnost rezultata testiranja (Raković i sar. 2010).

2.5.1. Čelijske linije i vrste testova (*in vitro*)

U *in vitro* uslovima najčešće se koriste izolovane, adherentne čelijske kulture da bi se utvrdila citotoksičnost i biološka kompatibilnost.

Za testove citotoksičnosti mogu se koristiti **permanentne čelijske linije** (fibroblasti miša L929, BHK 21 fibroblasti hrčka, He-La humane epitelne ćelije cervikalnog karcinoma, MG-63, humane ćelije slične osteoblastima) (Torabinejad i sar. 1995, Jantova i sar. 2008, Ribeiro i sar. 2006b, Chen i sar. 2009, Karapinar-Kazandag i sar. 2011.) i **primarne čelijske linije** koje potiču iz živih tkiva (gingiva, periodontalni ligament, fibroblasti pulpe, humani osteoblasti, limfociti iz periferne krvi) (Key i sar. 2006, daSilva i sar. 2006, Arun i sar. 2011, Scelza i sar. 2012). Permanentne čelijske linije lakše je gajiti, mnogo brže se razvijaju, imaju neograničen životni vek i češće se koriste u odnosu na primarne čelijske linije koje imaju ograničen životni vek. Čelije L-929 fibroblasta miša se najduže koriste za testiranje biomaterijala, jer su lake za održavanje u kulturi (Torabinejad & Ford 1995, Modareszadeh 2010, Kalmodia 2011).

Danas se za proučavanje biomaterijala koriste najmanje tri metode istraživanja: 1. test direktnog kontakta; 2. test agar difuzije; 3. test elucije (ispiranja). Ovo su morfološki testovi, što znači da se njihovi rezultati mere posmatranjem promena u morfologiji ćelija. Citotoksični efekat se prati preko različitih parametara, kao što su inhibicija čelijskog rasta, citoliza, praćenje markera iz membrane ili citoplazme, promene metaboličke aktivnosti i dr. (Hensen Pettersen 1988, Torabinejad & Ford 1995).

In vitro testovi citotoksičnosti su primarni trijažni testovi biokompatibilnosti za različite vrste materijala koji se koriste u medicinske svrhe. Čim se odredi profil citotoksičnosti nekog materijala moraju se obaviti ostali specifični testovi kako bi se utvrdila njegova biokompatibilnost.

Većina studija fokusirana je na utvrđivanju citotoksičnosti materijala za kliničku primenu u medicini/stomatologiji, a malo je onih sa podacima o genotoksičnosti, iako je to važan faktor biokompatibilnosti. Genotoksična

oštećenja ne dovode nužno do odumiranja ćelije ili neke odmah uočljive promene. Ipak promene na ćelijskom genomu značajno umanjuju potencijal tkiva za oporavak ili na duže staze dovode do razvoja tumora (Brzović i sar. 2009).

Karcinogeneza je proces koji se odvija u više koraka, koji se karakterišu genetskim, epigenetskim i fenotipskim promenama. Ovakve promene uključuju genetska oštećenja, mutaciju ključnih gena vezanih za deobu ćelije, odumiranje ćelije, metastatski potencijal, kao i aktivaciju signala ili metaboličkih puteva koji daju ćelijama povoljne karakteristike rasta i preživljavanja (daSilva i sar. 2006). Sa sve većim poznavanjem ovih mehanizama, kao i saznanjem da se većina slučajeva karcinoma može sprečiti, fokus je, pre svega, na identifikovanju agenasa i izloženosti koje dovode do njegove pojave.

Genotoksični testovi su *in vitro* i *in vivo* dizajnirani testovi sa ciljem da detektuju komponente koje indukuju genetska oštećenja, uključujući oštećenja DNK, mutacije gena, prekide hromozoma, promenu reparatornih kapaciteta DNK, ćelijsku transformaciju itd. (Ribeiro i sar. 2006b, Nishimura i sar. 2008). U poslednjoj dekadi genotoksični testovi su široko prihvaćeni kao važni i korisni indikatori kancerogenetskog potencijala nekog materijala. Osnovni kriterijumi za odabir testova genotoksičnosti su: evaluacija rezultata na čoveku, osetljivost (da se izbegnu lažno pozitivni ili lažno negativni rezultati), ponovljivost (uniforman test i stroga standardizacija protokola), brzina izvođenja testa, jednostavnost i ekonomičnost.

Osnovni genotoksični testovi su:

1. Testovi za detekciju genske mutacije

- Test reverznih (povratnih) mutacija na bakteriji *Salmonella typhimurium* (Amesov test) (About i sar. 2005, Jantova 2008, Mitić-Ćulafić i sar. 2009)
- Test reverznih mutacija na bakteriji *Escherichia coli*
- Test genskih mutacija u kulturi ćelija sisara (Jantova 2008)
- Test specifičnog lokusa kod miša

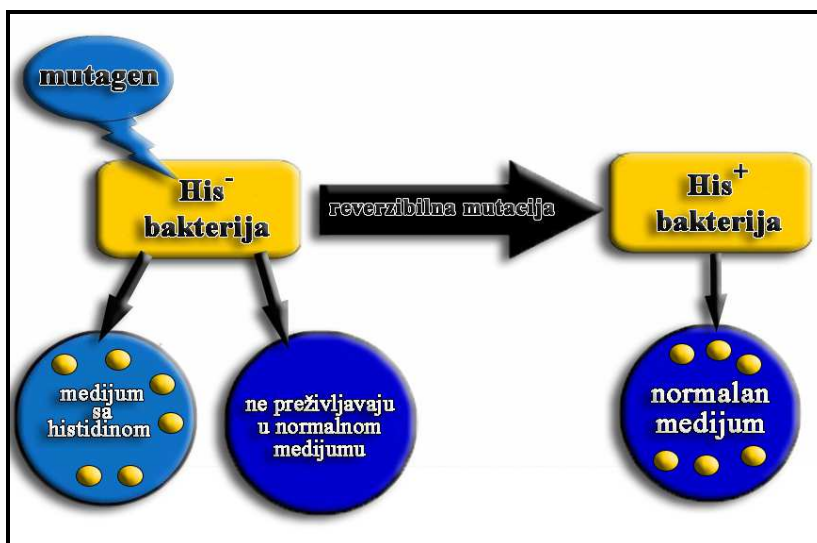
2. Za otkrivanje hromozomskih promena

- *In vitro* citogenetski test (Arun i sar. 2011)
- *In vivo* citogenetski test (koriste se limfociti periferne krvi, pouzdaniji su od *in vitro*)
- Mikronukleus test (About i sar. 2005)
- Citogenetski test na polnim ćelijama sisara

3. Za otkrivanje efekata na nivou DNK

- Oštećenje i reparacija DNK (Ding i sar. 2010.)
- Neredovna sinteza DNK
- Test mitotske rekombinacije (Crossing-over i konverzija gena)
- Test izmene sestrinskih hromatida *in vitro*
- Komet test

Amesov test je predstavnik testova za detekciju genskih mutacija. Test se izvodi na mutiranim sojevima bakterije *Salmonelle*, koja ima mutaciju na kodu odgovornom za sintezu histidina. Svi sojevi *Salmonelle typhimurium* (normalni i mutanti) mogu da se razvijaju samo u medijumu u kome postoji histidin. U prisustvu genotoksične supstance (mutagena) odvija se reverzna mutacija i stvaraju se novi izmenjeni sojevi *Salmonelle t.* koje sad mogu da sintetišu histidin, odn. bakterija sad raste na medijumu koji ne sadrži histidin (Slika 2).



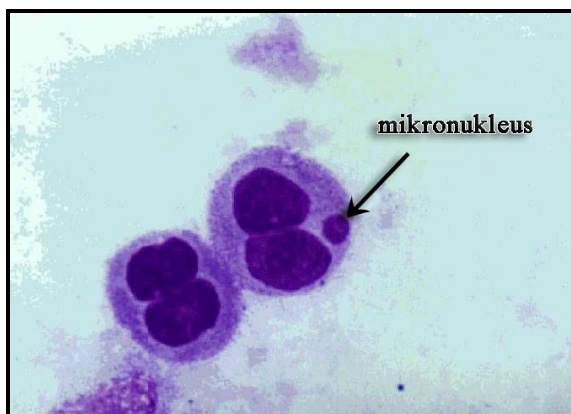
Slika 2. Ames-ov test za detekciju genskih mutacija.

Laurent je utvrdio da trikalcijum silikatni cement (eksperimentalni materijal) Ames-ovim testom nije pokazao mutagena svojstva, kao ni kontrolni materijali MTA i kalcijum hidroksid (Dycal) (Laurent i sar. 2008). Hidroksiapatit, kao često korišćena biokeramika, u istraživanjima Jantová-e i Hassan-a nije izazvao mutacije na *S. Typhimurium* (Jantová i sar. 2008, Hassan i sar. 2011). S druge strane, Landsiedel smatra da se Amesov test (jako popularan za druge materijale) ređe koristi kao genotoksični test u ispitivanjima materijala sa nanostrukturom. Rezultati ovih testova su uvek negativni, jer po njegovom mišljenju zid bakterijske ćelije deluje kao barijera za mnoge nanomaterijale (Landsiedel i sar. 2009).

Pozitivan rezultat Amesovog testa jeste potvrda genotoksičnosti ispitivanog jedinjenja (u 90% slučajeva), ali negativan rezultat ne znači da to jedinjenje nije genotoksično za ćelije sisara. Zbog toga je neophodno upotrebiti nekoliko testova, pre donošenja zaključka (Torabinejad i sar. 1995).

Ames-ov test se izvodi na prokariotičnim ćelijama, a mikronukleusni i komet test na eukariotičnim ćelijama (najčešće se koriste ćelije hematopoetskog sistema, kao što su periferni limfociti i eritrociti).

Mikronukleusni test je često korišćen test za detekciju hromozomskih aberacija. Ovaj test prati pojavu mikronukleusa tokom metafaze. Mikronukleus može nastati od celog hromozoma ili dela prekinutog hromozoma koji se nisu ugradili u jedro ćelija. Mikronukleusi se detektuju fluorescentnom bojom u neposrednoj blizini glavnog jedra ćelije (Tucker i sar. 1996) (Slika 3).



Slika 3. Pojava mikronukleusa.

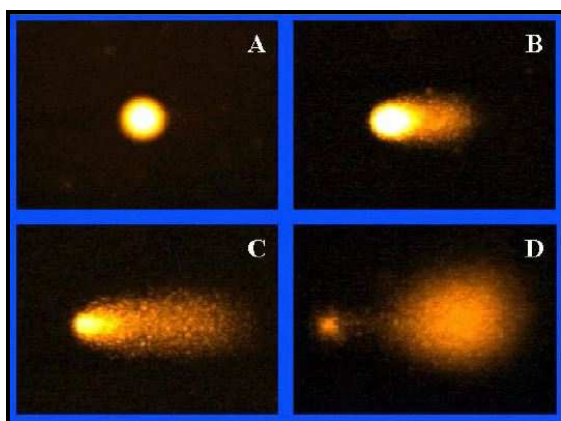
Camargo i sar. (2009) su ispitivali citotoksičnost i genotoksičnost kalcijum hidroksida, MTA i eksperimentalnog cementa COB (castor bean polyurethane cement). Ispitivanje genotoksičnog potencijala ovih materijala za direktno prekrivanje pulpe je rađeno na fibroblastima kineskog hrčka (V79), mikronukleusnim testom. Rezultati su pokazali da nije uočen porast broja mikronukleusa u ćelijskoj kulturu V79 u odnosu na pozitivnu kontrolu. Ovim istraživanjem je dokazano da COB i MTA ne utiču na ćelijski ciklus u ćelijama sisara. Takođe su i istraživanja Laurent-a i About-a dokazala da MTA i materijali na bazi trikalcijum silikata imaju sličan broj limfocita sa mikronukleusima kao i negativna kontrola (oko 4%), bez obzira na povećanje koncentracija materijala u medijumu. Pozitivna kontrola je pokazala da 16% limfocita ima mikronukleuse. Ova studija je potvrdila da MTA i slični kalcijum silikatni cementi ne deluju toksično (About i sar. 2005, Laurent i sar. 2008). Ispitivanja genotoksičnosti biokeramičkih materijala (bioglas i hidroksiapatit) su pokazala da ovi materijali ne narušavaju hromozomsku arhitekturu u limfocitima, odnosno da su ovi nalazi uporedivi sa negativnom kontrolom (netretiranim ćelijama). Zato se ovi materijali smatraju pogodnim zamenicama kosti (Arun i sar. 2011).

Iz literaturnih podataka se može uočiti da je, za ispitivanje genotoksičnog potencijala nanomaterijala, mikronukleusni test drugi najčešće korišćeni test. Prvi je Komet test (Landsiedel i sar. 2009).

Komet test (single cell gel electrophoresis - SCGE) je senzitivna i brza tehnika za kvantifikaciju i analizu DNK oštećenja u pojedinačnim eukariotskim ćelijama. Švedski istraživači Östling & Johansson su 1984. godine razvili ovu tehniku, a Singh i autori su je kasnije modifikovali kao alkalnu verziju Komet testa, 1988. godine. Poslednje smernice za izvođenje ovog testa dao je Tice sa sar. 2000. godine (Tice i sar. 2000).

Osnovni princip Komet testa je migracija fragmenata oštećene DNK kroz agarozni matriks prilikom elektroforeze. Kad se posmatraju pod mikroskopom, ćelije imaju izgled komete sa glavom (to je regija nukleusa) i repom koji sadrži

fragmente DNK ili pokidane lance koji migriraju ka anodi. Komet test se koristi za otkrivanje oštećenja DNK molekula nastalih zbog jednostrukih i dvostrukih prekida, alkalno labilnih mesta, oksidativno baznih oštećenja i unakrsnog preplitanja DNK-DNK/DNK- protein (Collins 2004, Baraba i sar. 2011) (Slika 4).



Slika 4. Klasifikacija kometa: A. Nema oštećenja, <5%; B. Srednje oštećenje, 20-40%; C. Visok stepen oštećenja, 40-95%; D. Totalno oštećenje, >95% (Radaković i sar. 2011)

To je često korišćen test za ispitivanje genotoksičnog potencijala dentalnih materijala.

Baraba i sar. (2011) su ispitivali genotoksični potencijal endodontskih cemenata na bazi smole (Epiphani i RealSeal) pre i posle polimerizacije. Komet test je pokazao da oba cementa izazivaju genotoksična oštećenja na humanim limfocitima.

Nano-čestice srebra (AG-np) su danas veoma popularne zbog svog širokog spektra antimikrobne aktivnosti, pa se i koriste u različitim terapijskim aplikacijama. Ipak, neka istraživanja ukazuju da ove čestice, veličine od 6-20 nm, dovode do oštećenja mitohondrija, povećanja oksidativnog stresa, što dovodi do povećanog oštećenja DNK (što je potvrdio Komet i mikronukleusni test) (AshaRani i sar. 2009).

Brojni istraživači su ispitivali genotoksični potencijal mineral triksid agregata i njemu sličnih trikalcijum silikatnih cemenata i dobili negativne rezultate, odnosno utvrdili su da ovi materijali ne dovode do promena na lancu

DNK, što potvrđuje njihovu biokompatibilnost (About i sar. 2005, Laurent i sar. 2008, Ding i sar. 2010, Zeferino i sar. 2010).

2.5.2. Testovi *in vivo*

Iako *in vitro* sistemi pružaju važne fundamentalne informacije o određenim elementima ćelijskih i molekularnih interakcija sa biomaterijalima, oni ne mogu da zamene *in vivo* oglede. Naučni radovi o reakcijama tkiva na implantate zahtevaju metodologiju koja će moći da izvrši merenje na molekularnom, ćelijskom i tkivnom nivou. Pored toga vreme je jedan od bitnih faktora. Dinamička priroda interakcija između tkiva i implantata nalaže da se krajnja procena kompatibilnosti materijala izvrši u zadatom vremenskom roku (Raković i sar. 2010).

Reakcija tkiva na implant je kumulativna patofiziološka posledica: a) zarastanja akutne povrede nastale zbog hirurške rane i prisustva implanta, b) eventualne hronične upale, c) obnavljanja okolnog tkiva dok se adaptira na implant.

Eksperimentalne životinje danas se upotrebljavaju u svim temeljnim istraživanjima biomedicinskih nauka kao osnova svih kliničkih disciplina u medicini, stomatologiji, veterini i farmaciji (Švajhler i sar. 1997).

Gotovo da nema životinjske vrste i podvrste na kojoj se nije obavljalo neko naučno istraživanje, ipak u konvencionalne laboratorijske vrste ubrajaju se i za to uzgajaju miševi (Keleştemur i sar. 2012, Troyer 2013), pacovi (McNamara i sar. 2010), zamorci (Torabinejad i sar. 1995, 1998, Saidon i sar. 2003), hrčci, kunići od glodara (Torreira i sar. 2004, El-Backly i sar. 2008), zatim psi (Noetzel i sar. 2006, Holland i sar. 2007), svinje (Jean i sar. 1988, Guigand i sar. 1997) i šimpanze od većih sisara (Brännström 1981). Eksperimenti na životinjama nezaobilazni su deo postupka pre kliničke procene i primene materijala.

Osnovni kriterijum u odabiru mesta ugradnje u životinjskom modelu je njegova sličnost sa mestom u ljudskom organizmu na kome će se primeniti testirani materijal. U odabiru mesta za implantaciju moraju se uzeti u obzir:

- vaskularizovanost
- karakteristike parenhimatoznih/matičnih ćelija (njihova sposobnost mitoze i migracije)
- prisustvo regulatornih ćelija (makrofaga)
- efekat mehaničkog pritiska na ponašanje parenhimatoznih ćelija (Raković i sar. 2010).

Potkožna tkiva su čest izbor za procenu biokompatibilnosti ugrađenih materijala. Ovo su relativno pristupačna mesta koja omogućavaju uopštenu procenu bioloških reakcija na biomaterijale. Ovim pristupom se lako mogu otkriti upalne reakcije tkiva na agense iz implantiranog materijala. Gustina fibrozne kapsule oko implantata, koji je smešten ispod kože, koristi se kao mera biokompatibilnosti biomaterijala već preko 30 godina (Raković i sar. 2010). Lokalne reakcije na ugrađeni implantat se mogu kvantitativno i kvalitativno proceniti uz pomoć nekoliko metoda u zavisnosti od svrhe eksperimenta. Histologija, histochemija, skening elektronska mikroskopija (SEM), transmisiona elektro mikroskopija (TEM) su metode koje se koriste za utvrđivanje morfoloških osobina materijala i okolnog tkiva na ćelijskom, molekularnom i tkivnom nivou. Histologija je najčešći metod za proučavanje kompatibilnosti tkiva na ugrađeni materijal, a debljina fibrozne kapsule oko implanta je najčešći pokazatelj koji se koristi za utvrđivanje reakcije tkiva na biomaterijal (Sumer i sar. 2006, Scarparo i sar. 2010, Parirokh i sar. 2011, Silva-Herzog i sar. 2011, Gomes-Filho i sar. 2012).

2.5.3. Ispitivanje biokompatibilnosti mineral trioksid agregata i hidroksiapatita

Mineral trioksid agregat (MTA) je razvijen na Loma Linda Univerzitetu kao patent Torabinejad-a i White-a iz 1995. godine (Camilleri i Pitt Ford 2006). Inicijalno bila je patentirana samo siva verzija cementa (GMTA), a kasnije se na tržištu pojavio i u beloj varijanti (WMTA). Osnovni sastojci mineral trioksid agregata su kalcijum oksid i silikon dioksid. Ove dve komponente čine 70 do 95% cementa. Njihovim mešanjem nastaju trikalcijum silikat, dikalcijum silikat, trikalcijum aluminat i tetrakalcijum aluminoforit. Dodavanjem vode dolazi do hidratacije cementa odn. nastaje silikatni hidrogel. Cementu je dodat bizmut oksid kao rendgen kontrastno sredstvo, što je po nalazima autora skoro jedina promena u odnosu na sastav Portland cementa (Camilleri i sar. 2005, Asgary i sar. 2008, 2009, Coleman i sar. 2008). MTA ima pH 10.2 neposredno posle mešanja, a tri sata kasnije on raste na 12.5 (Camilleri i sar. 2005).

Biokompatibilnost MTA je ispitivana na mnogo načina, od ekspresije ćelijskog rasta, do subkutanih i intraosealnih implantacija i direktnog kontakta sa zubnim tkivima *in vivo*.

Torabinejad i sar. su ispitivali citotoksičnost četiri materijala za zatvaranje vrha korena, i to amalgam, Super EBA, IRM i MTA (Torabinejad i sar. 1995). Za ova istraživanja koristili su Agar Overlay test i metod oslobađanja radioaktivnog hroma. Dokazali su da je zona lize oko sveže zamešanog amalgama i Super EBA bila značajno veća nego kod vezanih materijala, nasuprot tome nije bilo statistički značajne razlike između zone lize oko svežeg ili vezanog MTA. Sveže zamešan MTA je pokazao statistički značajno manju toksičnost nego drugi testirani materijali posle 24 sata od inkubacije sa obeleženim ⁵¹Cr na L929 ćelijama.

Ispitujući osnovne metaboličke ćelijske odgovore gingivalnih fibroblasta izloženih MTA i amalgamu, Pistorius i sar. (2003) su istakli, da su uočene povećane vrednosti prostaglandina (PGE₂) u prisustvu MTA što ukazuje na

sposobnost ćelijske regeneracije i na stimulaciju rasta. Međutim, kontakt amalgama sa gingivalnim fibroblastima doveo je do smanjenja sinteze PGE₂. S obzirom na činjenicu da prostaglandini igraju važnu ulogu tokom inflamatornih procesa i smatraju se neophodnim za procese ćelijske regeneracije, proliferacije i rasta, autori sugerišu da on nije materijal izbora za zatvaranje vrha korena posle hirurških zahvata.

Ribeiro i sar. (2005a, 2005b) testirajući oba dostupna varijeteta MTA (sivi i beli) na ćelijama mišjeg limfoma (L5178Y), ne nalaze da bilo koja testirana koncentracija materijala dovodi do odumiranja ćelija bojenih tripan blue bojom. U prilog dobroj biokompatibilnosti MTA idu i nalazi Koulaouzidou-a i sar. (2008) koji su upoređivali dva bela MTA (Pro Root i Angelus) sa Super EBA cementom (modifikovani ZOE cement) i Vitrabond (smolom ojačan GJC), i koji su utvrdili statistički značajno niži citotoksični efekat MTA u odnosu na druge testirane cemente. Obe varijante belog MTA su pokazivale slab inhibitorni efekat na vitalitet ćelija pulpe pacova kao i na humane fibroblaste koristeći testove za praćenje aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze (XTT test).

Mitchell i sar. (1999) su u svojim istraživanjima pokazali da ćelije humanog osteosarkoma (MG63) rastu preko MTA i vide se kao pločaste strukture do 50 µm u prečniku, koje su izgubile svoju zvezdastu strukturu i postale kontinuirane u nizu. Takođe, potvrdili su ekspresiju citokina i medijatora koji su bitni za interakciju između osteoblasta i osteoklasta (IL-1α, IL-6, IL-8, M-CSF) u uzorcima sa MTA, u odnosu na Dycal (kalcijum hidroksidni lajner). Ćelijska linija MG63 pokazala je 100% stepen preživljavanja nakon kontakta sa eluatom MTA i cemenata na bazi kalcijum silikata posle 3 dana. Ćelijska vijabilnost je ispitivana MTT testom, a testom precipitacije DNK je potvrđeno da ni MTA ni CS cement nisu doveli do oštećenja/prekida lanaca DNK (Ding i sar. 2010). Ovakvi nalazi MTT testa je potvrdilo i istraživanje Modareszadeh i sar. (2011).

Praćenjem citotoksičnosti i želatinozne aktivnosti matriksne metaloproteinaze (MMP) na fibroblastima posle stimulacije MTA-om, kalcijum

hidroksidom i novim endodontskim cementom na bazi kalcijum aluminata (Endo Binder) bavili su se Silva i sar. Matriksne metaloproteinaze su važni enzimi odgovorni za degradaciju ekstracelularnog matriksa kolagena. Posebno su interesantni MMP-2 i MMP-9 zato što igraju važnu ulogu u patogenezi hroničnih inflamatornih procesa u pulpi ili peripikalnom tkivu. Ova studija je pokazala da fibroblasti proizvode MMP-2 posle kontakta sa svim endodontskim materijalima, a upadljivo najviše fibroblasti koji su tretirane kalcijum hidroksidom. MMP-9 nisu detektovani u ovom istraživanju. U prilog njihovoj biokompatibilnosti idu i nalazi MTT testa, gde nije bilo statistički značajne razlike između ćelijske vitalnosti grupe MTA i kontrolne grupe, dok je kalcijum hidroksid imao najmanje ćelijsko preživljavanje od ova tri testirana materijala (Silva i sar. 2012).

Postoji više studija rađenih na različitim ćelijskim linijama (ćelije mišjeg limfoma, ćel. jajnika kineskog hrčka, humani limfociti) i sve su dale negativne podatke o genotoksičnom potencijalu mineral trioksid agregata. Testirani uzorci u rastućoj koncentraciji od 1 do 1000 µg/mL nisu doveli do prekida lanaca DNK, što je utvrđeno Komet testom (Da Silva i sar. 2006, Ribeiro i sar. 2005, 2006a, 2006b, Braz i sar. 2006, Roberts i sar. 2008).

Subkutane i intraosealne implantacije materijala u animalni model omogućilo je histološko ocenjivanje reakcije tkiva na MTA. Sumer i sar. (2006), Lotfi i sar. (2009), Parirokh i sar. (2011), i mnogi drugi istraživači ukazuju da MTA u ranim fazama (7 i 15 dana) izaziva veoma ozbiljnu tkivnu reakciju/zapaljensku reakciju na mestu implantacije u odnosu na kontrolnu grupu, često i sa nekrozom i distrofičnom kalcifikacijom (Camilleri i Pitt Ford, 2006). Ovaj inicijalno jako izražena zapaljenska reakcija, opada posle 30 i 60 dana opservacionog perioda, kada se uočava i tanka fibrozna kapsula kao znak tkivne tolerancije (Parirokh i sar. 2011).

Osim praćenja lokalne reakcije tkiva na subkutanu implantaciju MTA i BioAgregata (novi keramički materijal) u teflonskim tubicama, Khalil i Eid (2013) su pratili sistemske efekte ovih biomaterijala. Histološki su posmatrali

stanje jetre i bubrega 7 i 30 dana posle implantacije, kao i biohemijske parametre (AST, ALT, ureu, kreatinin). Našli su kod oba materijala povećanje zapaljenskog infiltrata u organima, vakuolizaciju hepatocita, malformaciju bubrežnih glomerula i druge promene. Takođe su uočili povećane vrednosti svih biohemijskih parametara iz seruma i to značajnije kod MTA. Ovo je prva studija koja je testirala biokompatibilnost dentalnih materijala na ovaj način.

Da Silva i sar. (2011) su za zatvaranje furkacionih perforacija poredili MTA, ZOE cement i Endo-CPM cement i utvrdili da MTA i njemu slični cementi imaju bolja biološka svojstva u poređenju sa ZOE cementima. Pri tome je analizirao različite morfološke parametre: numerički brojnost zapaljenskih ćelija u periodontalnom ligamentu, dubinu periodontalnog prostora, broj osteoklasta na površini alveolarne kosti i dr.

Reakcije tkiva posle intraosealne implantacije MTA su manje intenzivne nego u subkutanom tkivu (Camilleri 2006). Implantacija MTA u tibiju i mandibulu na animalnim modelima nije izazvala zapaljensku reakciju, a dokazan je i osteogeni potencijal MTA (Torabinejad i sar 1995a, 1998, Sousa i sar. 2004). Ovi nalazi su ohrabrujući ali istraživanja o mehanizmu delovanja ovog bioaktivnog materijala se nastavljaju.

I drugi bioaktivni materijali, posebno iz grupe kalcijum fosfatne keramike imaju sve šire polje indikacija u medicini i stomatologiji. Najpopularniji predstavnik ovih bioaktivnih materijala je hidroksiapatit (HA). On se široko primenjuje u koštanoj rekonstrukciji zbog svoje slične hemijske strukture sa neorganskom komponentom kostiju. Nasuprot inertnim materijalima, hidroksiapatit razvija direktnu, adherentnu i jaku vezu sa tkivima. Ovo svojstvo se zove bioaktivnost, a karakteriše se sposobnošću stvaranja karbonat-hidroksiapatitnog sloja na površini materijala u kontaktu sa tkivnim fluidima. Ovaj sloj stimuliše koštane produktivne ćelije (osteoblaste) na diferencijaciju i proizvodnju koštanog matriksa na površini novoformiranog apatita (Theiszova i sar. 2005).

Podaci iz literature ukazuju da je HA kao kalcijum fosfatna biokeramika biokompatibilan materijal koji ne poseduje citotoksična svojstva. To su potvrdila i istraživanja Mitchell-a i sar. koji su testirali HA (Interpore 200, u obliku poroznog bloka) i bioaktivno staklo keramiku (Biogran, granulirani materijal sa česticama od 350 μm) na ćelijama humanoga osteosarkoma (MG63). Prateći uzorke, posle 2, 4 i 7 dana utvrdili su da zdrave, pločaste ćelije prekrivaju više od 50% površine materijala (Mitchell i sar. 1999).

Rajab i sar. (2004) testirajući citotoksičnost HA na mišjim fibroblastima (L929), MTT testom, posle inkubacije od 72 sata sa maksimalnim koncentracijama, nalaze da je vitalnost ćelija između 75 i 87%. Takođe su, koristeći Komet test konstatovali da HA pokazuje veoma slab genotoksični efekat sa svega 15 - 27 % ćelija sa oštećenjem DNK u odnosu na kontrolu, gde je 67.5% ćelija imalo oštećenje DNK molekula. Zaključili su da hidroksiapatit pokazuje dobru biokompatibilnost na fibroblastima miša.

Nešto drugačije rezultate iznosi Theiszova i sar. (2005) koji su testirajući HA (dobijen sol-gel procesom) MTT testom, dobili da visoke koncentracije (100%) dovode do inhibicije ćelijskog rasta i do 66.3%, dok niže konc. 1% dovode do inhibicije samo 12.3%. Takođe, najviše koncentracije imaju citolitičan efekat (indirektan test ćelijskog rasta). Jantova i sar. (2008) su poredili tri bioaktivne keramike hidroksiapatit, fluorapatit i fluor-hidroksiapatit. Ona smatra da ovi materijali ispoljavaju različite antiproliferativne efekte, gde je HA najniže rangiran, a fluorapatit ima najviše štetnih efekata. Komparativnim studijama na fibroblastima murine (glodar iz porodice miševa - NIH-3T3) i na fibroblastima hrčka (V79) su uočili da biomaterijali sa fluoridima (FHA i FA) imaju višu citotoksičnost nego hidroksiapatit. Verovatno zato što su fluoridi supstance sa značajnom biološkom aktivnošću. Genotoksični testovi su pokazali različite rezultate. Dok je Komet test utvrdio porast oštećenja DNK rastući prema redu HA<FHA<FA, gde je genotoksični efekat je rastao sa porastom koncentracija, dotle je Ames-ov i Hpvt test utvrdio da ovi materijali nisu doveli do genskih mutacija na bakterijama.

Razvoj naprednih zamenika kosti u koje su integrisane različite biokeramike ili drugi biokompatibilni materijali sa biokeramičkim komponentama je polje biomedicine od kog se mnogo očekuje i koje se stalno istražuje. Arun i sar. (2011) su ispitivali HA-bioglas kompozit i HA-etil vinil acetat da bi utvrdili da li dovode do hromozomskih aberacija na ljudskim limfocitima iz periferne krvi. Zaključili su da je hromozomska arhitektura limfocita tretiranih ovim HA biomaterijalima manje, više normalna sa blagim stepenom hromozomskih aberacija, gotovo uporedivo sa negativnom kontrolom. Na osnovu toga smatraju da su ovi materijali nemutageni, što ide u prilog njihovoj biokompatibilnosti.

Novi endodontski cement baziran na hidroksiapatitu (43%), tetrakalcijum fosfatu (43%) i poliakrilnoj kiselini (9%) koji su ispitivali Chen i sar. (2013) takođe je potvrdio ćelijsku kompatibilnost (MTT i kristal violet testom) ovog biokeramičkog materijala, što pripisuju njegovom slabo neutralnom pH (6.14 - 8.28) i hidroksiapatitnoj kompoziciji koja je gotovo identična onoj u zubima i kostima.

2.6. BIOMATERIJALI - BUDUĆNOST I PERSPEKTIVE

U poslednjoj deceniji uočena je ekspanzija u sintezi inovativnih eksperimentalnih endodontskih materijala, sa ciljem da se dobije što biokompatibilniji i bioaktivniji materijal, ali sa optimalnim karakteristikama za manipulaciju. Mnogi od njih su nastali kao posledica uočenih nedostataka MTA (radno vreme od svega par minuta, dugo vreme vezivanja, cementna mešavina je zrnasta i peskasta) i ne čudi što imaju sličan sastav kao MTA ili Portland cement sa dodacima koji ga unapređuju (Okiji i sar. 2009).

U Americi je patentirana nova verzija nano MTA (US Patent application No13/211.880) sa kraćim vremenom vezivanja, sa smanjenom veličinom čestica i prihvatljivom otpornošću na kiselu sredinu, što je postignuto dodavanjem

manje količine stroncijuma, a nije uticalo na njegova fizička svojstva (Saghiri i sar. 2012).

Kao novi biokeramički materijal za direktno prekrivanje pulpe predstavljen je Biodentin (Septodont, Saint Maur des Fosses, France). Ovaj materijal je pobudio interesovanje i kao materijal za nadoknadu dentina i za upotrebu u endodontskim indikacijama. Za razliku od MTA kao rendgen kontrastno sredstvo dodat mu je cirkonijum oksid (Grech i sar. 2013), a slično MTA-u ima teških metala u tragovima (Han i Okiji 2013). Ovaj materijal podstiče diferencijaciju pulpnih ćelija i biomineralizaciju *in vitro*, što ukazuje na njegovu sposobnost da stimuliše reparativnu dentinogenezu posle direktnog prekrivanja pulpe (Laurent i sar. 2012).

Još jedan novi cement na bazi trikalcijum silikata pojavio se na tržištu registrovan kao Bioaggregate (Verio Dental Co. Ltd. Vancouver, Canada) koji sadrži oko 41% trikalcijum silikata ali nema aluminijum oksida. Kao rendgen kontrastno sredstvo korišćen je tantal oksid nasuprot bizmut oksidu u MTA-u. Oslobađanje kalcijum hidroksida mu daje bioaktivnost i biokompatibilnost, ali produženo vreme vezivanja smanjuje dimenzionalnu stabilnost ovog cementa (Grech i sar. 2013).

Camilleri i sar. su predstavili novi materijal MTA Plus (Avalon Biomed Inc. Bradenton, FL, USA) sa sličnom kompozicijom kao MTA ProRoot i MTA Angelus, ali sa boljom strukturom praškaste komponente (finije veličine čestica). Ovaj materijal se isporučuje u ampulama za miksiranje sa gelom ili vodom. Vreme vezivanja je 128 min i zavisilo je od uslova okoline. Autori su istakli da vlažna sredina usporava vreme vezivanja, kao i da je prisustvo fosfata i glukoze u eksperimentalnom medijumu dovelo do usporavanja reakcije vezivanja. Smatraju da je usporavanje posledica stvaranja nerastvorljivih kalcijum fosfata, u alkalnom rastvoru, koji su stvorili omotač oko čestica cementa i usporili reakciju hidratacije (Camilleri i sar. 2013).

Bilo je pokušaja da se oponaša dentinogeneza upotrebom bioaktivnih molekula kao što je amelogenin za direktno prekrivanje pulpe. Frakcija

obogaćena amelogeninom je derivat glednog matriksa minijaturnih svinja, nazvana Emdogain Gel (EMDgel, Biora AB, Malmö, Sweden) i korišćena je kao materijal za direktno prekrivanje na humanim zubima. Posle 12 nedelja uočeno je formiranje reparatornog dentina, kao i ekspresija dentin sijaloproteina (DSP) i kolagena I (Col I) koji su specifični markeri za dentin i diferencijaciju odontoblasta (Fransson i sar. 2011).

Sadašnji sintetski biomaterijali (često prvenstveno razvijeni za neke druge inženjerske aplikacije, a tek posle primenjeni u terapijskim procedurama) često se ne integriraju dobro u tkivu domaćina, Zbog toga nastaju infekcije, imunološki odgovori na strano telo i odbacivanje ili gubitak implantiranog materijala. Kako implantacije postojećih biomaterijala imaju nepredvidiv ishod, po mišljenju Saiz-a, poslednjih godina se pažnja poklanja alternativnim rešenjima, pre svega *tkivnom inženjeringu*, sa ciljem razvoja novih kalcifikovanih tkiva koja će zameniti oštećena ili obolela tkiva (Saiz i sar. 2013). Kritična komponenta u ovom pristupu tkivnom inženjeringu je razvoj poroznog trodimenzionalnog **skafolada**.

Razvoj novih skafolda pogodnih za *regenerativnu endodonciju* je važno novo polje u istraživanjima dentalnih materijala. Prvi korak je da se naprave skafoldi sa fizičkim i mehaničkim svojstvima pogodnim za kliničku upotrebu, a drugi je utvrđivanje i razumevanje njihove sposobnosti da podrže punu diferencijaciju odontoblasta koja će se meriti depozicijom novog tubularnog dentina (Cavalcanti i sar. 2013). Skafold bi trebao da obezbedi podršku ćelijama u procesima diferencijacije i da promoviše i podržava tkivnu regeneraciju (Saiz i sar. 2013). Da bi ispunio ove zadatke skafold mora biti pažljivo dizajniran sa unutrašnjom površinom koja će promovisati vezivanje ćelija i voditi ćelijsku diferencijaciju, dok će spoljašnja površina obezbeđivati integraciju sa okolnim tkivom, koja će sprečiti odbacivanje ili pomeranje skafolda. Vezivanje skafolda i njegova integracija sa okolnim tkivom je problem koji se još uvek intenzivno istražuje (Saiz i sar. 2013).

Otkriće stem ćelija dentalne pulpe (DPSCs) je značajno pomoglo i unapredilo istraživanja na polju regenerativne endodoncije. Pulpne stem ćelije imaju specifičnu subpopulaciju progenitornih ćelija, koje su potpuno sposobne za obnavljanje zubnih tkiva. Ove ćelije se mogu diferencirati u dve vrste ćelija: odontoblaste sposobne za produkciju dentina i u vaskularne endotelijalne ćelije, jer je vaskularizacija ključni faktor u regeneraciji pulpo-dentinsko kompleksa (Cavalcanti i sar. 2013).

Današnja klinička endodoncija koristi različite procedure, koje se zasnivaju na sposobnosti stem ćelija da izvrše reparaciju, kao što su direktno prekrivanje pulpe, apeksogeneza, apeksifikacija i čak regeneracija pulpe. Razvijaju se dve glavne strategije istraživanja koje uključuju stem ćelije za reparaciju i/ili regeneraciju oštećenih tkiva i) acelularni pristup sa *in situ* stimulacijom i modeliranjem aktivnosti stem ćelija (Suzuki i sar. 2011, Leprince i sar. 2012), ii) celularni pristup koji koristi *ex vivo* ćelijske kulture i koristi stem ćelije za tkivni inženjering (Murray i sar. 2007).

Pre nego što ovaj regenerativni pristup postane rutinski tretman u endodonciji, potrebno je rešiti i razumeti neke ključne probleme, kao što su interakcija između stem ćelija pulpe i trodimenzionalnog skafolda koji će podstaći ćelijsku adheziju i proliferaciju i stopiti se sa mikrookruženjem.

Mnogi materijali su ispitivani kao potencijalni koštani skafoldi za reparaciju tkiva. Pre svega porozne keramike, polimeri, metalni materijali, a danas i organsko-neorganske kompozicije, kao što su kombinacije resorptivnih polimera sa hidroksiapatitom, trikalcijum fosfatom, bioaktivnim staklom i staklo-keramikama (Stylios i sar. 2007). Wahl i sar. su upoređivali bioaktivnost različitih formulacija kolagen/HA skafolda kroz niz *in vitro* i *in vivo* eksperimenata i utvrdili da su pogodni za aplikacije u tkivnom inženjeringu jer podstiču diferencijaciju osteoblasta i formiranje mineralizovanog tkiva (Wahl i sar. 2006). Ideja regenerativne endodoncije navela je «tkivne konstruktore» da zaseju subkulturu ćelija izolovanih iz dentalne pulpe na HA/TCP skafold i transplantiraju ga na otvorenu pulpu minijaturnih svinja. Posle šest nedelja

uočili su formiranje dentinskog mosta (tubularne i atubularne strukture) u svim uzorcima. Zaključili su, takođe, da je konstitutivni odnos HA/TCP od 2:8 pokazao najveći efekat na mezenhimalne stem ćelije i indukciju stvaranja dentina (Ando i sar. 2009).

Chen i sar. su razvili hibridni cement gde su kalcijum silikatnom cementu dodali želatin i hitosan. Prirodni polimeri želatina su već korišćeni kao skafoldi u tkivnom inženjeringu i imaju dokazanu biokompatibilnost i netoksičnost, a u istraživanjima Chen-a je istaknuto da ne utiču na fizičko-hemijska svojstva CS cemenata. S druge strane, hitosan koji se ugrađuje u biokeramičke materijale može da poboljša njihova biološka svojstva, ali u ovom istraživanju je ubrzao degradaciju CS cementa (Chen i sar. 2010).

Cavalcanti je predstavio skafold razvijen za tkivnu regeneraciju dentalne pulpe (Puramatrix) u injekcionom obliku. Autor smatra da je ovo veoma prikladan način aplikovanja skafolda u specifičan prostor kakav je kavum dentis, u odnosu na čvrste ili ukalupljene skafolde. Takođe, dokazao je da stem ćelije dentalne pulpe mogu da prežive i da se proliferišu u 3D Puramatrix-u što ohrabruje dalje razvijanje sličnih skafolda za terapiju stem ćelijama unutar kanala korena (Calvacanti i sar. 2013).

U okviru analize naučne problematike postavljena je **radna hipoteza**:

- Nanomaterijali na bazi aktivnih silikatnih sistema, sami ili u kombinaciji sa hidroksiapatitom, ne ispoljavaju toksična svojstva i štetne efekte na ćelije živog tkiva.
- Nanomaterijali na bazi aktivnih silikatnih sistema i hidroksiapatita imaju povoljan efekat na odbrambene ćelije pulpnog tkiva i podstiču reparaciju oštećenog tkiva.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Za potrebe naučnog ispitivanja definisan je osnovni **cilj istraživanja doktorske disertacije**:

Ispitivanje biokompatibilnosti i biofunktionalnosti novosintetisanih nanomaterijala na bazi kalcijum silikatnih sistema i hidroksiapatita u *in vitro* i *in vivo* uslovima.

Za postizanje postavljenog cilja istraživanja, definisani su sledeći istraživački zadaci:

1. Ispitati biokompatibilnost novosintetisanog nanomaterijala na bazi kalcijum silikatnih sistema (mešavina trikalcijum i dikalcijum silikata - CS) u *in vitro* uslovima primenom Komet testa (single cell gel assay) na humanim limfocitima iz periferne krvi.
2. Ispitati biokompatibilnost novosintetisanog nanomaterijala na bazi kalcijum silikatnih sistema i hidroksiapatita (CS-HA) u *in vitro* uslovima primenom Komet testa (single cell gel assay) na humanim limfocitima iz periferne krvi.
3. Ispitati biokompatibilnost novosintetisanog nanomaterijala na bazi kalcijum silikatnih sistema (mešavina trikalcijum i dikalcijum silikata - CS) u *in vivo* uslovima na eksperimentalnim životinjama, implantacijom materijala u potkožno tkivo pacova.
4. Ispitati biokompatibilnost novosintetisanog nanomaterijala na bazi kalcijum silikatnih sistema i hidroksiapatita (CS-HA) u *in vivo* uslovima na eksperimentalnim životinjama, implantacijom materijala u potkožno tkivo pacova.
5. Proveriti biokompatibilnost novosintetisanog nanomaterijala na bazi kalcijum silikatnih sistema (mešavina trikalcijum i dikalcijum silikata - CS) nakon direktnog prekrivanja eksponirane pulpe kunića (*in vivo* testovi).

6. Proveriti biokompatibilnost novosintetisanog nanomaterijala na bazi kalcijum silikatnih sistema i hidroksiapatita (CS-HA) nakon direktnog prekrivanja eksponirane pulpe kunića (*in vivo* testovi).

4. MATERIJAL I METODOLOGIJA

4.1. SINTEZA I METODE KARAKTERIZACIJE ZA DOBIJANJE NEORGANSKE FAZE

Za sintezu aktivnog silikatnog sistema prvo su sintetisane pojedinačne komponente: kalcijum silikatna faza $2\beta\text{-CaSiO}_4$ ($\beta\text{-C}_2\text{S}$) i Ca_3SiO_5 (C_3S), kalcijum karbonat (CaCO_3).

Kalcijum silikatna faza je sintetisana korišćenjem $\text{CaCl}_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Nemačka), a silica sol je dobijen hidrotermalnim tretmanom. Stoihiometrijske količine $\text{CaCl}_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (35.59g), silika sola (15g 30% sol rastvora) i $\text{C}_2\text{S}:\text{C}_3\text{S}$ u odnosu 2:1 su korišćene da bi se dobila silikatna aktivna faza (40% sadržana u mešavini). Ovoj mešavini je dodato i 4.55g $\text{Al}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)$ da bi se obezbedilo dobijanje malih količina aktivne C_3A faze (3.01%). Kao oksidacioni agens, da bi započela reakcija sagorevanja, mešavini je dodato i 71.3g amonijum nitrata (NH_4NO_3) i 53.51g limunske kiseline ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{CH}_2\text{O}$) koja je služila kao gorivo u toku reakcije sagorevanja. Nakom sušenja na temperaturi od 80°C radi dobijanja gela, svi uzorci su naknadno sušeni na temperaturi od 150°C da bi se odstranila sva voda između silika čestica. U sledećoj fazi, povećanje temperature na 180°C izazvalo je paljenje gela. Gel se postepeno pretvarao u penu da bi na kraju došlo do snažne samošireće reakcije sagorevanja uz oslobađanje velike količine gasova. Brzo oslobađanje velike količine gasnih produkata tokom sagorevanja dovelo je do rasipanja toplote sagorevanja i granice rasta temperature, čime je smanjena mogućnost rane, parcijalne sinteze primarnih čestica, što je važno za održavanje finalne aktivnosti mešavine. Nakon tako visoke temperature i samošireće reakcije, uzorci su brzo sušeni pomoću bakarnih ploča da bi se faza kristalizacije svela na minimum, a dobila visoka reaktivnost dobijenih $\beta\text{-C}_2\text{S}$ i C_3S faza. Oslobođeni crni prah sadržao je ostatke ugljenika i dalje je nastavljena njegova kalcifikacija na 650°C tokom 4

sata da bi se konačno dobio proizvod sa malom veličinom kristalita. Nakon ovog termalnog tretmana prah je dodatno mleven sa ciljem dobijanja silikatnih faza koje će se koristiti u finalnim mešavinama cementa.

Kalcijum hlorid tetrahidrat ($\text{CaCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$) (Sigma Aldriht, SAD) korišćen je kao prekursor u sintezi kalcijum karbonata. Količina od 5mmol $\text{CaCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ rastvorena je u 50 mmol etilen glikola (Sigma Aldriht, SAD) dejstvom ultrazvuka na 40 °C (Elmasonic S3OH). Potom je 10 mmol NaHCO_3 (Sigma Aldriht, SAD) dispergovano u 50 ml etilen glikola, kap po kap, tokom 30 minuta uz mehaničko mešanje. Dobijena disperzija je zagrevana 30 minuta na 40°C. Kalcijum karbonat je potom izdvojen iz mutnog rastvora centrifugiranjem (9000rpm, 30 min), ispran nekoliko puta u mešavini vode i etanola (1:4) i na kraju samo u vodi. Sulfonil dodecil sulfat (0.5 %) je dodat kao antiglomeraciono sredstvo. Dobijene nanočestice su potom izlagane dejstvu ultrazvuka 30 minuta, uz snažno mehaničko mešanje tokom 5 h. Dobijeni prah je nakon sušenja na 120 °C tokom 5 h, zagrevan na 500 °C jedan sat, kako bi se dobila kalcijum karbonatna faza.

Za pripremu **mešavine 1**, u ekperimentima označene kao **-CS-**, pored $\beta\text{-C}_2\text{S}$ i C_3S faza koje su činile 60 % ukupne količine mešavine, korišćene su i dodatne komponente i to kalcijum karbonat (CaCO_3) ili dehidrirani gips u količini 20% i BaSO_4 (Merck, Nemačka) takođe u količini od 20%, zbog rendgen kontrastnosti mešavine.

Kompozicija **mešavine 2**, u eksperimentima označene kao **-CS-HA-** bila je: 40% hidroksiapatit (dobijen hidrotermalnim metodama sinteze, V. Jokanović i sar. 2006. 2008), 20% mešavina C_2S i C_3S u odnosu 2:1, 20% kalcijum karbonat (CaCO_3) i 20% BaSO_4 (Merck, Nemačka).

Obe ove mešavine su nakon mlevenja, i bolje homogenizacije mešane sa vodom (voda:prah u odnosu 1:2) radi dobijanja cementne paste. Ove paste su potom sabijane nabijačem od nerđajućeg čelika u cilindrične polietilenske posude promera 10mm, a visine 15mm. Obe mešavine su ostavljene da se vezuju na temperaturi od 37°C (simulacija telesne temperature) tokom 28 dana i

analizirane su posle 1, 3, 7 i 28 dana. Vreme od početka do završetka vezivanja određeno je korišćenjem Vicant-ove igle u saglasnosti sa ASTM C191 standardima (Hsieh i sar. 2009). Ovi uzorci su potom korišćeni za merenje čvrstoće na pritisak i za analizu promena unutar inicijalnih faza pre i posle hidratacije, korišćenjem XRD analize (analiza difraktometrije rendgenskih zraka, Philips PW 1050, Almelo, Netherlands) sa Ni-filtriranim Cu-K $\alpha_{1,2}$ zračenjem. Obrasci su bili registrovani u rasponu 2θ 9-67° sa veličinom scening koraka od 0.02°. Morfologija i raspodela veličina aglomerata mlevenog praha posmatrana je skening elektronskim mikroskopom - SEM (JOEL, JSM-5300, Tokyo, Japan) pod vakuumom od 1.33×10^{-3} Pa i naponom od 20kV. EDS (Energy dispersive analysis) merenja su korišćena za praćenje hemijske homogenosti faza i odnosa Ca i Si u različitim delovima aktivne silikatne faze. Pritisna čvrstoća materijala je određena korišćenjem Instrom mašine (model 4204, Instrom Corp. Norwood, MA, USA). Za takvu vrstu merenja uzorci su prethodno pripremljeni poliranjem pomoću brusnog papira finoće 600 i 1200, na automatskoj mašini za poliranje, pod blagim mlazom vode i potom su osušeni apsorbujućim papirom.

4.2. ISPITIVANJE GENOTOKSIČNOG EFEKTA NOVOSINTETISANIH KALCIJUM SILIKATNIH SISTEMA, HIDROKSIAPATITA I NJIHOVE MEŠAVINE: *in vitro* STUDIJA

Prvi nivo istraživanja obavljen je na Institutu za biologiju, Veterinarskog Fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Katedri za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Laboratorijska *in vitro* studija uključivala je istraživanje biološkog odgovora humanih limfocita iz periferne krvi na testirane materijale na osnovu preporuke međunarodnog standarda ISO/DIS 10993-3 (Test for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity).

4.2.1. Testiranje genotoksičnosti

Testirani materijali bili su kalcijum silikatni sistem (CS - β -C₂S i C₃S faza) i hidroksiapatit (HA- dobijen primenom hidrotermalnih metoda sinteze), kao i njihova mešavina u odnosu 66-34% (CS- HA). Oba materijala su sintetisana po metodologiji dr V. Jokanovića i saradnika (Institut nuklearnih nauka Vinča).

4.2.1.1. Ispitanici

U studiju je bilo uključeno pet zdravih muških donora, prosečne starosti 23 godine. Svi su bili intervjuisani o životnim navikama i iz istraživanja su isključeni pušači, osobe koje su konzumirale alkohol ili koristile neke lekove, osobe izlagane rendgenskom snimanju u proteklih šest meseci, odnosno osobe koje su se intenzivno bavile sportom tokom prethodne nedelje. Svi davaoci krvi su upoznati sa svrhom istraživanja i dali su svoju pismenu saglasnost o učestvovanju u ovoj studiji. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta

Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (br.36/5 od 12.4.2012. godine).

4.2.1.2. Pripremanje ćelija

Od svakog donora je venskom punkcijom uzimano po 4 ml krvi. Heparizovani uzorci krvi (Sodium heparine, Galenika, Beograd, Srbija) su odmah pripremani za izolaciju limfocita po metodi Fenech-a (2000.) uz manje modifikacije.

Krv je razblažena sa 0.02% EDTA i RPMI medijumom. U dve epruvete sipano je po 2 ml rastvora (EDTA+RPMI), a zatim je dodato po 2 ml krvi direktno iz šprica. U dve nove epruvete je sipano po 3 ml Ficoll plaque gradienta (Amersham, Uppsala, Sweden) i pažljivo pipetom dodata razblažena krv, tako da se rastvori ne pomešaju. Epruvete su centrifugirane na 1900 rpm, 15 minuta. Supernatant je pokupljen i bačen, a prsten koji se formirao ispod njega (istaloženi limfociti) pažljivo je pokupljen. U dve nove epruvete je sipano po 1 ml prstena (limfocita) i dodato 7ml RPMI. Epruvete su centrifugirane na 1800 rpm 10 minuta. Supernatant je odliven, a na dnu su izolovane ćelije. Dva taloga su spojena u jednu epruvetu i dodato je 7 ml RPMI. Ponovo su centrifugirane na 1800 rpm 10 minuta i posle uklanjanja supernatanta, na dnu epruvete su ostale ćelije u 100 µl rastvora.

4.2.1.3. Ćelijska vijabilnost

Broj živih ćelija je određivan korišćenjem hemocitometra i boje tripan-blu. Za bojenje je korišćen 0.4% vodeni rastvor tripan-blu koji je mešan sa ćelijskom suspenzijom (40µl tripan-blu i 10µl ćelijske suspenzije). Smeša je stajala 5 minuta na sobnoj temperaturi, a nakon toga su izbrojane ćelije u hemocitometru i određivan procenat živih ćelija.

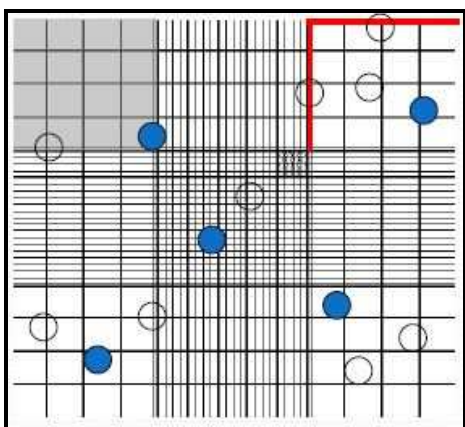
Tripan blue selektivno boji mrtva tkiva ili ćelije u plavo, dok su žive ćelije ili tkiva sa intaktnom ćelijskom membranom ostajale nebojene (Freshney 1987) (Slika 5).

Ćelije su posmatrane svetlosnim mikroskopom (Boeko, Hamburg, Germany) i njihov broj u 1 ml uzorka je izračunavan prema formuli $X \times 5 \times 10^4$.

X = ukupan broj izbrojanih živih ćelija podeljen sa brojem izbrojanih kvadrata

5 = razblaženje ćelija u boji

10^4 = površina pločice



Slika 5. *Tripan blue test.*

4.2.1.4. Određivanje genotoksičnog efekta nanomaterijala u humanim limfocitima

Za određivanje genotoksičnog efekta CS, CS-HA i HA testirane su različite koncentracije. Materijali su bili prethodno rastvoreni u PBS-u (fiziološki rastvor puferovan fosfatom). Tretirane ćelije su bile inkubirane 1 sat na 37°C u $5\% \text{CO}_2$. Posle tretmana ćelije su centrifugirane 5 min na 800rpm, a zatim isprane u PBS puferu. Netretirane ćelije su bile negativna kontrola, dok su ćelije tretirane sa *t*-butyl hydro peroxidom (*t*-BOOH, CAS No. 75-91-2, Sigma-Aldrich) bile pozitivna kontrola. Ćelije su tretirane 0.5 mmol/L *t*-BOOH-om 20 minuta na 4°C .

4.2.1.5. Komet test

Protokol koji je primenjen kod Komet testa (single cell gel electrophoresis) su opisali Singh i sar. (1988) i Tice i sar. (2000).

Pre eksperimenta očišćena (hrom-sumpornom kiselinom i etanolom) i posušena, predmetna stakla su potapana u 0,5% NMP (normal melting point) agarozu, obeležavana i sušena 24 sata na sobnoj temperaturi. U nastavku eksperimenta na pločice je nanošen prvi sloj 1% NMP, pokriven pokrovnim staklom i ostavljan na par minuta u frižider da se agaroz stegne. U 30 μ l ćelijske suspenzije dodato je 70 μ l 1% LMP (low melting point) agaroze i razliveno po pločicama na kojima je već bila 1% NMP agaroz. Vraćena su pokrovna stakalca i posle sušenja 5 minuta na 4°C, pažljivo su uklonjena pokrovna stakalca i gelovi su pripremljeni za lizu. Liziranje ćelija je vršeno smeštanjem pločica sa gelom u lizirajući rastvor (2.5 mol/l NaOH, 0.1 mol/l EDTA, 0.01 mol/l Tris i TritonX-100) čiji je pH 10, 1 sat na 4°C u frižideru. Tretman visokom koncentracijom soli dovodi do oslobađanja DNK odn. uklanjanja membrane, citoplazme, nukleoplazme i narušavanja nukleozoma. Ono što ostaje je nukleotid, koji se sastoji od nuklearnog matriksa i DNK. Denaturacija i rasplitanje DNK je obavljeno u alkalnim uslovima, jer na vrednostima pH 13 dolazi do raskidanja vodoničnih veza između lanaca DNK. Pločice su zaranjane u rashlađeni pufer za denaturaciju (300mmol/L NaOH, 1mmol/L) na 20 minuta na 4°C u mraku. Elektroforeza je izvedena u istom puferu kao za denaturaciju u alkalnim uslovima pH 13, 20 minuta na 4°C u frižideru, u mraku na 25V i 300mA. Za elektrolizu se pravi svež pufer pred svaki eksperiment. Posle završene elektroforeze pločice su pažljivo ispirane destilovanom vodom da se uklone ostaci pufera za elektroforezu. Na kraju pločice su neutralisane sa puferom za neutralizaciju (0.4 mol/l Tris buffer) čiji je pH 7.5, 15 minuta na 4°C u frižideru u mraku.

Pripremljeni gelovi su bojeni fluorescentnom bojom koja interkalira u DNK. Po 20 μ l rastvora boje ethidium bromida (5 μ g/ml) je nanešeno na svaki

gel i pokriveno pokrovnom pločicom. Korišćena je najmanja koncentracija boje koja može da dovede do jake fluorescencije.

Rastvor za lizu (pH 10)

NaCl	146,6g
EDTA	37,2g
Tris	1,21g
Destilovana voda	1000ml
1% Triton X-100	

Rastvor za denaturaciju i elektroforezu (pH 13)

NaOH 10M	30ml
EDTA (pH 8) 0.2M	5ml
Destilovana voda	965ml

Rastvor za neutralizaciju (pH 7.5)

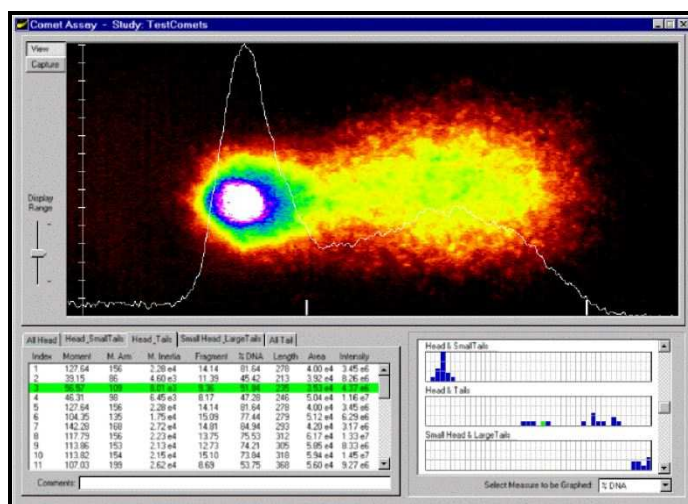
Tris	48,44g
Destilovana voda	800ml

4.2.1.6. Vizuelizacija kometa

Pedeset slučajno odabranih nukleusa (25 po gelu koji su u duplikatu) je analizirano na svakom uzorku. Komete se vizuelizuju (x200, x400, x600 u zavisnosti od tipa ćelije) na fluorescentnom mikroskopu (Leica, DMLS, Vienna, Austria) sa filterom koji ima ekscitaciju 510 do 560 nm i barijerni filter od 590 nm kad se koristi EtBr kao boja. Komete su posmatrane u sredini gela.

Softverski program (Comet Assay IV, Perceptive Instruments, Haverhill, UK) je poslužio za analizu slike i interpretaciju rezultata gde se kvantifikuju i izračunavaju različiti parametri u skladu sa razlikama između glave i repa komete (procenat migracije DNK, dužina repa) (Slika 6).

Flourescentnim mikroskopom sa digitalnom kamerom je obezbeđeno «hvatanje» kometa.



Slika 6. Analiza slike Komet testa u softverskom programu.

4.2.1.7. Statistička obrada

U ovom eksperimentu korišćene su deskriptivne i analitičke metode.

Od deskriptivnih korišćene su:

- Apsolutni i relativni brojevi (%)
- Mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana)
- Mere disperzije (standardna devijacija, minimum, maksimum)

Od analitičkih metoda korišćeni su testovi razlike koji spadaju u grupu neparametrijskih testova. Za analizu rezultata dobijenih u Komet testu korišćen je neparametrijski ANOVA, Mann-Witney *U*-test korišćenjem Statistica software (StatSoft Statistica Ver. 6. 2001, USA).

4.3. ISPITIVANJE BIODOKOMPATIBILNOSTI KALCIJUM SILIKATNIH SISTEMA I HIDROKSIAPATITA IMPLANTACIJOM U POTKOŽNO TKIVO: *IN VIVO* STUDIJA

Drugi deo istraživanja obavljen je na Institutu za fiziologiju i biohemiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i u Laboratoriji za histologiju, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

4.3.1. Subjekti

Dozvola za eksperimentalni rad sa životinjama dobijena je od Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (br. 36/5 od 12. 4. 2012.). Eksperiment je sproveden u skladu sa međunarodnim standardima ISO 7405 i ISO 10993-2 (zahtevi za blagostanje životinja).

Animalni model u ovom eksperimentalnom radu bili su pacovi (Wistar albino) i to 40 pacova, muškog pola, stari između 2,5 i 3 meseca, prosečne težine 350 g. Životinje su odgojene u vivarijumu Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu za potrebe medicinskih istraživanja. Životinje su boravile u prostoriji sa kontrolisanom temperaturom, sa pristupom vodi i hrani *ad libitum*.

4.3.2. Testirani materijal

Testirani materijali bili su kalcijum silikatni sistemi (CS): gde je 60% ukupne količine predstavljala β -C₂S i C₃S faza uz dodate komponente i to kalcijum karbonat (CaCO₃) 20% i BaSO₄ 20% (Merck, Nemačka) kao rendgen kontrastno sredstvo (sintetizovan prema metodi Jokanovića i sar.). Kompozicija druge mešavine je bila 40% hidroksiapatit (dobijen primenom hidrotermalnih metoda sinteze (Jokanović i sar. 2004.), 20% mešavina C₂S i C₃S u odnosu 2:1,

20% CaCO₃ i 20% BaSO₄. Kao pozitivna kontrola korišćen je Mineral Trioksid Agregat (ProRoot MTA, Tulsa OK, USA).

U potkožno tkivo su postavljane polietilenske cevčice (tubice), dužine 10mm i unutrašnjeg promera 1mm, koje su do pola ispunjene sveže zamešanim materijalima (CS, CS-HA, MTA). Prazna polovina cevčice je bila negativna kontrola. U svaku životinju su postavljane po dve cevčice. Na desnoj strani cevčica sa testiranim materijalom, a na levoj strani od kičme cevčica sa MTA. Cevčice su orjentisane tako da je materijal bio uvek okrenut ka glavi, a prazni deo cevčice ka repu.

Svi materijali bili su pripremani prema uputstvu proizvođača.

4.3.3. Test procedura

4.3.3.1. Anestezija

Životinje su anestezirane sa intraperitonealnom injekcijom Ketamina u dozi 80 mg/kg telesne težine (Ketamin 500mg/ml, Laboratorio Sanders S.A., Santiago, Chile), kombinovanog sa Ksilazinom 4 mg/kg telesne težine (2% Xylazin, Cp Pharma, Bergdorf, Germany). Dužina trajanja anestezije bila je prosečno 30 minuta.

4.3.3.2. Randomizacija

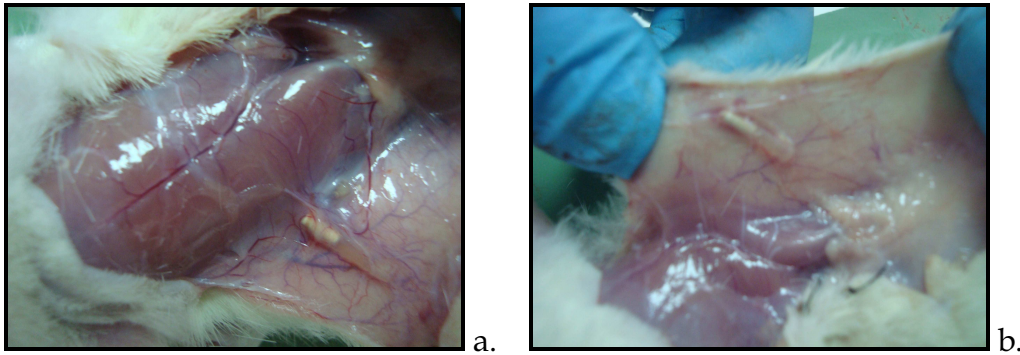
Metodom slučajnog odabira životinje su podeljene u dve grupe, po 20 životinja za svaki testirani materijal. U svaku životinju je na isti način postavljan testirani materijal, pozitivna kontrola i negativna kontrola. Po 10 životinja (pet od svakog materijala) je žrtvovano u četiri opservaciona perioda: 7, 15, 30 i 60 dana. Uzorci su obeleženi kodovima tako da istraživač koji je vršio njihovu analizu nije bio upoznat kojoj grupi pripada ispitivani uzorak.

4.3.3.3. Hirurška procedura

Kako je ispoštovana procedura u administriranju opšte anestezije kod životinja pristupilo se hirurškoj intervenciji. Posle aplikovanja antiseptičkog rastvora (10% povidon jodid), koža na leđima pacova je obrijana. Hirurškim skalpelom (Surgical Disposable Scalpels, BRAUN, Aesculap AG & Co. Tuttlingen, Germany) je napravljena incizija duga oko 2 cm u pravcu glava-rep. Tupom disekcijom, desno i levo od kičmenog stuba, napravljena su dva džepa dubine oko 15 mm u koje su sterilnom pincetom postavljane sterilne polietilenske cevčice sa testiranim materijalom po shemi ranije opisanoj (poglavlje 4.3.2). Koža je potom ponovo vraćena na mesto i ušivena pojedinačnim čvorastim šavom (igla za šivenje 6007L/R7, UNIMED S.A., SWISS MADE), sa neresorptivnim najlonskim koncem (No.USP6/0-2, Shandong Sinorgmed Co., Ltd China).

Postoperativno životinje su smeštene po dve u kavezu u kontrolisanoj sredini, sa kontrolisanom ishranom i dnevnom profesionalnom negom. Kontrola zdravstvenog stanja vršena je tri puta dnevno u toku opservacionog perioda.

Po 5 nasumično izabranih eksperimentalnih životinja od svakog testiranog materijala (10 životinja u svakom opservacionom periodu) je bilo žrtvovano posle 7, 15, 30 i 60 dana intravenskom injekcijom Pentobarbitola (Pentobarbital sodium salt 100mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany). Ispreparisano potkožno tkivo zajedno sa cevčicama potopljeno je u 10% formalin (Slika 7).



Slika 7: Operativno polje sa implantiranim tubicama nakon opservacionog perioda.

4.3.3.4. Obrada tkiva za histološku analizu

Za histološku analizu iz svake životinje su uzimana 4 uzorka:

- tkivo oko cevčice sa tetiranim materijalom
- tkivo oko prazne cevčice (negativna kontrola materijala)
- tkivo oko cevčice sa MTA (pozitivna kontrola)
- tkivo oko prazne cevčice (negativna kontrola MTA)

Tkivni iseći su zajedno sa polietilenskim tubicama fiksirani u 10% pufersanom formalinu. Nakon toga su uklonjene polietilenske tubice. Tkivo je zatim pripremano za svetlosnu mikroskopiju na uobičajen način, koji je podrazumevao dehidrataciju tkiva u seriji alkohola rastuće koncentracije; prosvetljavanje u ksilolu i kalupljenje u parafinu. Parafinski iseći debljine 4 μm bojeni su hematoksilin-eozinom (HE).

Mikroskopski preparati su analizirani na svetlosnom mikroskopu (Olympus BX-51, Japan), a mikrofotografije su napravljene digitalnom kamerom (CD video kamera, PixeLink, povezana sa 19" PC monitorom Dell).

Prema međunarodnim standardima (ISO 10993-6. *Biological evaluation of medical devices-Part 6:Test for lokal effect after implantation*) procenjivane su lokalne reakcije u tkivu gde je implantiran materijal. Za histološku analizu

pripremljenih uzoraka parametri su analizirani kvalitativno i semikvantitativno (prema Lotfi i sar. 2009. i Scarparo i sar. 2010.):

Zapaljenska reakcija

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

Vaskularna kongestija

- 0 - odsutna
- 1 - minimalna
- 2 - blaga
- 3 - umerena
- 4 - izrazita, sa pucanjem krvnog suda

Fibrozna kapsula

- 0 - nema kapsule
- 1 - minimalna kapsula
- 2 - tanka kapsula
- 3 - umereno debela kapsula
- 4 - debela kapsula

Očuvanje integriteta vezivnog tkiva

- 0 - kompletno očuvanje
- 1 - minimalna narušenost strukture
- 2 - blaga narušenost strukture
- 3 - umerena narušenost strukture
- 4 - nekroza

4.3.3.5. Statistička analiza

Za statističku analizu korišćen je neparametrijski Kruskal-Wallisov test sa Dunn-ovim post- hoc testom za međugrupna poređenja.

Statistička analiza je urađena u softverskom paketu Minitab 16 (Minitab Inc. State College, PA, USA)

4.4. ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI I BIOFUNKCIONALNOSTI NOVOSINTETISANIH KALCIJUM SILIKATNIH SISTEMA I HIDROKSIAPATITA U DIREKTNOM PREKRIVANJU EKSPONIRANE PULPE KUNIĆA: *IN VIVO* STUDIJA

Treći deo istraživanja obavljen je na Institutu za hirurgiju Veterinarskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

4.4.1. Subjekti

Dozvola za eksperimentalni rad sa životinjama dobijena je od Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (br.36/5 od 12.4. 2012.) i sprovedeni prema međunarodnim standardima ISO10993-2. Animalni model u ovom eksperimentalnom delu istraživanja bila su četiri kunića (*Oryctolagus cuniculus*) oba pola, iz različitih legla, starosti oko 12 meseci i prosečne težine 4 kilograma. Životinje su bile smeštene u prostoru za eksperimentalne životinje na Veterinarskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, svaka u svom kavezu u kontrolisanoj sredini, sa kontrolisanom ishranom i dnevnom profesionalnom negom.

4.4.2. Testirani materijal

Testirani materijali bili su kalcijum silikatni sistem (CS): gde je 60% ukupne količine predstavljala β -C₂S i C₃S faza uz dodate komponente i to dehidrirani gips 20% i BaSO₄ (Merck, Nemačka) 20% kao rendgen kontrastno sredstvo (sintetizovan prema metodi Jokanovića i saradnika). Kompozicija druge mešavine, takođe sintetizovane prema metodi Jokanovića i saradnika, bila je 40% hidroksiapatit (dobijen primenom hidrotermalnih metoda sinteze (Jokanović i saradnici 2004.), 20% mešavina β -C₂S i C₃S u odnosu 2:1, 20%

dehidrirani gips i 20% BaSO₄. Kao kontrola korišćen je Mineral Trioksid Agregat (ProRoot MTA, Tulsa OK, USA). Svi materijali bili su pripremani prema uputstvu proizvođača.

4.4.3. Test procedura

4.4.3.1. Anestezija

Životinjama je hrana uskraćena 6 sati pred operativni zahvat, a voda na 3 sata.

Opšta disocijativna anestezija sprovedena je za sve hirurške zahvate i satojala se iz premedikacije Ksilazinom (2% Xylazin, 5 mg/kg telesne težine, Cp Pharma, Bergdorf, Germany) intramuskularnom injekcijom, a posle toga intramuskularno kombinacija Ketamina (Laboratorio Sanderso S.A., Santiago, Chile) u dozi od 35 mg/kg telesne težine i Acepromazina (Boeringer Ingelheim Vetmedica, Inc. USA) u dozi od 1mg/kg telesne težine. Dužina trajanja anestezije bila je prosečno oko 100 minuta

4.4.3.2. Raspodela testiranih materijala

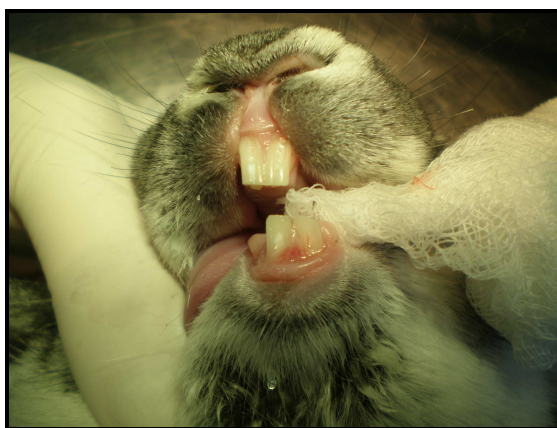
U gornji desni maksilarni sekutić kao sredstvo za direktno prekrivanje eksponirane pulpe postavljan je materijal mineral trioksid agregat (MTA), a u ostala tri sekutića postavljani su kalcijum silikatni cement - CS u dva kunića i mešavina kalcijum silikatnog cementa i hidroksiapatita - CS-HA u druga dva kunića.

Uzorci su bili obeleženi na takav način da istraživač koji je radio njihovu analizu nije bio upoznat kojoj grupi pripada ispitivani uzorak.

4.4.3.3. Hirurška procedura

Hirurška procedura je sprovedena pod aseptičkim uslovima i na način koji obezbeđuje minimalnu traumu. Svaki zub ponaosob je očišćen, posušen i dezinfikovao (30% hidrogen i 5% tinktura joda). Potom se pristupilo formiranju kaviteta V klase u gingivalnoj trećini vestibularne površine sekutića dijamantskim okruglim svrdlima sa vodenim hlađenjem. Za svaku životinju korišćen je novi set dijamantskih i karbidnih svrdala. U sredini kaviteta sterilnim okruglim svrdlom izvršeno je eksponiranje pulpe. Sterilnim kuglicama vate su posušeni kaviteti, blago i bez pritiska. Na eksponiranu pulpu je postavljan sveže zamešani materijal. Svi kaviteti su zatvarani sa glas jonomer cementom (GC FUJI VIII, GC Corporation, Tokyo, Japan) kao definitivnim ispunom (Slika 8).

Postoperativno životinje su bile smeštene u individualnim kavezima do kraja trajanja eksperimenta. Životinje su bile žrtvovane posle tri, deset i petnaest dana intravenskom injekcijom od 10ml rastvora Pentobarbitola (Pentobarbital sodium salt 100mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)



Slika 8. Pristupni kaviteti rekonstruisani GJC

4.4.4. Preparacija tkiva za patohistološku analizu

Posle uklanjanja mekih tkiva, mandibula i maksila su odvojene od ostatka lobanje. Zubi u alveoli su isečeni dijamantskom šajbnom. Uzorci su fiksirani u 10% formalinu.

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

Mikroskopski preparati su analizirani optičkom mikroskopijom uz primenu programa za morfometriju Software «Cell-B» by Olympus, mikroskop Olympus 5, na uveličanjima x10, x40, x100, x200. Uz navedeni softver patohistološki parametri su analizirani kvalitativno, semikvantitativno i kvantitativno.

4.4.5. Histološko ocenjivanje

Ispitivanje svakog zuba bilo je zasnovano na ocenjivanju sledećih parametara (*scoring system*) (Accorinte i sar. 2008a):

- **Inflamatorni odgovor pulpe**

Intenzitet inflamatorne reakcije:

- 1: Odsustvo zapaljenja ili samo par ćelija
- 2: Blago zapaljenje - manje od 10 ćelija
- 3: Umereno - između 10 i 25 zapaljenskih ćelija
- 4: Ozbiljno zapaljenje - u proseku više od 25 ćelija

Raširenost inflamatorne reakcije:

- 1: Odsustvo inflamacije
- 2: Blago - inflamatorne ćelije blisko uz dentinski most ili eksponirani deo pulpe
- 3: Umereno - inflamatorne ćelije su otkrivene u delu koronarne pulpe
- 4: Ozbiljno - cela koronarna pulpa je infiltrirana ili nekrotična

Generalno stanje pulpe:

- 1: Nema inflamatorne reakcije
- 2: Sa inflamatornom reakcijom
- 3: Absces
- 4: Nekroza

- **Ostali nalazi u pulpi**

Gigantske ćelije

- 1: Odsustvo
- 2: Blago
- 3: Umereno
- 4: Nekroza pulpe

Delovi materijala za direktno prekrivanje

- 1: Odsutan
- 2: Blago
- 3: Umereno
- 4: Veliki broj

Prisustvo mikroorganizama

- 1: Odsutni
- 2: Prisutni

- **Formiranje dentinskog mosta**

Kontinuitet mosta

- 1: Kompletan

- 2: Mala komunikacija materijala i pulpnog tkiva
- 3: Depozicija tvrdog tkiva samo na lateralnom zidu
- 4: Odsustvo mosta i tvrdog tkiva

Morfologija novoformiranog mosta ili tkiva

- 1: Dentin ili dentin sa iregularnim tvrdim tkivom
- 2: Samo depozicija iregularnog tvrdog tkiva
- 3: Veoma tanak sloj tvrdog tkiva
- 4: Nema depozicije tvrdog tkiva

Debljina mosta

- 1: Više od 250 μm
- 2: Od 150-249 μm
- 3: Od 1-149 μm
- 4: Delimičan ili odsutan most

Lokalizacija

- 1: Zatvoreno mesto eksponiranja bez zalaženja u kavum
- 2: Most zahvata i kavum ka naspramnom dentinskom zidu
- 3: Most doseže do naspramnog dentinskog zida
- 4: Bez mosta ili samo naslage tvrdog tkiva na zidovima

4.4.6. Statistička analiza

Za statističku analizu korišćen je neparametrijski Kruskal-Wallis test i Dunn-ov post-hoc test za ispitivanje značajnosti razlika između parova.

Statistička analiza je urađena u softverskom paketu Minitab 16 (Minitab INC. State College, PA,USA).

5. REZULTATI

U ovom poglavlju su prikazani rezultati ispitivanja strukture i osobina novosintetisanih nano-materijala i rezultati praćenja njihovog genotoksičnog potencijala na humanim limfocitima *in vitro*, biokompatibilnosti implantacijom u potkožno tkivo *in vivo* i bioaktivnosti direktnim prekrivanjem pulpe na zubima kunića *in vivo*.

5.1. KARAKTERIZACIJA MATERIJALA

Poznavanje mehanizama interakcije između različitih ćelijskih konstituenata i tkivnih tečnosti sa materijalima koji se koriste u endodontskoj praksi je od velike važnosti kako bi se izbegli neželjeni i štetni efekti na tkiva.

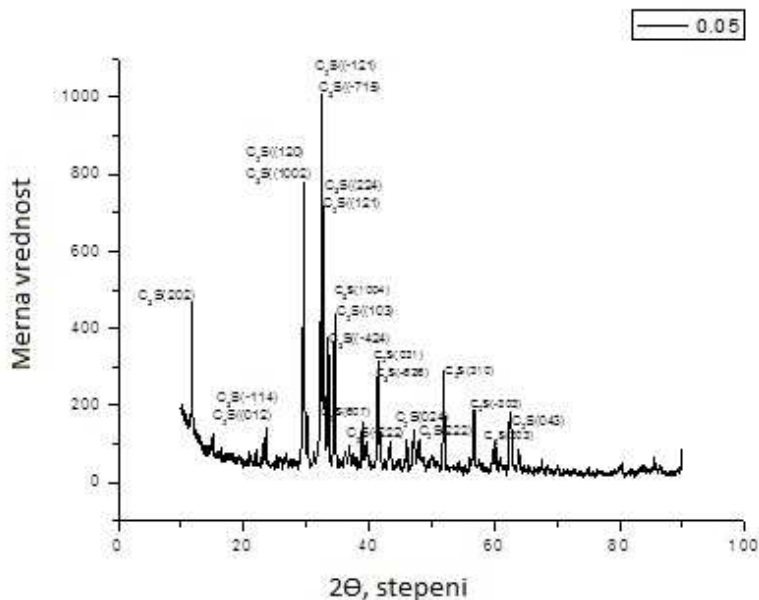
Zbog toga je i prvi korak u ovom istraživanju bilo analiziranje sastava, određivanje veličine čestica, merenje vremena vezivanja i određivanje čvrstoće novosintetisanih materijala.

5.1.1. Analiza difraktometrijom rendgenskih zraka (XRD)

Difrakcioni obrasci dobijeni x-zracima za C_3S i $\beta-C_2S$ faze koje čine kalcijum silikatni sistem prikazani su na Slici 9.

Prisustvo svih karakterističnih kristalografskih ravni: (202) za $2\theta = 11.7$; (-114) za $2\theta = 23.6$; (1002) za $2\theta = 29.8$; (-114) za $2\theta = 32.5$; (224) za $2\theta = 32.8$; (-424) za $2\theta = 33.4$; (1004) za $2\theta = 34.6$; (-626) za $2\theta = 41.7$ odgovara **C_3S fazi**, dok pikovi i uglovi: (012) za $2\theta = 23.3$; (120) za $2\theta = 29.7$; (-121) za $2\theta = 32.3$; (121) za $2\theta = 33$; (103) za $2\theta = 34.6$; (103) za $2\theta = 34.6$; (222) za $2\theta = 38.9$; (031) za $2\theta = 41.6$; (222) za $2\theta = 43.2$; (024) za $2\theta = 46.9$; (222) za $2\theta = 48$; (310) za $2\theta = 51.9$; (-303) za $2\theta = 56.8$; (303) za $2\theta = 60.2$; (043) za $2\theta = 62.7$ odgovaraju **fazi $\beta-C_2S$** . Izračunato prema Sherrer-ovoj jednačini (izmerene za visoko izražene ravni od

32.1° (oblast -121) za β -C₂S i (oblast -715) za C₃S, dobijena vrednost veličine kristalita ovih faza bila je oko 19.9 nm.



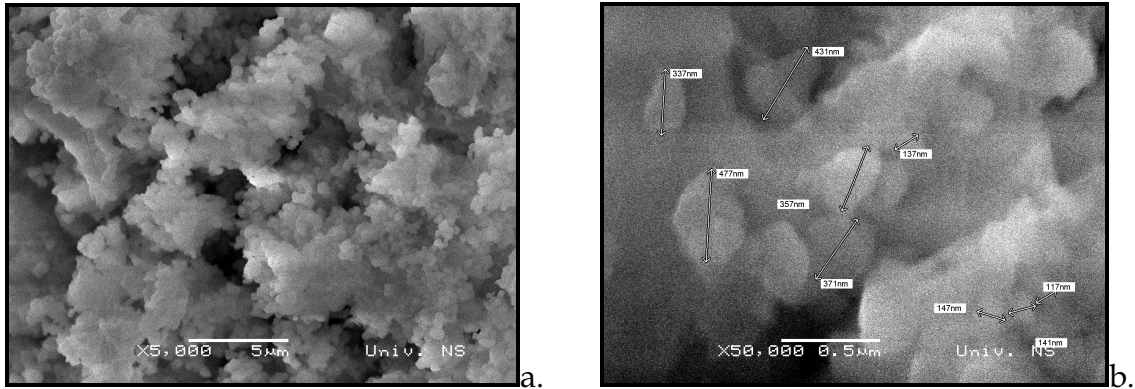
Slika 9. Difrakcioni obrasci dobijeni x-zracima za C₃S i β -C₂S faze koje čine kalcijum silikatni sistem

5.1.2. Skening elektronska mikroskopija (SEM) i energetska disperzivna analiza (EDS)

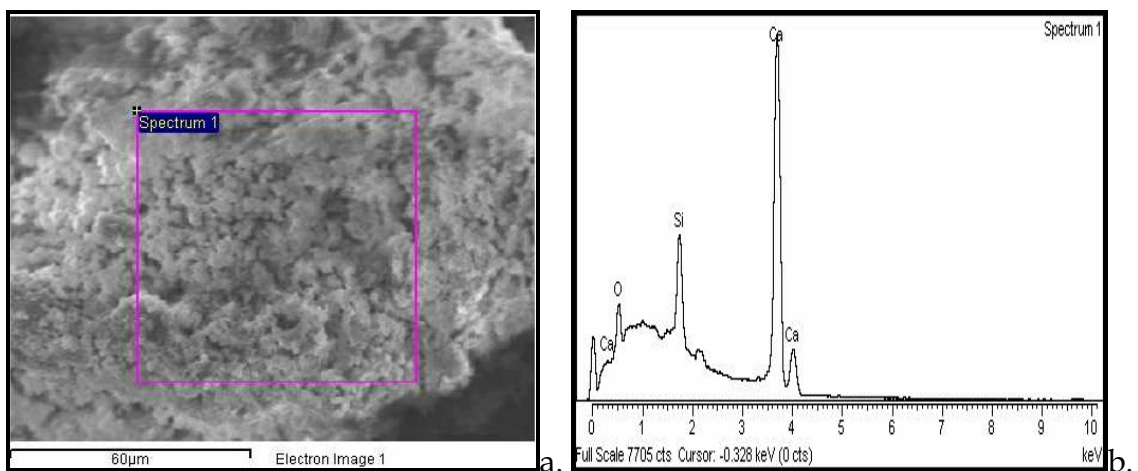
Strukturu kalcijum silikata (Slika 10) čine uglavnom aglomerati veličine nekoliko mikrometara koji su izgrađeni od manjih partikula (čestica) sa dimenzijama između 117 i 477 nm. Ove partikule su uglavnom sferičnog ili elipsoidnog oblika, manje ili više izdužene u jednom pravcu.

EDS analiza (Slika 11) je pokazala da je hemijski sastav kalcijum silikata (Ca 22.21, Si 8.22, O 69.7 u atomskim%) odgovarao odnosu Ca/Si od približno 2.7 (atomske%). Očigledno je da je ovaj odnos veoma blizak CaO/SiO₂ odnosu, koji odgovara mešavini C₃S/ β -C₂S = 2:1, pokazujući homogenu distribuciju obe faze unutar uzoraka. Poredeći vrednosti veličine čestica dobijenih SEM analizom i veličine kristalita dobijenih iz XRD spektra, bilo je jasno da ove

čestice koje su sastavljene od manjih gradivnih elemenata (kristalita), pokazuju značajnu aktivnost sistema.



Slika 10. SEM analiza pokazuje tipičan izgled kalcijum silikatnih aglomerata i čestica (a), čestice su uglavnom sferičnog ili elipsoidnog oblika od 117-477nm (b).



Slika 11. Tipičan izgled kalcijum silikatne faze (SEM) (a), odgovara EDS spektru kalcijum silikatne faze (b).

5.1.3. Vreme vezivanja i pritisna čvrstoća

Vreme vezivanja je mereno za kalcijum siliktnu fazu (CS) i njegovu smešu sa hidroksiapatitom (CS-HA). Vreme vezivanja za CS počelo je 3 minuta nakon dodavanja dejonizovane vode i bilo je kompletno nakon 10 minuta. Za CS-HA ove vrednosti su bile 5 i 15 minuta, respektivno.

Odgovarajuće pritisne čvrstoće su bile:

CS-kalcijum silikat

3.5 MPa nakon 24 sata

4.4 MPa nakon 3 dana

4.8 MPa nakon 7 dana

5.4 MPa nakon 28 dana

CS-HA- kalcijum silikat i hidroksiapatit

2.8 MPa nakon 24 sata

3.2 MPa nakon 3 dana

3.5 MPa nakon 7 dana

4.1 MPa nakon 28 dana

5.2. REZULTATI ISPITIVANJA GENOTOKSIČNOG POTENCIJALA NANOSTRUKTURNOG BIOMATERIJALA

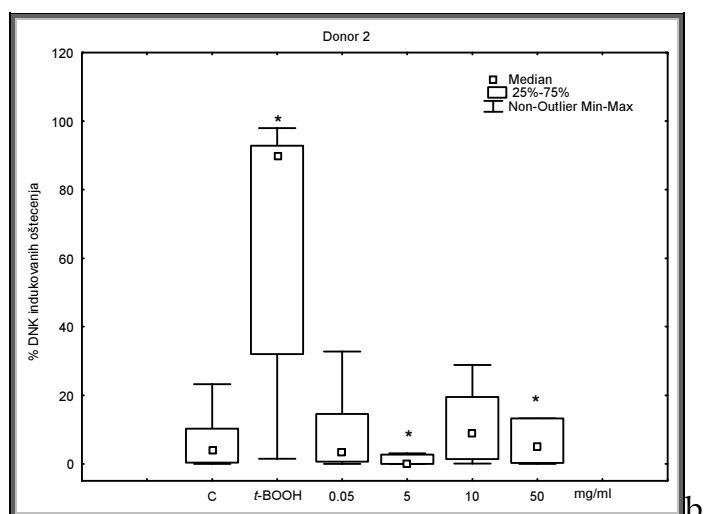
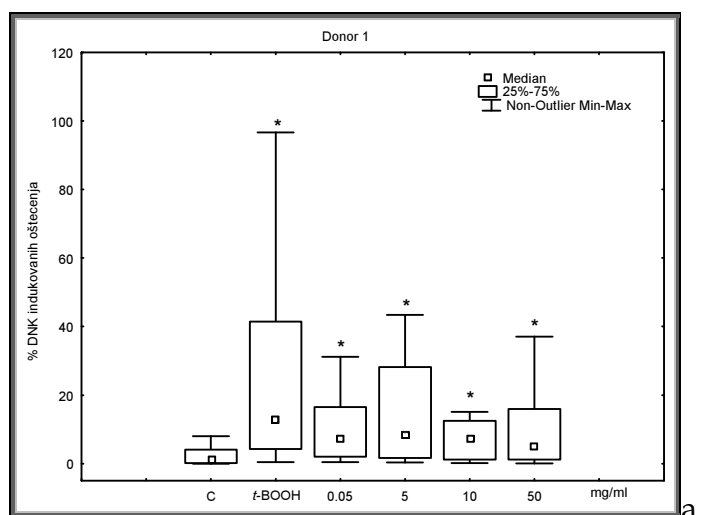
Genotoksični potencijal hidroksiapatita (HA) je ispitivan na humanim limfocitima iz periferne krvi od tri donora, dok je genotoksični potencijal kalcijum silikatnog sistema (CS) i njegove mešavine sa hidroksiapatitom (CS-HA) ispitivan na limfocitima pet donora.

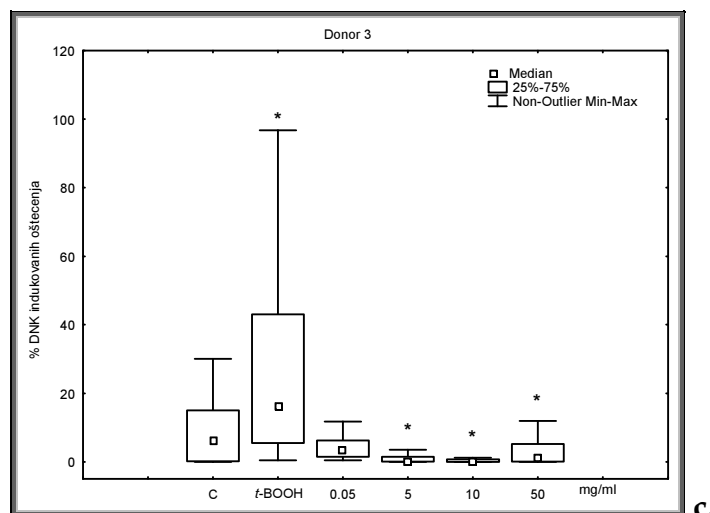
Genotoksični potencijal HA, CS i CS-HA je testiran pomoću Komet testa. Kao pozitivna kontrola korišćen je *t*-butil hidro peroksid (*t*-BOOH) koji dovodi do supstitucije baza i prekida na molekulu DNK. Prekidi su većinom posledica AP mesta, nastalih usled adukata lipidne peroksidacije, jer *t*-BOOH predominantno deluje na membrane eukariotskih ćelija, a manjim delom prodire do jedra i direktno oštećuje DNK (Asad i sar. 2000; Rempel i sar. 2009).

5.2.1. Ispitivanje genotoksičnog potencijala HA

Tabela 1: Genotoksični potencijal HA izražen % DNK u repu komete

Koncentracija HA	Postotak DNK u repu komete ± standardna greška		
	Donor 1	Donor 2	Donor 3
Negativna kontrola	4,92±1,78	11,67±2,54	9,19±1,25
t-BOOH	24,84±3,94	68,00±5,00	27,24±3,50
0,01	9,77±0,96	11,75±2,39	5,27±0,60
0,05	18,84±3,05	1,58±0,39	1,29±0,27
5	12,33±2,52	14,38±2,14	1,17±0,40
10	9,46±1,30	22,34±3,90	2,49±0,39
50	4,92±1,78	11,67±2,54	9,19±1,25





Slika 12. Genotoksični efekat HA u humanim limfocitima predstavljen % indukovanih DNK oštećenja. HA je pokazao genotoksičnost na limfocitima donora 1 (a), nema indukcije genotoksičnih oštećenja kod druga dva donora (b,c)

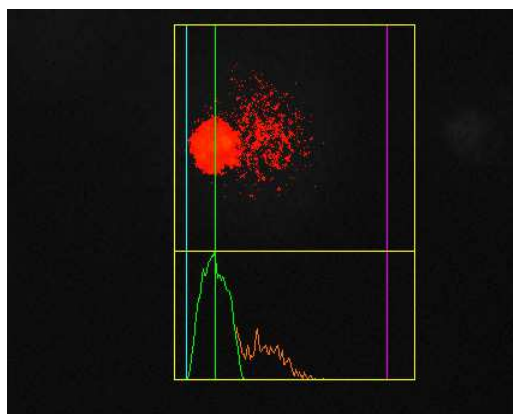
Genotoksični potencijal HA je testiran u koncentracionom opsegu od 0.05-50 mg/ml. Dobijeni rezultati (Tabela 1, Slika 12) pokazuju da posle tretmana limfocita dobijenih od donora 1, hidroksiapatit dovodi do statistički značajne indukcije genotoksičnosti ($p < 0.05$) na svim testiranim koncentracijama u poređenju sa negativnom kontrolom (netretirane ćelije). S druge strane, hidroksiapatit nije indukovao oštećenja DNK kod druga dva donora, čak je procenat DNK oštećenja kod HA-tretiranih ćelija bio niži u odnosu na negativnu kontrolu (donor 2- konc. 5mg/ml; donor 3- konc. 5, 10, 50 mg/ml).

5.2.2. Ispitivanje genotoksičnog potencijala CS

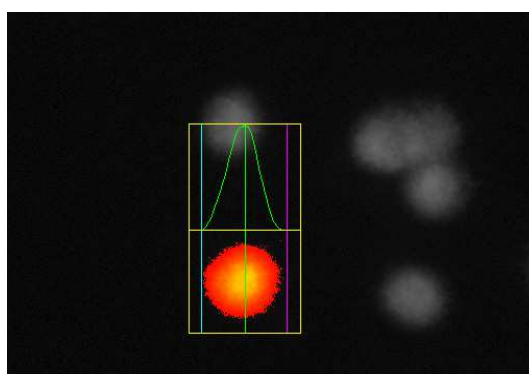
Genotoksični efekat nosivog sintetičnog kalcijum silikatnog sistema (CS) je testirana na limfocitima pet donora (dva su dodata) i dobijeni rezultati su prikazani na Tabeli 2 i Slikama 13-16.

Tabela 2: Genotoksični potencijal CS izražen % DNK u repu komete

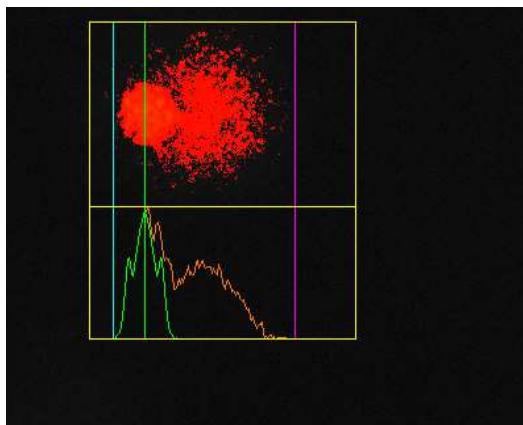
Koncentracija CS	Postotak DNK u repu komete ± standardna greška				
	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5
Negativna kontrola	2,98±1,80	7,24±2,60	5,81±1,38	14,66±2,86	11,42±2,82
t-BOOH	33,07±4,30	33,10±4,30	32,46±4,26	33,10±4,30	33,27±4,30
0,01	7,09±1,40	2,83±1,00	6,50±1,00	16,70±2,42	13,55±2,10
0,05	4,38±1,00	3,15±0,70	4,62±1,00	4,70±1,00	4,34±1,00
0,1	5,27±2,60	3,13±1,00	6,67±1,20	13,70±1,50	8,76±1,10
1	5,06±1,00	2,70±1,00	3,50±1,00	9,30±1,30	6,88±1,05
5	22,30±4,90	3,06±1,00	1,20±0,50	5,06±0,80	8,30±2,23
10	23,49±4,40	2,37±0,50	2,53±0,50	7,23±1,50	2,58±0,50



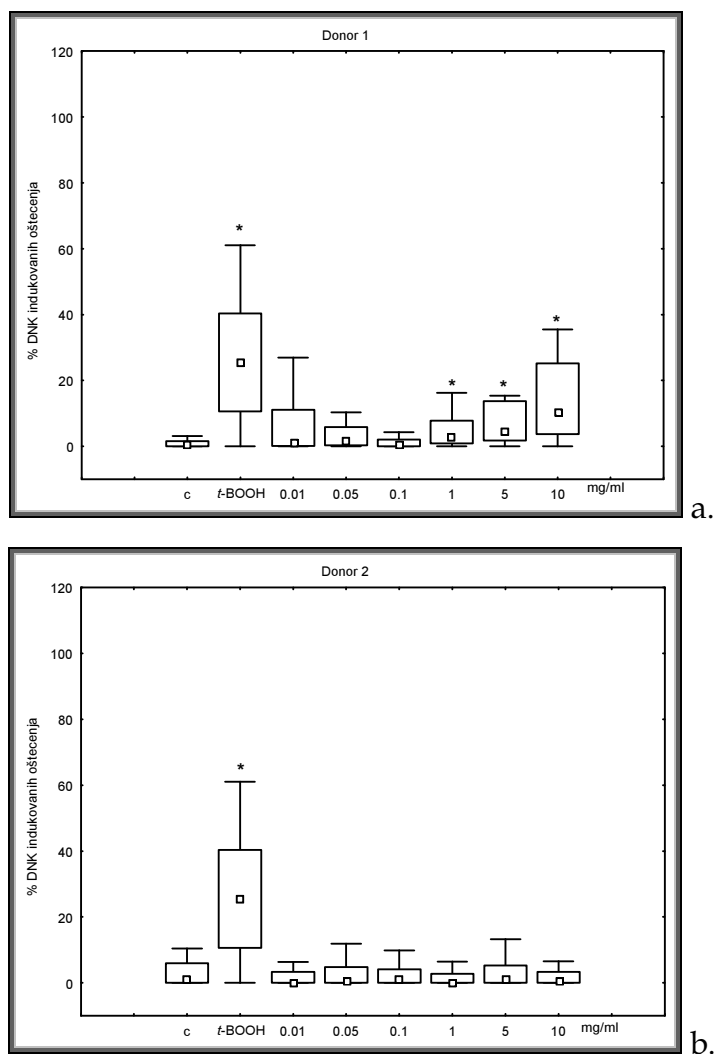
Slika 13: Slika oštećene ćelije kao posledica genotoksičnog potencijala CS u koncentraciji od 5 mg/ml (donor 4).

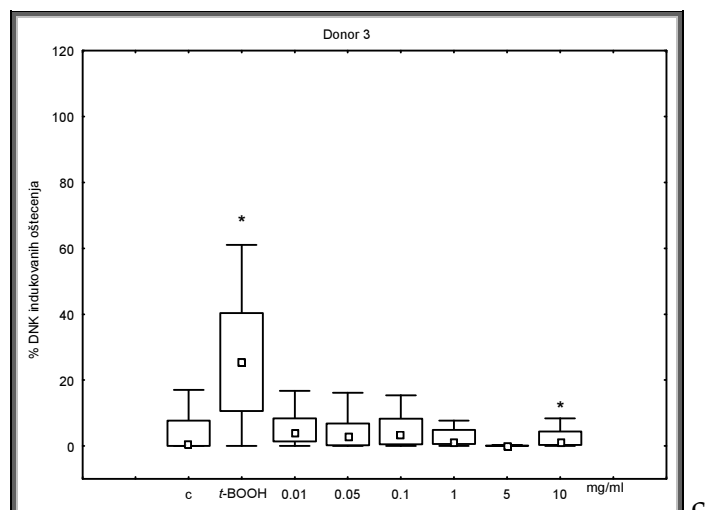


Slika 14: Prikaz neoštećenog limfocita (negativna kontrola, netretirana ćelija).

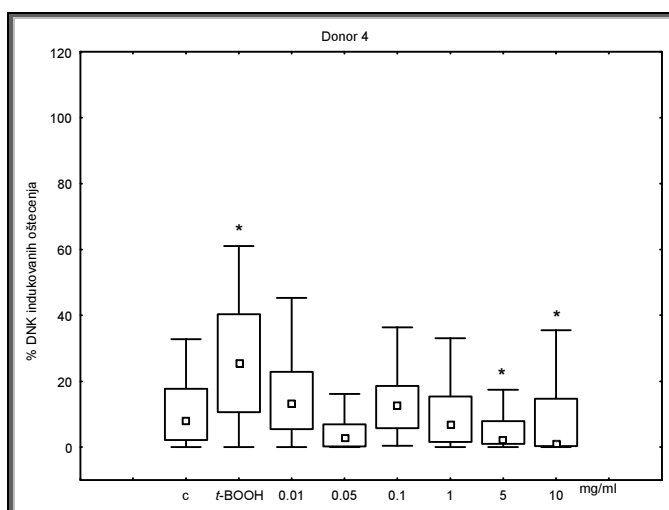


Slika 15: Prikaz potpuno oštećene ćelije koja je tretirana sa 0,5mM t-BOOH, kao pozitivna kontrola.

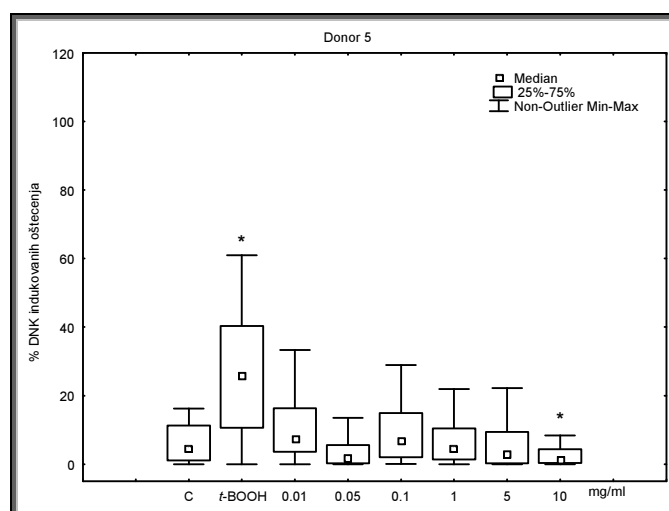




c.



d.



e.

Slika 16. Genotoksični efekat CS u humanim limfocitima predstavljen % indukovanih DNK oštećenja. CS pokazuje genotoksični efekat kod donora 1 u konc. 1, 5 i 10 mg/ml (a). Kod drugih donora nema genotoksičnih oštećenja (b, c, d, e).

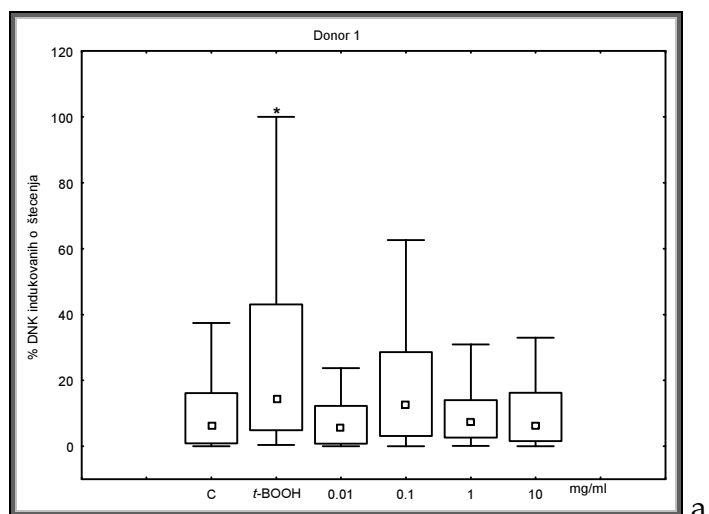
CS je pokazao snažan genotoksični efekat na limfocitima donora 1 u konc. 1-10mg/ml, dok na limfocitima donora 2 nije doveo do indukcije genotoksičnog efekta. Nasuprot ovim rezultatima, CS je kod donora 3, 4 i 5, doveo do smanjenja procenta oštećenja DNK, ali samo u višim testiranim koncentracijama (5 i 10 mg/ml).

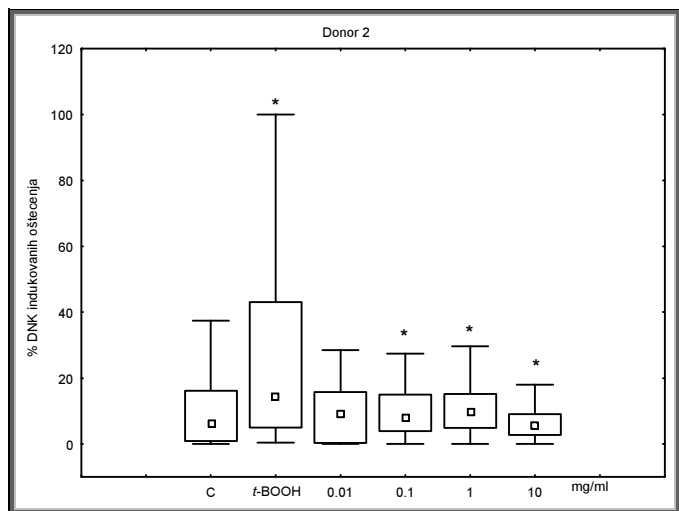
5.2.3. Ispitivanje genotoksičnog potencijala CS-HA

Posle testiranja pojedinačnih komponenti, testiran je i genotoksični potencijal mešavine kalcijum silikatnog sistema i hidroksiapatita (CS-HA). Rezultati su prikazani u Tabeli 3 i Slici 17.

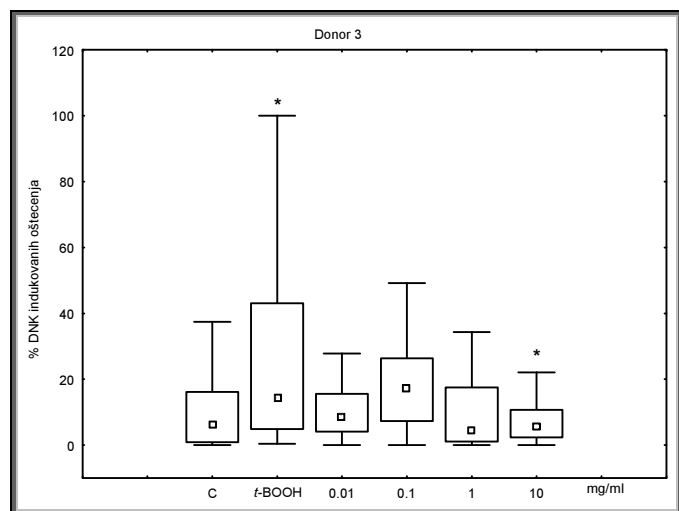
Tabela 3: Genotoksični potencijal CS-HA izražen % DNK u repu komete

Koncentracija CS-HA	Postotak DNK u repu komete ± standardna greška				
	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5
Negativna kontrola	9,44±1,34	9,00±1,34	8,01±1,35	12,40±3,20	16,50±3,28
t-BOOH	28,39±4,28	32,12±4,50	37,80±5,00	27,92±4,30	31,20±4,29
0,01	11,66±2,46	9,48±1,15	13,04±2,26	11,00±2,90	2,50±0,52
0,1	21,52±3,72	9,40±1,04	19,25±2,59	5,55±0,93	3,55±0,70
1	11,66±2,11	13,15±1,80	8,98±1,40	5,13±0,87	2,95±0,52
10	11,13±1,76	7,45±0,93	7,24±0,88	10,00±2,20	3,64±0,53

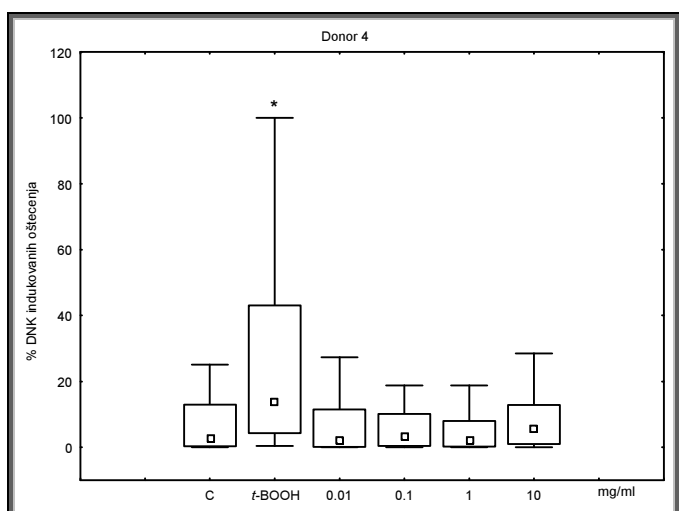




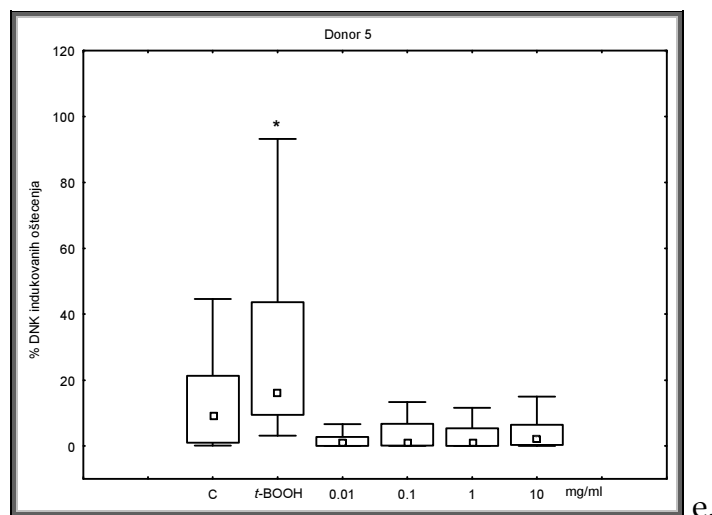
b.



c.



d.



Slika 17. Genotoksični efekat CS-HA u humanim limfocitima predstavljen % indukovanih DNK oštećenja. CS-HA nije doveo do indukcije genotoksičnih oštećenja kod donora 1, 3, 4 i 5 (a, c, d, e). Samo konc. 0.01 mg/ml nije dovela do genotoksičnih oštećenja kod donora 2 (b).

Indukcija DNK oštećenja izazvana delovanjem mešavine CS-HA nije utvrđena kod donora 1, 4 i 5. S druge strane CS-HA je u svim testiranim koncentracijama (osim najniže, 0.01 mg/ml) doveo do oštećenja DNK kod donora 2. Takođe je najviša testirana koncentracija (10 mg/ml) dovela do smanjenja procenta oštećenja DNK na limfocitima donora 3.

5.3. REZULTATI ISPITIVANJA BIOKOMPATIBILNOSTI NANOSTRUKTURNOG BIOMATERIJALA IMPLANTACIJOM U POTKOŽNO TKIVO: *in vivo* PRETKLINIČKI TEST NA ANIMALNOM MODELU

U ovom poglavlju predstavljene su rezultati ispitivanja biokompatibilnosti potkožnom implantacijom novosintetisanih kalcijum silikatnih sistema i hidroksiapatita. Kao pozitivna kontrola korišćen je mineral trioksid agregat (MTA). Sva ispitivanja su obavljena prema međunarodnim standardima i normama (ISO 7405 i 10993-2, 10993-6).

5.3.1. Opis i karakteristike uzorka

U studiju je na početku istraživanja bilo uključeno 40 pacova (Wistar abino), muškog pola, starosti između 2.5 i 3 meseca i prosečne telesne težine 350 gr.

Sve životinje su se dobro oporavile posle opšte anestezije i hirurške intervencije, a rane na koži zarasle su *per primam intencionem*. Na kraju svakog evaluacionog perioda (7, 15, 30, 60 dana) bilo je dostupno po 10 životinja za analizu, kao što je i planirano u eksperimentalnom modelu.

5.3.2. Rezultati histološke analize u eksperimentalnom periodu od 7 dana

Rezultati histološke analize su prikazani u Tabeli 4 i 5 i na Slikama 18 - 22. Zarastanje kod oba testirana materijala je proteklo uredno, makroskopski bez znakova zapaljenja. Nije uočeno narušavanje strukture vezivnog tkiva, kao ni nekroza i krvarenje u posmatranim preparatima.

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

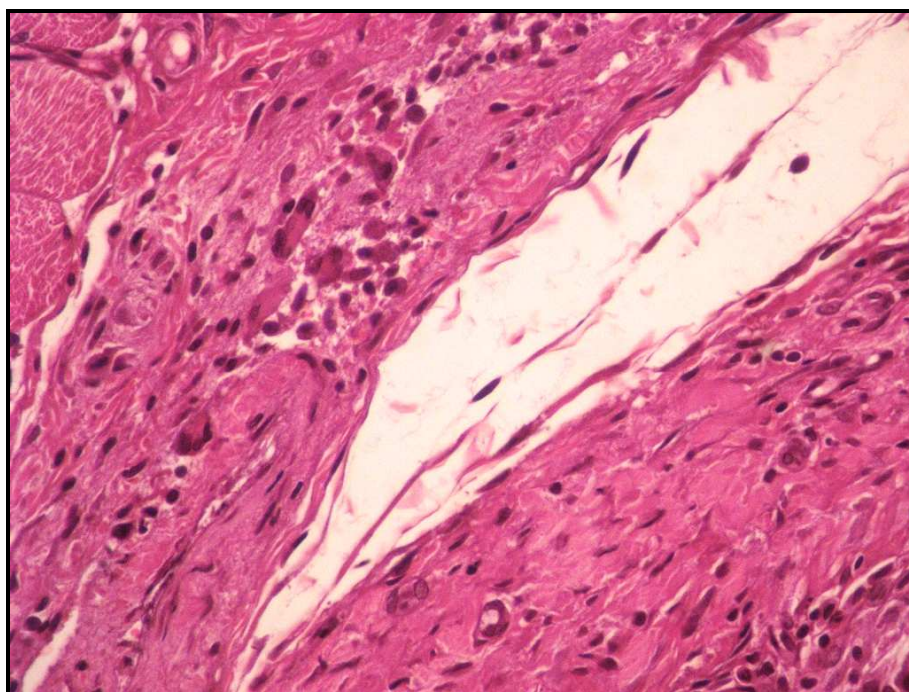
REAKCIJA	MATERIJALI		
	CS	CS-HA	MTA
1. Zapaljenska reakcija			
0 - odsutno 1 - minimalno < 25 ćelija 2 - blaga 26 - 50 ćelija 3 - umerena 51 - 100 ćelija 4 - izrazita > 100 ćelija	3	3	3.3
2. Vaskularna kongestija			
0 - odsutno 1 - minimalno 2 - blaga 3 - umerena 4 - izrazita, sa pucanjem krvnog suda	2.8	2.5	2.4
3. Kapsula			
0 - odsutna 1 - minimalna 2 - tanka 3 - umereno debela 4 - debela	1.6	2	2
4. Očuvanje integriteta vezivnog tkiva			
0 - kompletno 1 - minimalna narušenost strukture 2 - blaga narušenost strukture 3 - umerena narušenost strukture 4 - nekroza	3	2.5	2.5

Testirani materijali: CS - kalcijum silikatni sistemi; CS-HA kalcijum silikatni sistemi sa hidroksiapatitom; MTA- mineral trioksi agregat

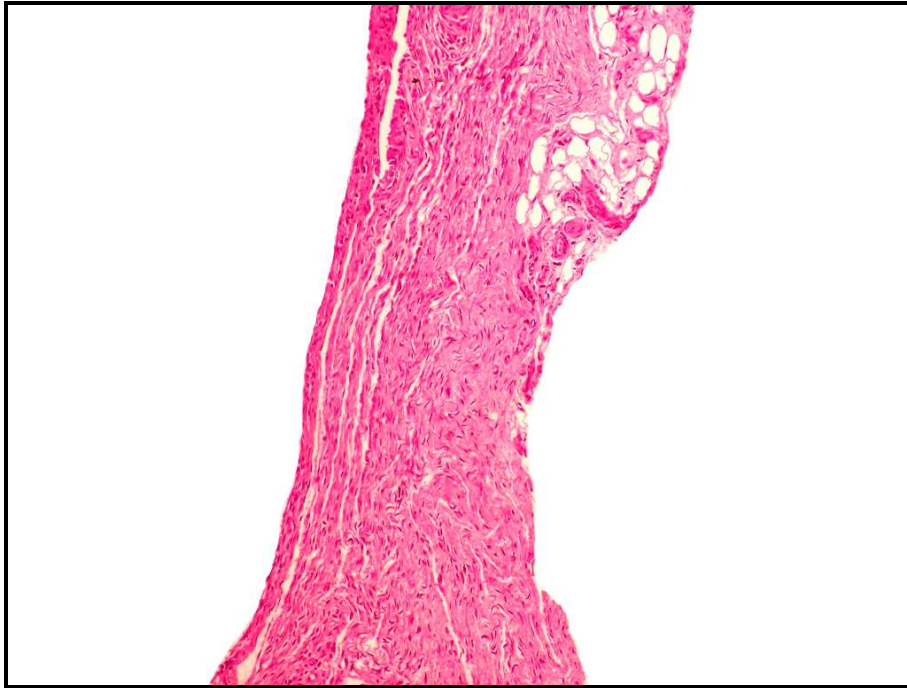
Na kraju opservacionog perioda od sedam dana svi preparati sa testiranim materijalom CS su bili dostupni za histološku analizu (20 pločica u duplikatu). Za materijal CS-HA za histološku analizu bilo je dostupno 18 uzoraka rađenih u duplikatu. Svi preparati sa MTA i njegova kontrola, na kraju opservacionog perioda, bili su dostupni za histološku analizu (po 20 pločica u duplikatu).

U analiziranim uzorcima 7 dana nakon implantacije CS i CS-HA uočena je umerena zapaljenska reakcija što se moglo oceniti ocenom 3 (do 100 ćelija u

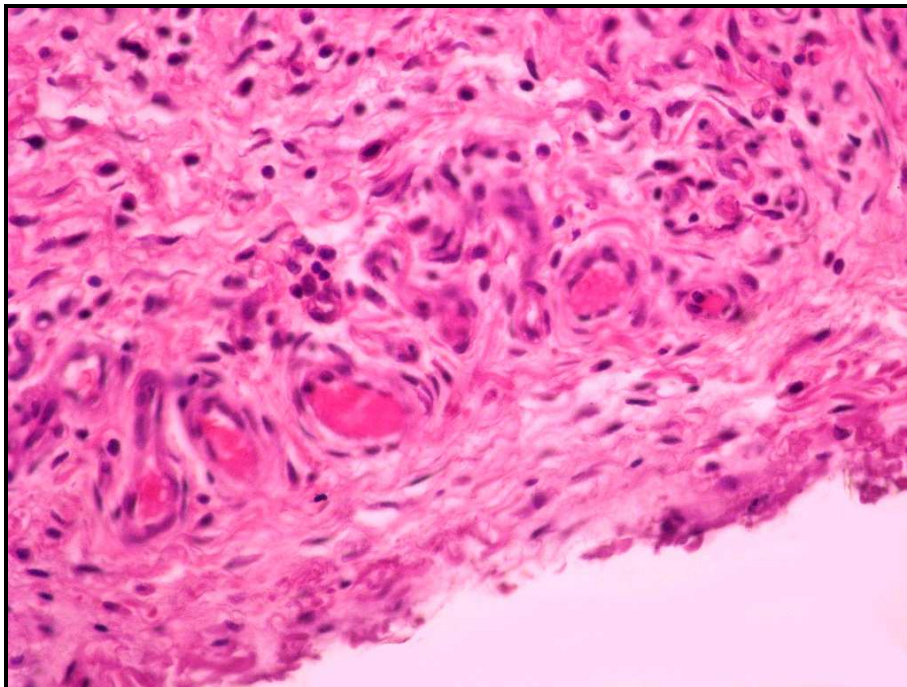
vidnom polju) (Slika 18, 19), dok je kod MTA vezivno tkivo pokazivalo znake jake zapaljenske reakcije (3.3) sa difuznim i fokalnim subkapsularnim i perivaskularnim zapaljenskim infiltratima (Slika 20), ali bez statističke značajnosti. Čelije zapaljenskog infiltrata činili su limfociti, plazmociti, dok su retki granulociti uočeni u svega dva uzoraka. U vezivnom tkivu nalazio se mali broj krvnih sudova normalne strukture sa znacima umerene kongestije, što se moglo oceniti za CS i CS-HA ocenom 2.8 i 2.5, a za MTA ocenom 2.4. U zoni neposredno oko mesta gde je bila implantirana cevčica sa testiranim materijalom uočena je nežna kapsula, koja je bila najtanja kod materijala CS (1.8) (Slika 18), a nešto deblja kod CS-HA (Slika 19) i MTA (ocena 2) (Slika 21), statističke značajnosti, $p=0.377$. Subkapsularno vezivno tkivo kao i sama kapsula pokazivali su znake umerene zapaljenske reakcije. U posmatranim uzorcima uočena je umerena narušenost strukture vezivnog tkiva što je ocenjeno ocenom 3 za CS, i ocenom 2.5 za CS-HA i MTA ($p=0.778$).



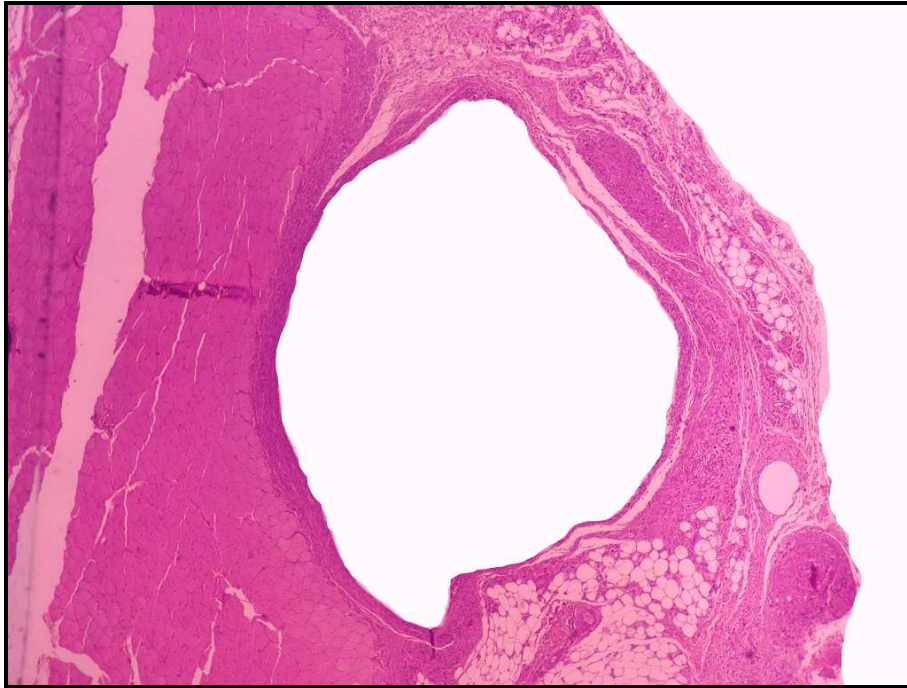
Slika 18. Materijal CS u eksperimentalnom periodu od 7 dana. Uočava se umerena zapaljenska reakcija (ocena 3), a u zapaljenskom infiltratu su retki monociti, limfociti i granulociti. Oko defekta je veoma tanka kapsula (ocena 1.8). (HE, x400)



Slika 19. Materijal CS-HA u eksperimentalnom periodu od 7 dana. Uočava se subkapsularno vezivno tkivo koje pokazuje znake umerene zapaljenske reakcije (ocena 3), sa zapaljenskim infiltratom koga čine limfociti i plazmociti. Formirana je tanka kapsula (ocena 2). (HE, x400)



Slika 20. Materijal MTA u eksperimentalnom periodu od 7 dana. Uočava se perikapsularno vezivno tkivo sa izraženom zapaljenskom reakcijom i izraženom venskom stazom (ocena 3.3). (HE, x400)



Slika 21. Materijal MTA u ekperimentalnom periodu od 7 dana. Na mikrofotografiji uočava se defekta (od cevčice) čiji su zidovi ograničeni tankom kontinuiranom kapsulom(ocena 2). (HE, x100)

Rezultati analize kontrolnih preparata sedam dana posle implantacije prikazani su u Tabeli 5.

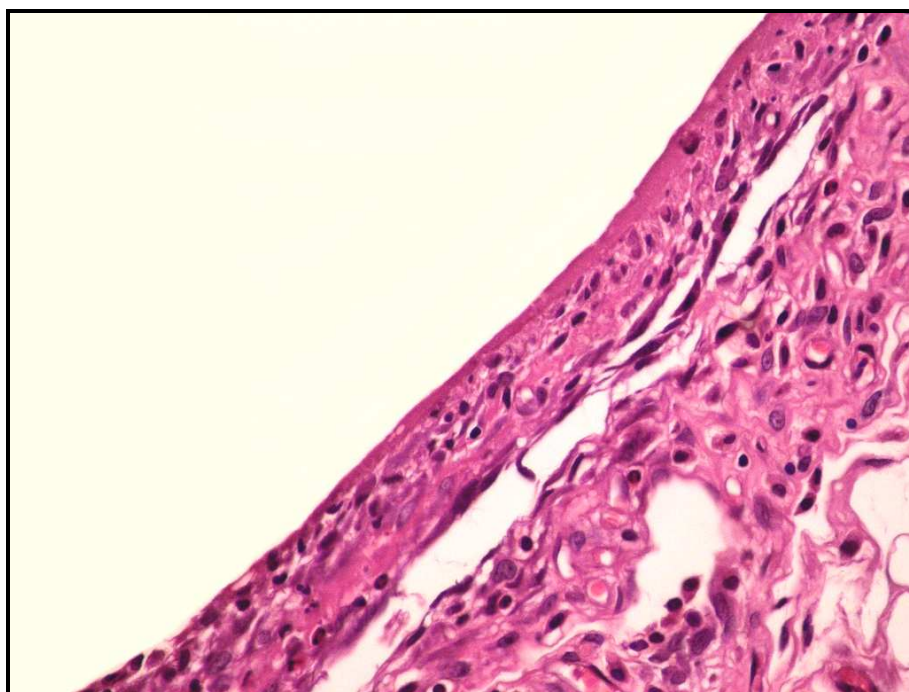
Tabela 5. Rezultati histološke analize za kontrolne uzorke u opservacionom periodu od 7 dana.

REAKCIJA	KONTROLA		
	CS	CS-HA	MTA
1. Zapaljenska reakcija			
0 - odsutno 1 - minimalno < 25 ćelija 2 - blaga 26 - 50 ćelija 3 - umerena 51 - 100 ćelija 4 - izrazita > 100 ćelija	3.2	2.75	2.5
2. Vaskularna kongestija			
0 - odsutno 1 - minimalno 2 - blaga 3 - umerena 4 - izrazita, sa pucanjem krvnog suda	3.4	2.75	2.7
3. Kapsula			
0 - odsutna 1 - minimalna 2 - tanka 3 - umereno debela 4 - debela	1.2	1.5	1.4
4. Očuvanje integriteta vezivnog tkiva			
0 - kompletno 1 - minimalna narušenost strukture 2 - blaga narušenost strukture 3 - umerena narušenost strukture 4 - nekroza	3	1.75	2.4

Testirani materijali: CS - kalcijum silikatni sistemi; CS-HA - kalcijum silikatni sistemi sa hidroksiapatitom; MTA-mineral trioksid agregat

Uočena je umerena do značajna narušenost integriteta vezivnog tkiva koja je bila najjače izražena kod kontrole CS (3), a najslabije kod kontrole CS-HA (1.75). Uočava se destrukcija kolagenih vlakana, bez znakova nekroze i sa znacima kongestije krvnih sudova lociranih u potkožnom masnom tkivu koja je najjače izražena kod kontrole CS (3.4), dok je nešto slabije izražena kod CS-HA

(2.75). Vaskularna kongestija kontrole MTA, koja je ocenjena ocenom 2.7, pokazala je statistički značajnu razliku ($p=0.0128$) u odnosu na MTA. Krvni sudovi locirani u neposrednoj blizini defekta (mesta gde je bila cevčica) nisu pokazivali znake kongestije ili je ona bila blaga. Povećan broj krvnih sudova govori u prilog formiranja mladog granulacionog tkiva i reparacije. Uočena je nežna, tanka kapsula koja mestimično nedostaje, a najbolje je bila razvijena kod kontrole materijala CS-HA (1.5), dok je kod MTA ocenjena ocenom 1.4, a najtanja je bila kod kontrole materijala CS (1.2). U dermalnom vezivnom tkivu bili su prisutni znaci zapaljenske reakcije koja se mogla oceniti kao umereno intenzivna. Kod materijala CS je ocenjena sa 3.2, kod kontrole materijala CS-HA sa 2.75, a kod kontrole MTA 2.5. Čelije zapaljenskog infiltrata pretežno su činili limfociti i plazmociti što govori u prilog hroničnoj zapaljenskoj reakciji (Slika 22). Uočene su i pojedinačne džinovske ćelije što govori u prilog reakcije tkiva na strano telo.



Slika 22. Negativna kontrola (prazna cevčica) u eksperimentalnom periodu od 7 dana. Uočava se umerena narušenost integriteta vezivnog tkiva (ocena 3). U zapaljenskom infiltratu dominiraju limfociti i plazmociti. Prisutna je nežna i tanka kapsula (ocena 1.5). (HE, x100)

5.3.3. Rezultati histološke analize u eksperimentalnom periodu od 15 dana

Rezultati histološke analize su prikazani u Tabeli 6 i 7 i na Slikama 23-29.

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

REAKCIJA	MATERIJALI		
	CS	CS-HA	MTA
1. Zapaljenska reakcija			
0 - odsutno 1 - minimalno < 25 ćelija 2 - blaga 26 - 50 ćelija 3 - umerena 51 - 100 ćelija 4 - izrazita > 100 ćelija	2	1.6	2.3
2. Vaskularna kongestija			
0 - odsutno 1 - minimalno 2 - blaga 3 - umerena 4 - izrazita, sa pucanjem krvnog suda	1.6	0.8	1.3
3. Kapsula			
0 - odsutna 1 - minimalna 2 - tanka 3 - umereno debela 4 - debela	1.6	2.2	2
4. Očuvanje integriteta vezivnog tkiva			
0 - kompletno 1 - minimalna narušenost strukture 2 - blaga narušenost strukture 3 - umerena narušenost strukture 4 - nekroza	1.4	1.6	1.7

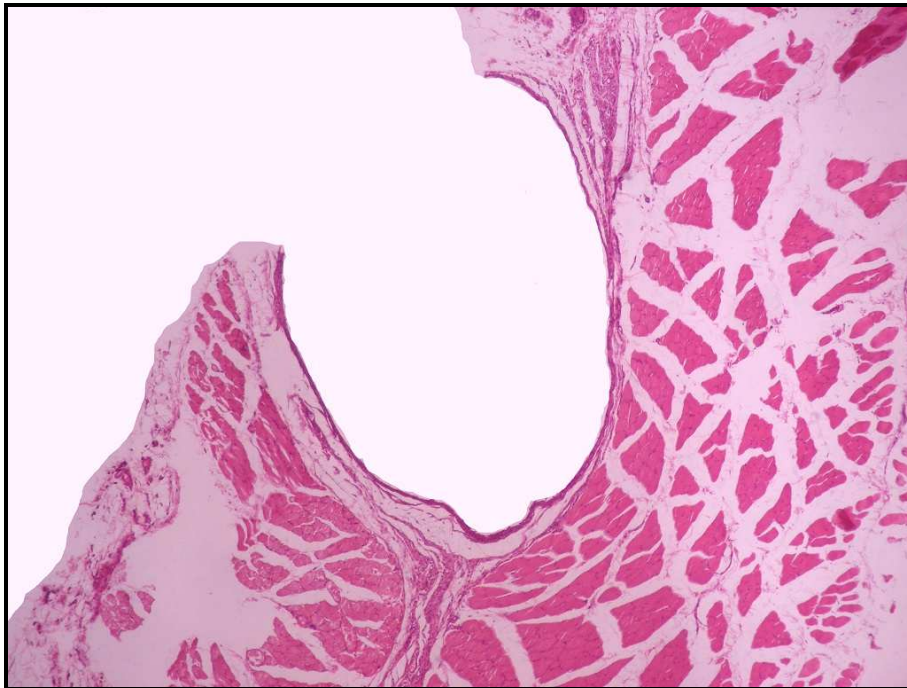
Testirani materijali: CS - kalcijum silikatni sistemi; CS-HA kalcijum silikatni sistemi sa hidroksiapatitom; MTA- mineral trioksid agregat

Na kraju opservacionog perioda od 15 dana svi uzorci (za sve materijale i kontrole) su bili dostupni za histološku analizu.

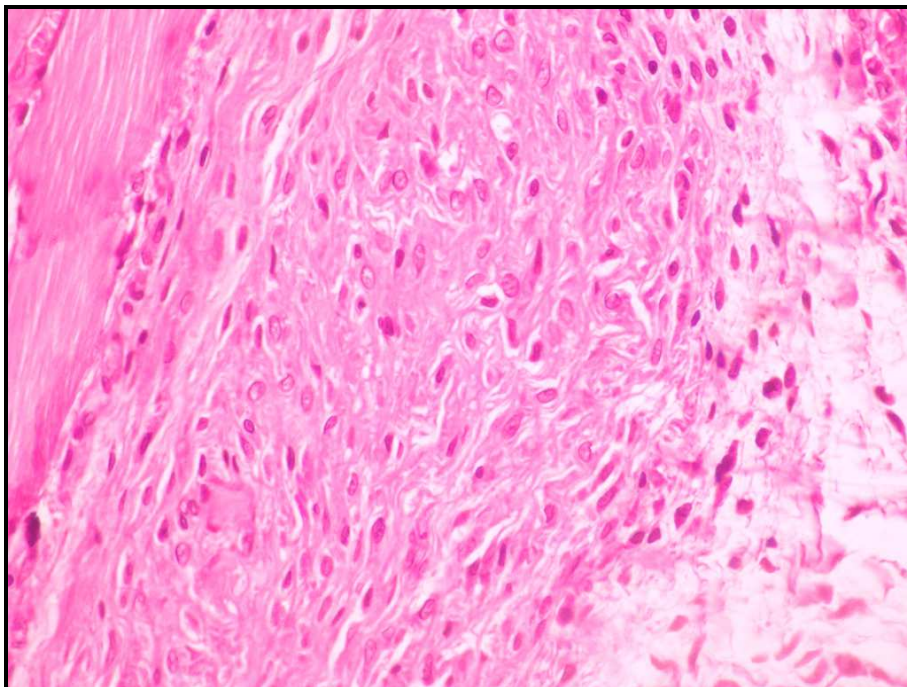
Zarastanje je proteklo uobičajenim tokom, makroskopski bez vidljivih znakova zapaljenske reakcije, bez znakova krvarenja i narušenosti struktura vezivnog tkiva.

Nije bilo statistički značajne razlike ni po jednom parametru između grupa.

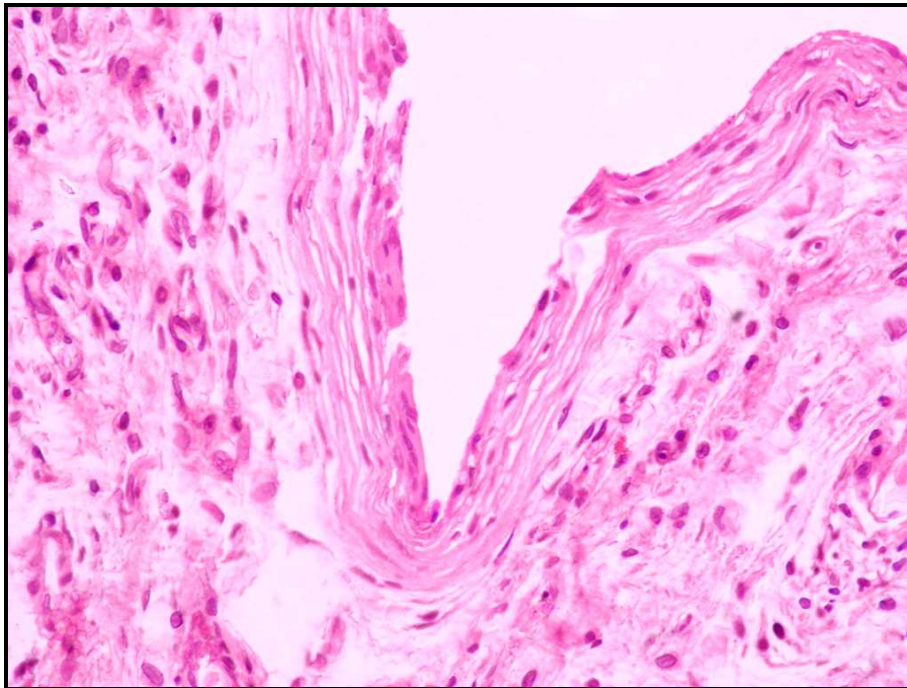
Na posmatranim preparatima 15 dana od implantacije materijala u rastresitom vezivnom tkivu mogao se uočiti minimalan broj ćelija zapaljenskog infiltrata koji se kod CS-HA i CS mogao oceniti kao blago zapaljenje (1.6 i 2) (Slika 23, 24), dok se kod MTA zapaljenje moglo oceniti kao blago do umereno (2.3) (Slika 26). Krvni sudovi su bili normalnog broja sa znacima minimalne venske staze što je za CS-HA ocenjeno ocenom 0.8, dok je za MTA i CS okarakterisana kao minimalna i blaga kongestija (1.3 i 1.6). U vezivnom tkivu uočen je defekt koji odgovara lumenu implantirane cevčice. Zidove defekta je činila kapsula koja je bila najizraženija kod CS-HA (2.2) (Slika 25), nešto tanja kod MTA (2) (Slika 26), a najtanja kod materijala CS (1.6) (Slika 23). U kapsuli nije bilo ćelija zapaljenskog infiltrata, a u perikapsularnom vezivnom tkivu su se nalazili malobrojni limfociti i plazmociti koji su pokazivali perivaskularnu i subkapsularnu distribuciju. Perikapsularno vezivno tkivo je bilo minimalno ili blago narušene strukture, a najmanje je bilo izraženo kod CS (1.4), zatim kod CS-HA (1.6). Kod MTA je ocenjeno ocenom 1.7 (Slika 27).



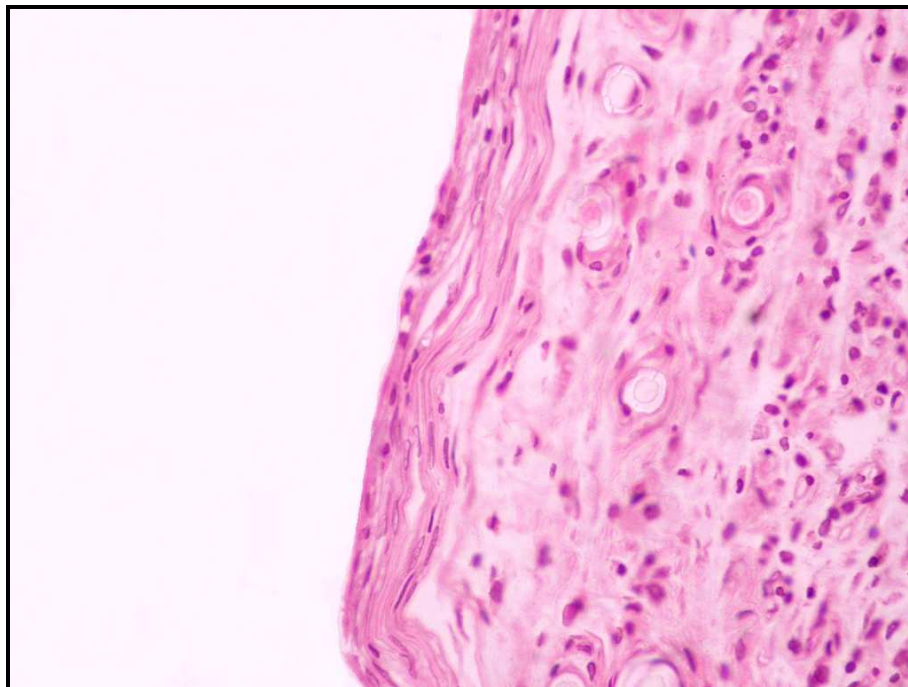
Slika 23. Materijal CS u eksperimentalnom periodu od 15 dana. Uočava se duboka subkutana implantacija koja je dosegala do mišićnog tkiva. Na uzorku se ne uočavaju znakovi zapaljenske reakcije. Prisutna je tanka kapsula koja čini zidove defekta (ocena 1.6). (HE, x400)



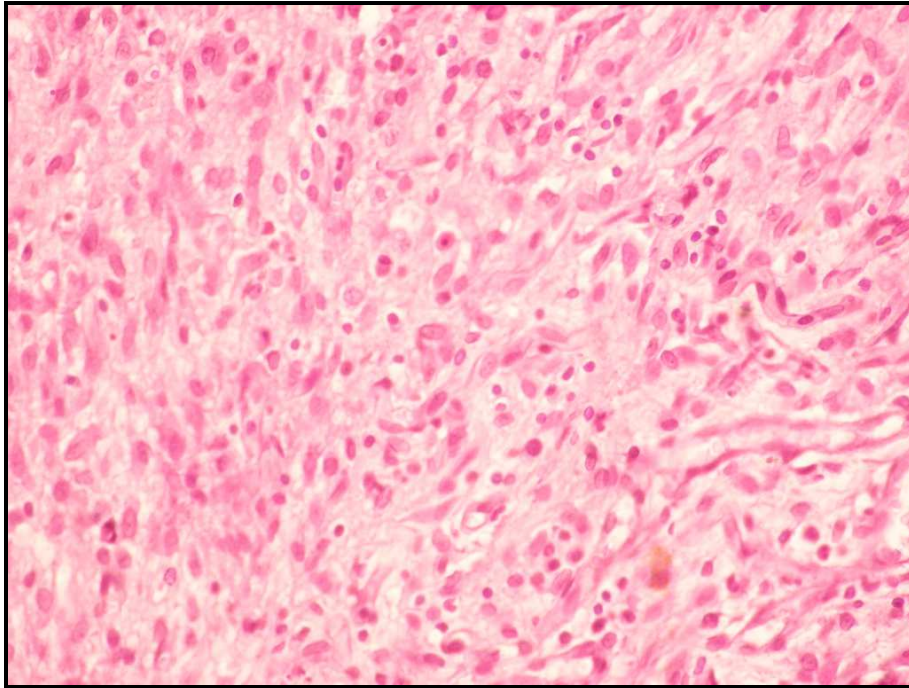
Slika 24. Materijal CS u eksperimentalnom periodu od 15 dana. Uočava se vezivno tkivo koje je najvećim delom očuvanog integriteta, bez venske staze (ocena 1.4). Prisutni su limfociti i plazmociti, što govori u prilog hroničnoj zapaljenskoj reakciji. (HE, x400)



Slika 25. Materijal CS-HA u eksperimentalnom periodu od 15 dana. Uočava se dobro razvijena kapsula (ocena 2.2), sa perikapsularnim vezivnim tkivom sa limfocitima i plazmocitima, perivaskularne i subkapsularne distribucije. (HE, x100)



Slika 26. Materijal MTA u eksperimentalnom periodu od 15 dana. Uočava se formirana tanka kapsula (ocena 2) i perikapsularno vezivno tkivo blago narušenog integriteta. (HE, x100)



Slika 27. Materijal MTA u eksperimentalnom periodu od 15 dana. Uočava se blago narušena struktura sa umerenom infiltracijom ćelija zapaljenskog infiltrata (ocena 1.7). (HE, x400)

Analizom kontrolnih uzoraka (Tabela 7) uočeno je da je reakcija tkiva bila ista kao i kod testiranih materijala.

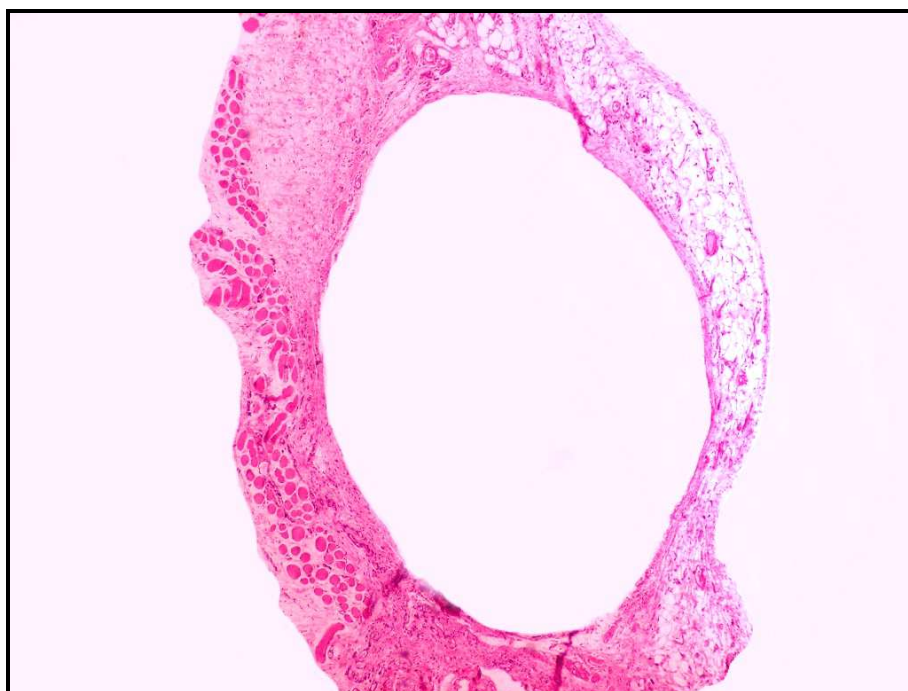
Tabela 7. Rezultati histološke analize kontrolnih uzoraka u opservacionom periodu od 15 dana.

REAKCIJA	KONTROLA		
	CS	CS-HA	MTA
1. Zapaljenska reakcija			
0 - odsutno 1 - minimalno < 25 ćelija 2 - blaga 26 - 50 ćelija 3 - umerena 51 - 100 ćelija 4 - izrazita > 100 ćelija	2	2.2	1.9
2. Vaskularna kongestija			
0 - odsutno 1 - minimalno 2 - blaga 3 - umerena 4 - izrazita, sa pucanjem krvnog suda	1.8	1.4	1.3
3. Kapsula			
0 - odsutna 1 - minimalna 2 - tanka 3 - umereno debela 4 - debela	1.8	1.8	1.7
4. Očuvanje integriteta vezivnog tkiva			
0 - kompletno 1 - minimalna narušenost strukture 2 - blaga narušenost strukture 3 - umerena narušenost strukture 4 - nekroza	1.5	1.6	1.4

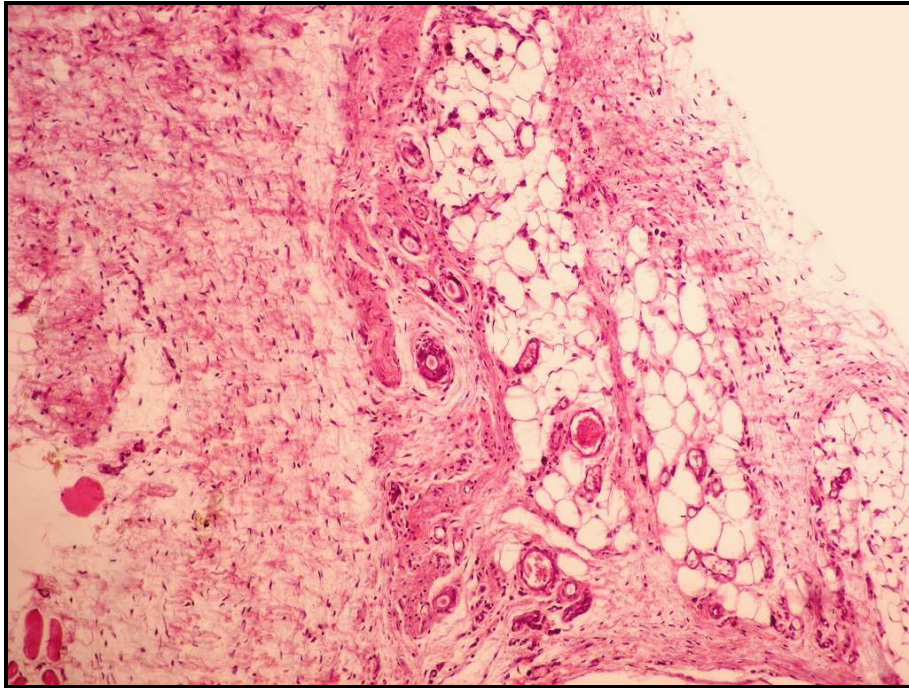
Testirani materijali: CS - kalcijum silikatni sistemi; CS-HA kalcijum silikatni sistemi sa hidroksiapatitom; MTA - mineral trioksid agregat

Zapaljenska reakcija je bila najmanje izražena kod kontrole MTA i ocenjena je kao blaga sa ocenom 1.9 (do 50 ćelija u vidnom polju), dok su kontrolni preparati za CS ocenjeni ocenom 2, a za CS-HA ocenom 2.2. Na svim preparatima je bila formirana tanka kapsula (Slika 28) koja je kod kontrole materijala CS i CS-HA ocenjena ocenom 1.8, dok je kod MTA bila nešto tanja i

ocenjena je sa 1.7. U kapsuli nije bilo ćelija zapaljenskog infiltrata. U perikapsularnom tkivu mogao se uočiti veliki broj krvnih sudova što govori u prilog neoangiogeneze i reparatornih procesa (Slika 29). Vaskularna kongestija je bila najmanje izražena kod MTA (1.3), veoma slično kod CS-HA (1.4), dok je kod CS ocenjena kao veoma blaga (1.8). Vezivno tkivo oko kapsule je bilo minimalno narušene strukture i ocenjeno je 1.4 za MTA, 1,5 za CS i 1.6 za CS-HA.



Slika 28. Negativna kontrola (prazna cevčica) u eksperimentalnom periodu od 15 dana. Uočava se defekt koji odgovara položaju cevčice, čiji su zidovi obavijeni tankom kapsulom (ocena 1.8). (HE, x40)



Slika 29. Negativna kontrola (prazna cevčica) u eksperimentalnom periodu od 15 dana. U perikapsularnom vezivnom tkivu uočava se veliki broj krvnih sudova, što govori u prilog neoangiogeneze. (HE, x400)

5.3.4. Rezultati histološke analize u eksperimentalnom periodu od 30 dana

Rezultati su prikazani u Tabelama 8 i 9 i Slikama 30 - 35.

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

REAKCIJA	MATERIJALI		
	CS	CS-HA	MTA
1. Zapaljenska reakcija			
0 - odsutno 1 - minimalno < 25 ćelija 2 - blaga 26 - 50 ćelija 3 - umerena 51 - 100 ćelija 4 - izrazita > 100 ćelija	1.6	1.4	1.9
2. Vaskularna kongestija			
0 - odsutno 1 - minimalno 2 - blaga 3 - umerena 4 - izrazita, sa pucanjem krvnog suda	0.6	0.6	0.8
3. Kapsula			
0 - odsutna 1 - minimalna 2 - tanka 3 - umereno debela 4 - debela	2	2.6	2.1
4. Očuvanje integriteta vezivnog tkiva			
0 - kompletno 1 - minimalna narušenost strukture 2 - blaga narušenost strukture 3 - umerena narušenost strukture 4 - nekroza	0.4	0.4	1.1

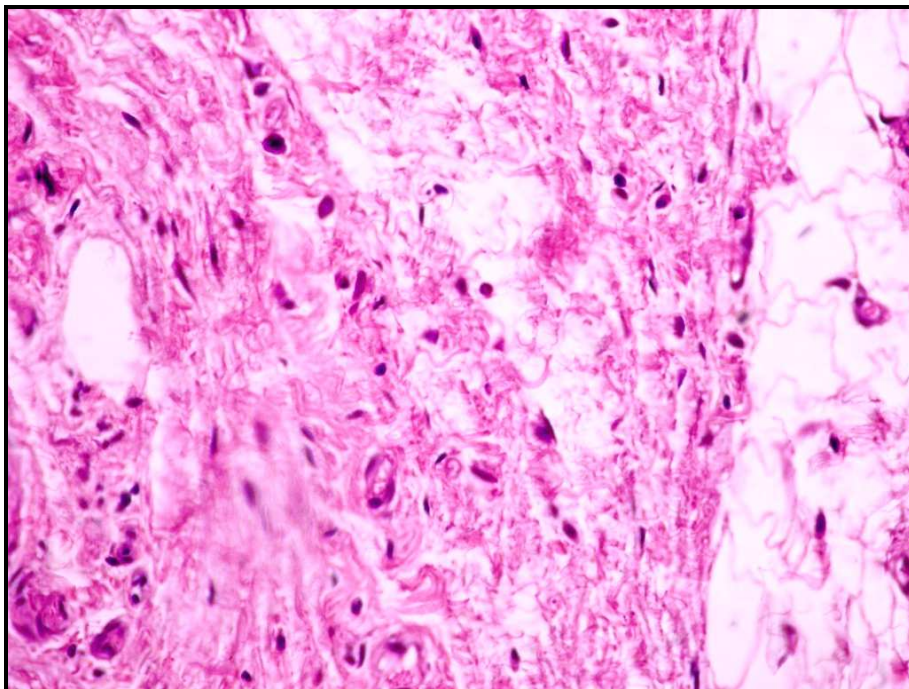
Testirani materijali: CS - kalcijum silikatni sistemi; CS-HA - kalcijum silikatni sistemi sa hidroksiapatitom; MTA - mineral trioksid agregat

Na kraju evaluacionog perioda od 30 dana svi uzorci sa testiranim materijalom CS, MTA i svi kontrolni uzorci bili su dostupni za histološku analizu (po 20 pločica u duplikatu). U grupi gde je testiran CS-HA na kraju evaluacionog perioda bilo je dostupno 18 uzoraka za histološku analizu.

U posmatranim uzorcima 30 dana nakon implantacije cevčica sa materijalima vezivno tkivo je bilo normalne strukture sa minimalnim brojem ćelija zapaljenskog infiltrata kod testiranih materijala CS i CS-HA (Slika 31, 32), gde je zapaljenska reakcija bila ocenjena sa 1.6 odnosno 1.4, ali bez statističke značajnosti. Kod MTA okolno vezivno tkivo je u većini uzoraka pokazivalo znake blagog zapaljenja. Samo se u dva uzorka mogla uočiti, fokalno uz zid kapsule, početna nekroza i tragovi kalcifikacije, sa izraženijom histiocitnom reakcijom što je ocenjeno ocenom 1.9 (Slika 34). Vezivno tkivo je bilo sa uobičajenim brojem krvnih sudova bez znakova venske kongestije i ocenjeno je ocenom 0.6 za CS i CS-HA, a za MTA ocenom 0.8. Na mestu kontakta sa testiranim materijalima uočena je dobro razvijena kapsula koja je kod CS-HA ocenjena sa 2.6 (Slika 32), kod MTA sa 2.1 (Slika 33), dok je kod CS bila nešto tanja i ocenjena je ocenom 2 (Slika 30). Razlika nije bila statistički značajna. Treba istaći da kapsula kod MTA nije bila očuvana u svim preparatima. Okolno vezivno tkivo je bilo normalne strukture (potpuno očuvanog integriteta) kod materijala CS i CS-HA (0.4), a kod MTA je bilo minimalno narušene strukture (1.1).



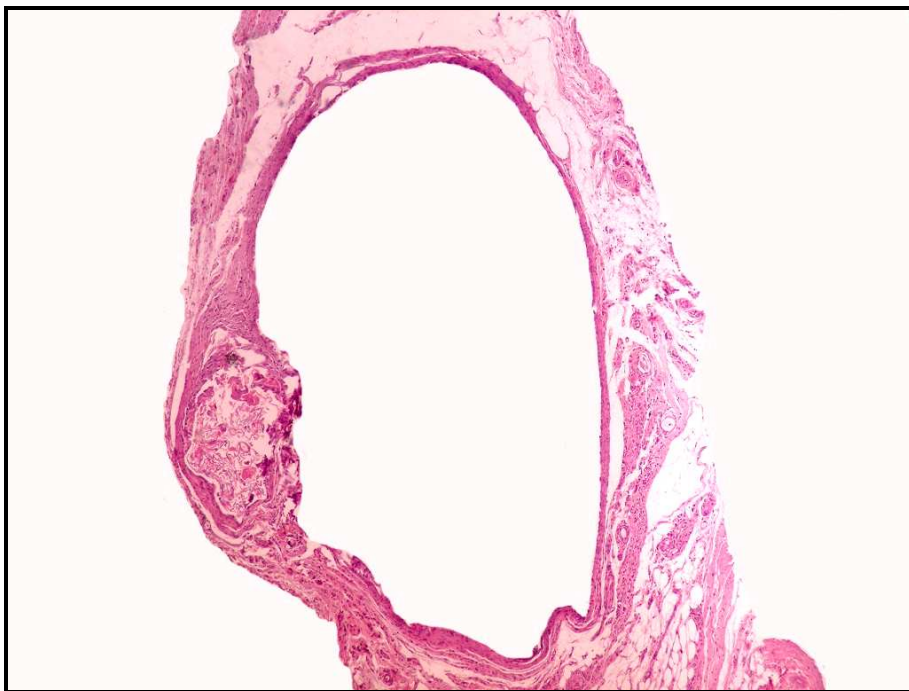
Slika 30. Materijal CS u eksperimentalnom periodu od 30 dana. Na mikrofotografiji uočava se segment dobro razvijene fibrozne kapsule (ocena 2). (HE, x100)



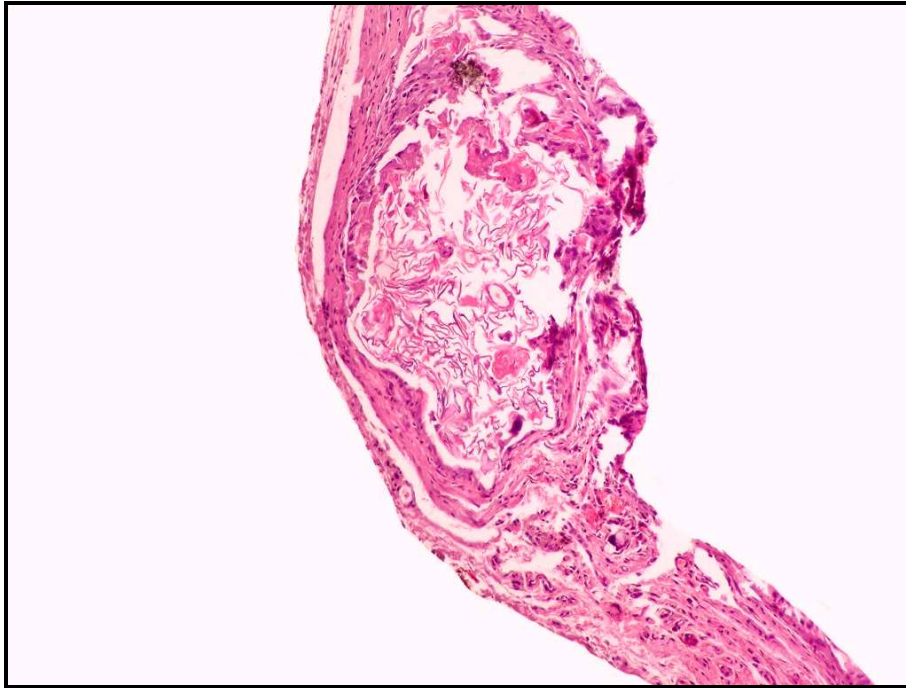
Slika 31. Materijal CS u eksperimentalnom periodu od 30 dana. Uočava se očuvan integritet vezionog tkiva, sa minimalnim brojem ćelija zapaljenskog infiltrata (ocena 0.6). (HE,x400)



Slika 32. Materijal CS-HA u eksperimentalnom periodu od 30 dana. Prikazan je segment dobro razvijene fibrozne kapsule (ocena 2.6). Uočava se perikapsularno vezivno tkivo koje je očuvanog integriteta, sa krvnim sudovima bez znakova kongestije. (HE, x100)



Slika 33. Materijal MTA u eksperimentalnom periodu od 30 dana. Na mikrofotografiji uočava se tanka kapsula očuvanog integriteta (ocena 2.1). (HE, x40)



Slika 34. Materijal MTA u eksperimentalnom periodu od 30 dana. Uočava se fokalno uz zid kapsule početna nekroza i fagocitovane čestice rasutog materijala. Oko ovog fokusa je izražena histiocitna reakcija (ocena 1.9). (HE, x100)

Rezultati histološke analize *kontrolnih uzoraka* posle 30 dana prikazani su u Tabeli 9.

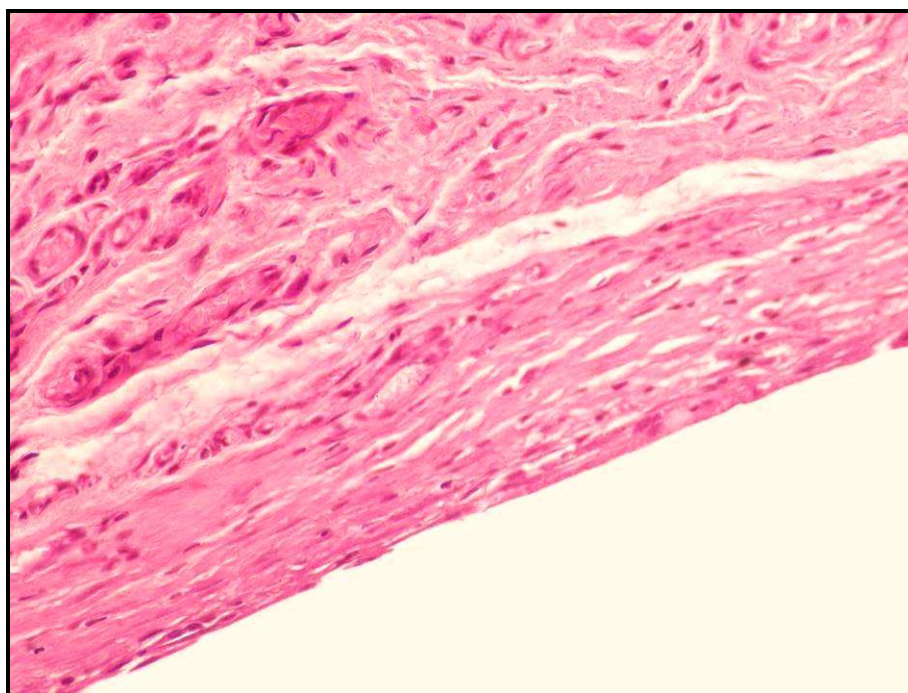
Tabela 9. Rezultati histološke analize kontrolnih uzoraka u opservacionom periodu od 30 dana.

REAKCIJA	KONTROLA		
	CS	CS-HA	MTA
1. Zapaljenska reakcija			
0 - odsutno 1 - minimalno < 25 ćelija 2 - blaga 26 - 50 ćelija 3 - umerena 51 - 100 ćelija 4 - izrazita > 100 ćelija	1.2	1.33	1.5
2. Vaskularna kongestija			
0 - odsutno 1 - minimalno 2 - blaga 3 - umerena 4 - izrazita, sa pucanjem krvnog suda	0.33	0.2	0.2
3. Kapsula			
0 - odsutna 1 - minimalna 2 - tanka 3 - umereno debela 4 - debela	1.8	2	2.3
4. Očuvanje integriteta vezivnog tkiva			
0 - kompletno 1 - minimalna narušenost strukture 2 - blaga narušenost strukture 3 - umerena narušenost strukture 4 - nekroza	1	1	1.1

Testirani materijali: CS - kalcijum silikatni sistemi; CS-HA kalcijum silikatni sistemi sa hidroksiapatitom; MTA - mineral trioksid agregat.

Subepitelno vezivno tkivo bilo je normalnog integriteta i ocenjeno je ocenom 1 za sve kontrole testiranih materijala. Mestimično se uočavao minimalni broj ćelija zapaljenskog infiltrata kojih je bilo najmanje kod CS, gde je zapaljenska reakcija bila ocenjena ocenom 1.2 (manje od 25 ćelija po vidnom polju), potom kod CS-HA (1.33), dok je za MTA zapaljenska reakcija ocenjena sa

1.5. Uočavala se dobro formirana fibrozna kapsula koja je bila najizraženija kod kontrole MTA (2.3) (Slika 35), nešto je bila tanja kod kontrole CS-HA (2) i najtanja kod kontrolnih uzoraka za CS (1.8). Oko kapsule u rastresitom vezivnom tkivu nalazili su se pojedinačni limfociti, granulociti, monociti i makrofagi, što ne predstavlja patološki nalaz. Vezivno tkivo je bilo bez znakova venske staze što je ocenjeno ocenom 0.2 za kontrolu CS-HA i MTA, a za kontrolu CS ocenjeno je ocenom 0.33. Ocenjena vaskularna kongestija kod kontrolnih uzoraka MTA, pokazala je statistički značajnu razliku u odnosu na MTA ($p=0.0275$).



Slika 35. Negativna kontrola (prazna cevčica) u eksperimentalnom periodu od 30 dana. Uočava se dobro formirana kapsula (ocena 2.3), a subkapsularno vezivno tkivo je bez znakova zapaljenja (ocena 1) i venske staze. (HE, x400)

5.3.5. Rezultati histološke reakcije u eksperimentalnom periodu od 60 dana

Rezultati su prikazani u Tabelama 10 i 11 i na Slikama 36 - 41.

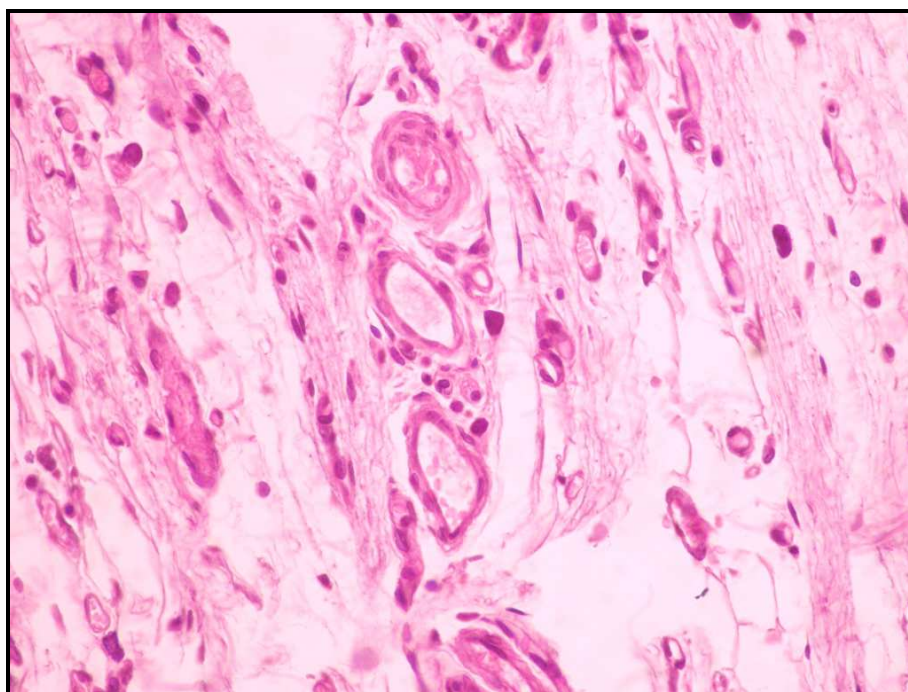
Tabela 10. Rezultati histološke analize u opservacionom periodu od 60 dana.

REAKCIJA	MATERIJALI		
	CS	CS-HA	MTA
1. Zapaljenska reakcija			
0 - odsutno 1 - minimalno < 25 ćelija 2 - blaga 26 - 50 ćelija 3 - umerena 51 - 100 ćelija 4 - izrazita > 100 ćelija	0.5	0.4	0.4
2. Vaskularna kongestija			
0 - odsutno 1 - minimalno 2 - blaga 3 - umerena 4 - izrazita, sa pucanjem krvnog suda	0	0	0.1
3. Kapsula			
0 - odsutna 1 - minimalna 2 - tanka 3 - umereno debela 4 - debela	2.25	2.8	1.9
4. Očuvanje integriteta vezivnog tkiva			
0 - kompletno 1 - minimalna narušenost strukture 2 - blaga narušenost strukture 3 - umerena narušenost strukture 4 - nekroza	0	0	0.2

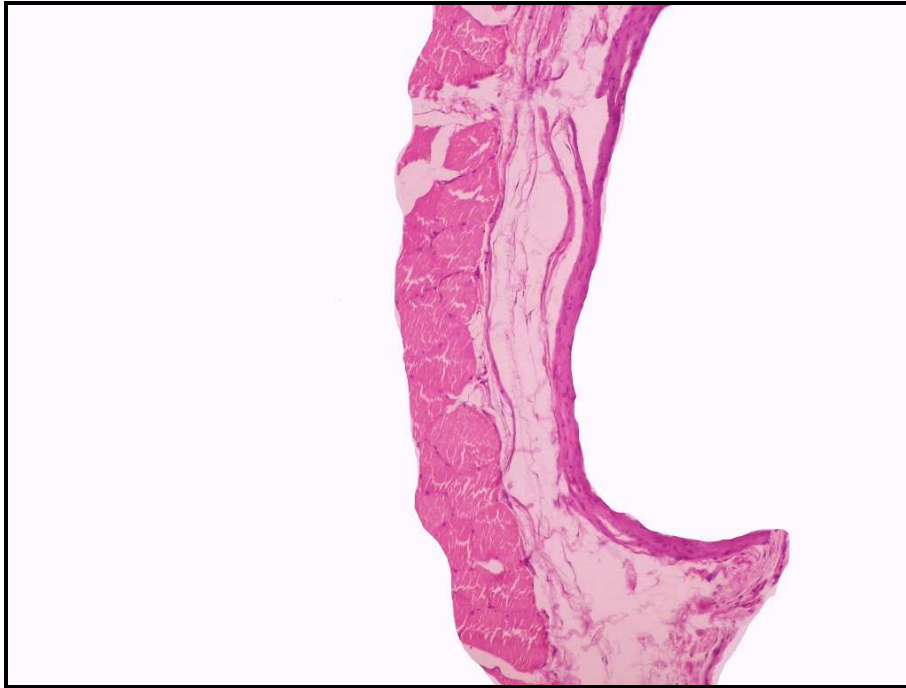
Testirani materijali: CS - kalcijum silikatni sistemi; CS-HA kalcijum silikatni sistemi sa hidroksiapatitom; MTA - mineral trioksid agregat.

Na kraju evaluacionog perioda od 60 dana za histološku analizu bili su dostupni uzorci iz 9 životinja sa testiranim materijalima, jer u jednoj životinji nisu pronađene tubice sa materijalom CS kao ni njegove kontrole (pozitivna i negativna).

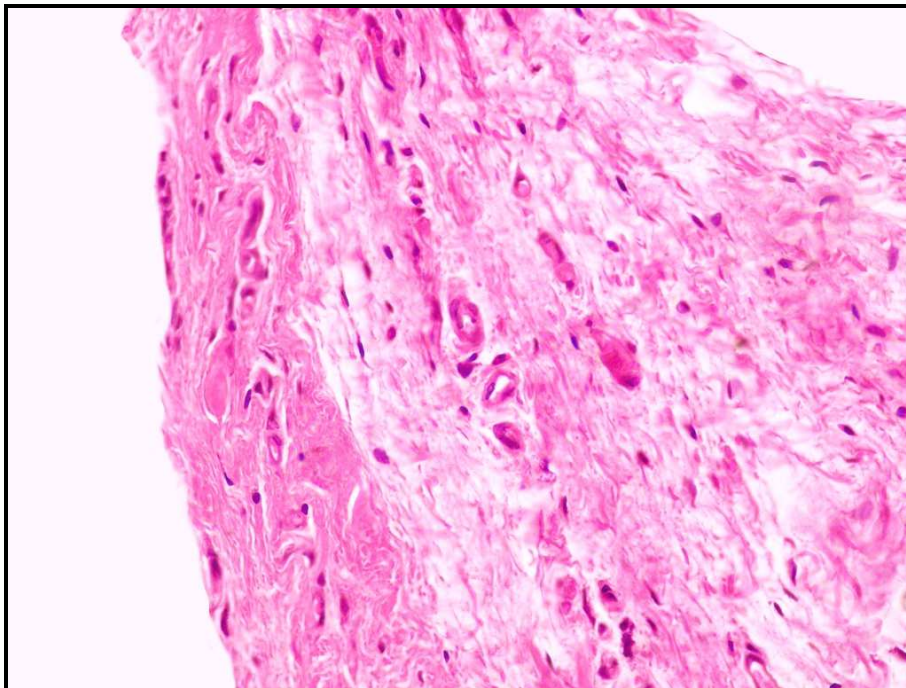
U ispitivanim uzorcima 60 dana od početka eksperimenta moglo se uočiti rastresito vezivno tkivo sa pojedinačnim ćelijama zapaljenskog infiltrata što je odgovaralo oceni 0.4 za CS-HA (Slika 38) i MTA i 0.5 za materijal CS (Slika 36). Uočeni su krvni sudovi koji su normalne strukture i u uobičajenom broju bez znakova venske staze za sve testirane materijale (0). Na mestu kontakta sa materijalima uočena je dobro formiranu kapsula koja se mogla oceniti kao umereno debela za materijal CS-HA (2.8) (Slika 39). U kontaktu sa drugim materijalom, CS, formirana kapsula je ocenjena ocenom 2.25 (Slika 37), dok je najtanju kapsulu posle 60 dana pokazao MTA (1.9), što je bilo statistički značajno u odnosu na CS-HA ($p=0.0039$). Kapsula je u nekim delovima i nedostajala (Slika 40). Vezivno tkivo je bilo očuvanog integriteta (0), uočeni su znaci tkivne remodelacije, tako da je defekt u tkivu bio ispunjen vezivnim tkivom normalne strukture.



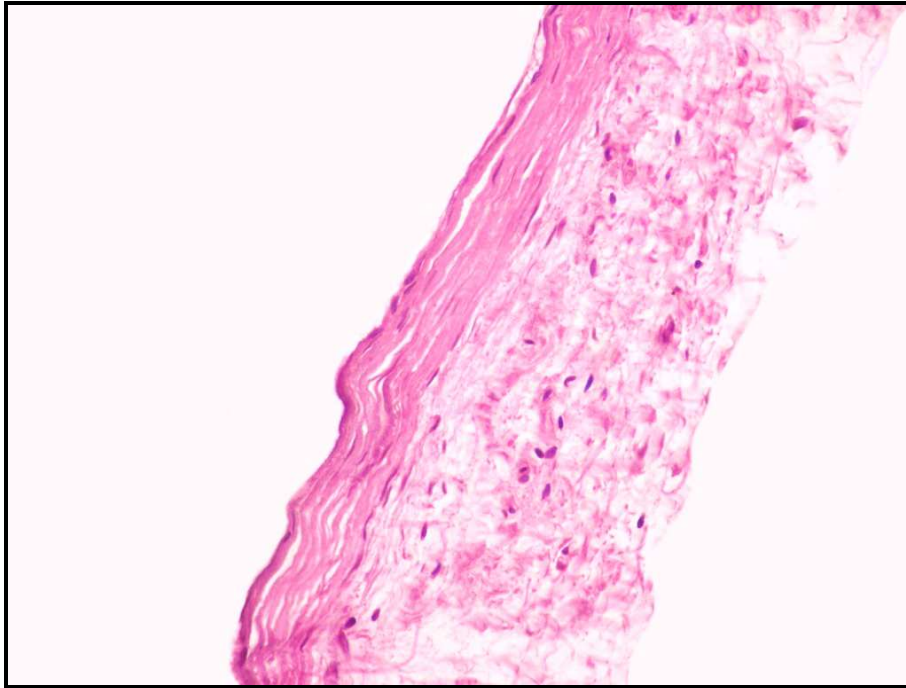
Slika 36. Materijal CS u eksperimentalnom periodu od 60 dana. Uočava se rastresito vezivno tkivo očuvanog integriteta. Prisutne su pojedinačne ćelije zapaljenskog infiltrata (ocena 0.5) i povećan broj mladih krvnih sudova, što ukazuje na tkivnu remodelaciju. (HE, x400)



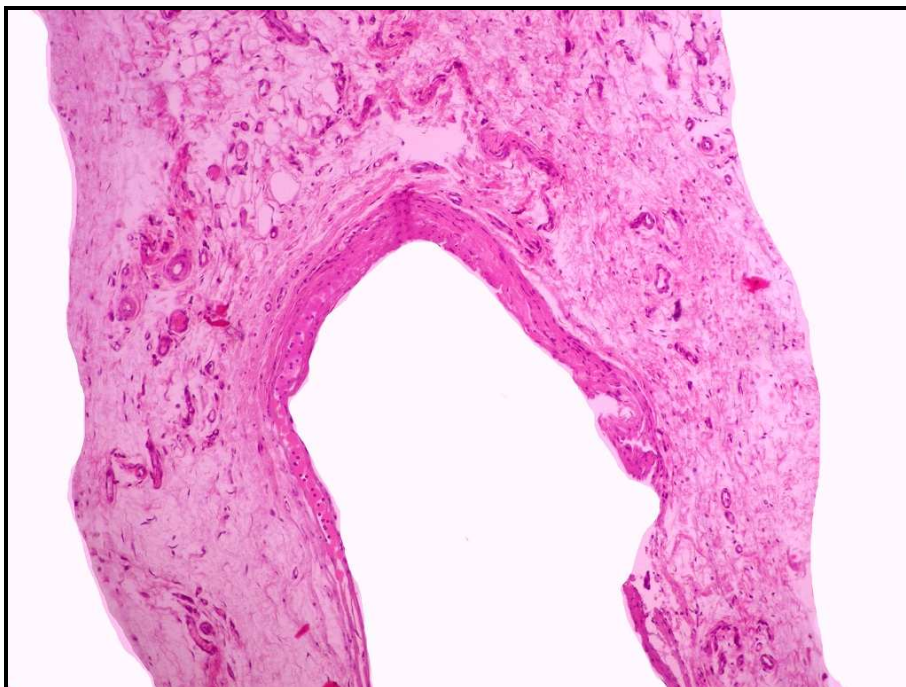
Slika 37. Materijal CS u eksperimentalnom periodu od 60 dana. Uočava se duboka insercija u mišić sa dobro formiranom kapsulom oko defekta (ocena 2.25). Subkapsularno tkivo je bez znakova zapaljenja. (HE, x100)



Slika 38. Materijal CS-HA u eksperimentalnom periodu od 60 dana. Uočava se subkapsularno vezivno tkivo koje je očuvanog integriteta (ocena 0). (HE, x400)



Slika 39. Materijal CS-HA u eksperimentalnom periodu od 60 dana. Uočava se dobro razvijena fibrozna kapsula oko defekta (ocena 2.8). (HE, x100)



Slika 40. Materijal MTA u eksperimentalnom periodu od 60 dana. Uočava se vezivno tkivo očuvanog integriteta sa retkim celularnim elementima, histiocitima (ocena 0.5). Prisutna je i kapsula, različite debljine i sa diskontinuitetom (ocena 1.9). (HE, x100)

Rezultati histološke analize *kontrolnih uzoraka* posle 60 dana prikazani su u Tabeli 11.

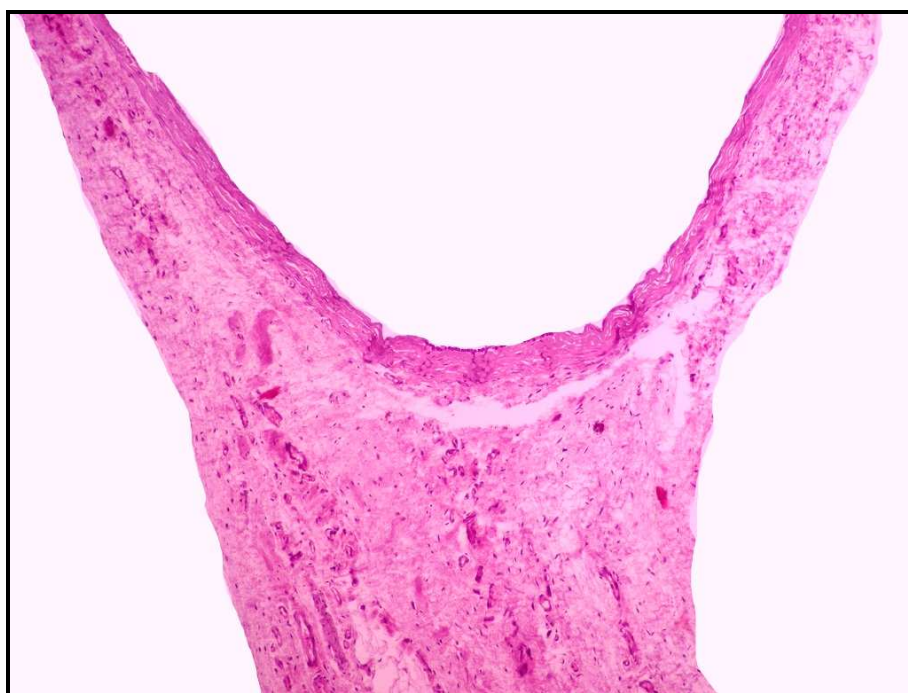
Tabela 11. Rezultati histološke analize za kontrolne uzorke u opservacionom periodu od 60 dana.

REAKCIJA	KONTROLA		
	CS	CS-HA	MTA
1. Zapaljenska reakcija			
0 - odsutno 1 - minimalno < 25 ćelija 2 - blaga 26 - 50 ćelija 3 - umerena 51 - 100 ćelija 4 - izrazita > 100 ćelija	0.5	0.4	0.7
2. Vaskularna kongestija			
0 - odsutno 1 - minimalno 2 - blaga 3 - umerena 4 - izrazita, sa pucanjem krvnog suda	0	0	0.2
3. Kapsula			
0 - odsutna 1 - minimalna 2 - tanka 3 - umereno debela 4 - debela	1.4	2.2	2.1
4. Očuvanje integriteta vezivnog tkiva			
0 - kompletno 1 - minimalna narušenost strukture 2 - blaga narušenost strukture 3 - umerena narušenost strukture 4 - nekroza	0.25	0	0.2

Testirani materijali: CS - kalcijum silikatni sistemi; CS-HA - kalcijum silikatni sistemi sa hidroksiapatitom; MTA- mineral trioksid agregat.

U posmatranim uzorcima *kontrolnih preparata* moglo se uočiti vezivno tkivo dermisa očuvanog integriteta kod materijala CS-HA (0), dok je za materijale MTA i CS ocenjeno ocenom 0.2 i 0.25 (Slika 41). Uočen je i veliki broj novih, mladih krvnih sudova, a okolno tkivo je bilo bez znakova zapaljenske

reakcije ili je ona bila ocenjena kao reakcija minimalnog inteziteta (bez ili do 25 ćelija u vidnom polju). Najniži intenzitet zapaljenske reakcije bio je zabeležen kod kontrole CS-HA (0.4), zatim kod CS (0.5) i kod MTA (0.7) Ćelije zapaljenskog infiltrata imale su lokalnu perivaskularnu distribuciju. Zidove defekta, nastalog implantacijom cevčice, činila je tanka kapsula (Slika 41), dok je defekt u celini bio ispunjen vezivnim tkivom. Najrazvijeniju kapsulu je imala kontrola materijala CS-HA (2.2), potom MTA (2.1), a nešto tanju kontrola CS (1.4). Kapsula formirana kod kontrolnih uzoraka MTA, pokazala je statistički značajnu razliku u odnosu na MTA ($p=0.0025$). Nije bilo znakova venske staze kod kontrolnih uzoraka materijala CS i CS-HA (0), dok je kod kontrolnih uzoraka MTA ocenjena ocenom (0.2), ali bez statističke značajnosti.



Slika 41. Negativna kontrola (prazna cevčica) u eksperimentalnom periodu od 60 dana. Uočava se vezivno tkivo očuvanog integriteta (ocena 0). Prisutne su ćelije zapaljenskog infiltrata (do 25 ćelija u vidnom polju) koje pokazuju osobine lokalne perivaskularne distribucije. Uočava se i formirana tanka kapsula (ocena 2.2). (HE, x40)

U tabelama 12 i 13 su prikazane srednje vrednosti skorova za intenzitet zapaljenske reakcije i debljinu fibrozne kapsule praćene kroz sve evaluacione periode za oba testirana materijala i kontrolne uzorke.

Uočava se trend opadanja intenziteta zapaljenske reakcije (od 7 do 60 dana), koji je najizraženiji za materijal CS-HA (Tabela 12). U isto vreme sa iščezavanjem ćelija zapaljenskog infiltrata, uočava se formiranje fibrozne kapsule oko testiranih materijala u funkciji vremena. Najizraženija kapsula od 7, pa do 60 dana eksperimenta uočena je kod materijala CS-HA (Tabela 13).

Tabela 12. Srednja vrednost skorova inflamacije i standardna devijacija

	7 dana	15 dana	30 dana	60 dana
CS	3,00±0,71	2,00±0,71	1,60±0,55	0,50±0,58
CS-HA	3,00±0,82	1,60±0,55	1,40±0,55	0,20±0,45
MTA	3,30±0,48	2,30±1,06	1,90±0,88	0,44±0,73
Kontrola	2,50±1,43	1,90±0,74	1,50±0,53	0,67±1,00

Tabela 13. Srednja vrednost skorova kapsule i standardna devijacija

	7 dana	15 dana	30 dana	60 dana
CS	1,60±0,89	2,00±0,00	2,00±0,71	2,25±0,50
CS-HA	2,00±1,41	2,20±0,84	2,60±0,55	2,80±0,45
MTA	1,80±0,79	2,00±0,47	2,10±0,57	2,00±0,50
Kontrola	1,40±0,97	1,70±0,48	2,30±0,48	2,11±0,33

5.4. REZULTATI ISPITIVANJA BIOAKTIVNOSTI NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA: *IN VIVO* STUDIJA DIREKTOG PREKRIVANJA PULPE NA ZUBIMA KUNIĆA

U ovom poglavlju predstavljeni su rezultati *in vivo* istraživanja direktnog prekrivanja eksponirane pulpe na zubima kunića. Testirani su mineral trioksid agregat (MTA), kalcijum silikatni sistemi (CS) i kalcijum silikatni sistemi sa hidroksiapatitom (CS-HA).

Rezultati su prikazani u Tabelama 14 i 15, i na Slikama 42 – 59.

Tabela 14. Srednja vrednost skorova inflamacije i standardna devijacija

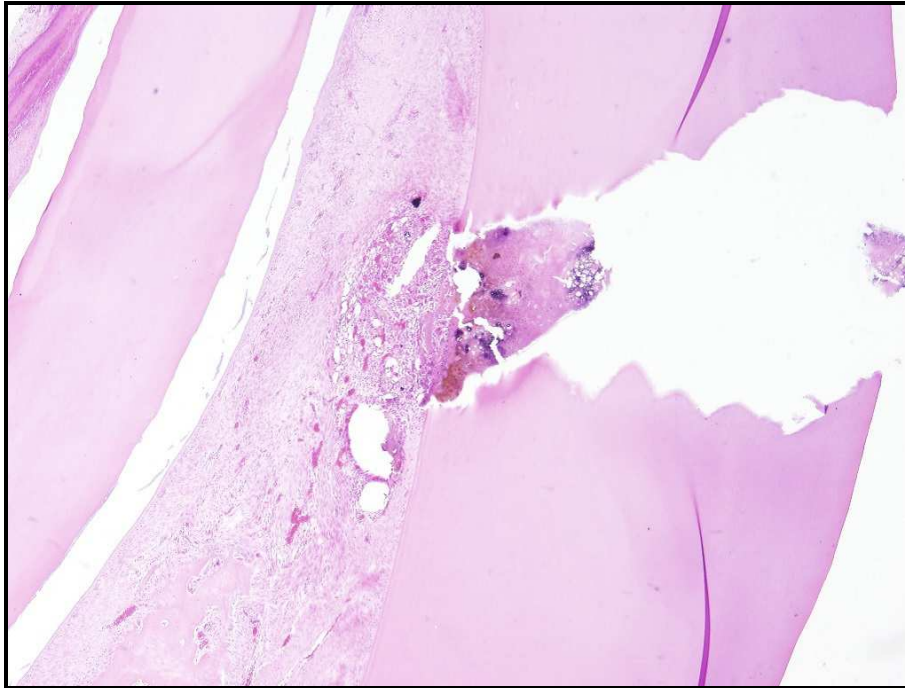
	Intenzitet	Raširenost	Generalno stanje pulpe
MTA	2,67±1,53	2,67±1,15	2,67±1,15
CS	1,83±0,75	2,17±0,75	1,50±0,55
CS-HA	3,00±0,63	2,17±0,41	2,17±0,41

5.4.1. Inflamacija pulpnog tkiva ispod MTA

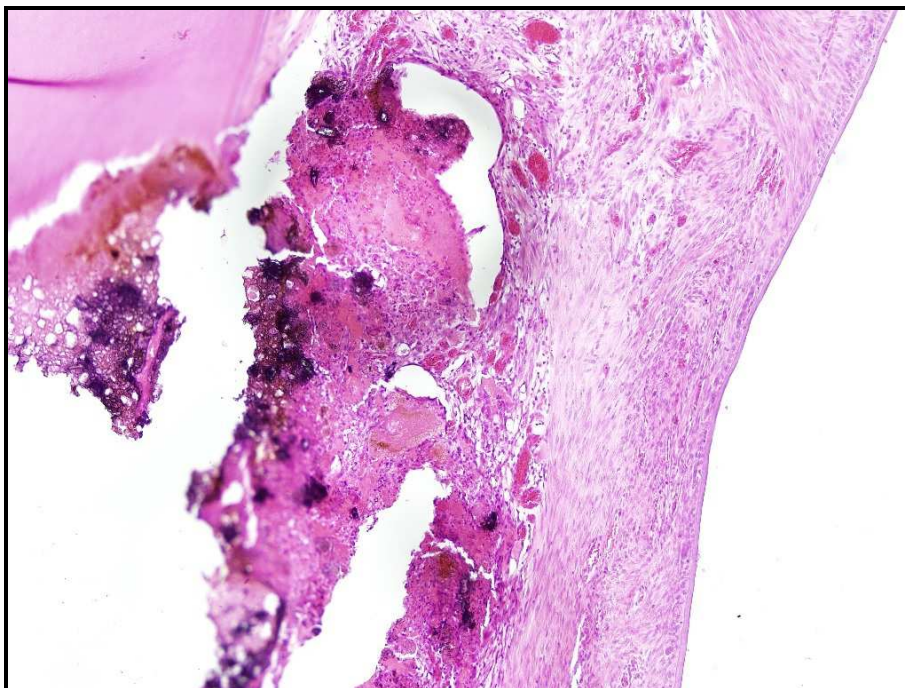
Svi uzorci gde je kao materijal za direktno prekrivanje korišćen MTA, pokazivali su znake blagog do umerenog zapaljenja (*Slika 42*), sa nekoliko inflamatornih ćelija neposredno oko mesta eksponirane pulpe. U jednom uzorku konstatovana je intenzivna zapaljenska reakcija, gde je cela koronarna pulpa bila infiltrirana zapaljenskim ćelijama i gde je konstatovana nekroza (*Slike 43 i 44*).

Prisustvo malobrojnih gigantskih ćelija bilo je uočeno u dva uzorka (*Slika 45*), gde su primećeni i partikuli fagocitovanog materijala. (*Slika 46*).

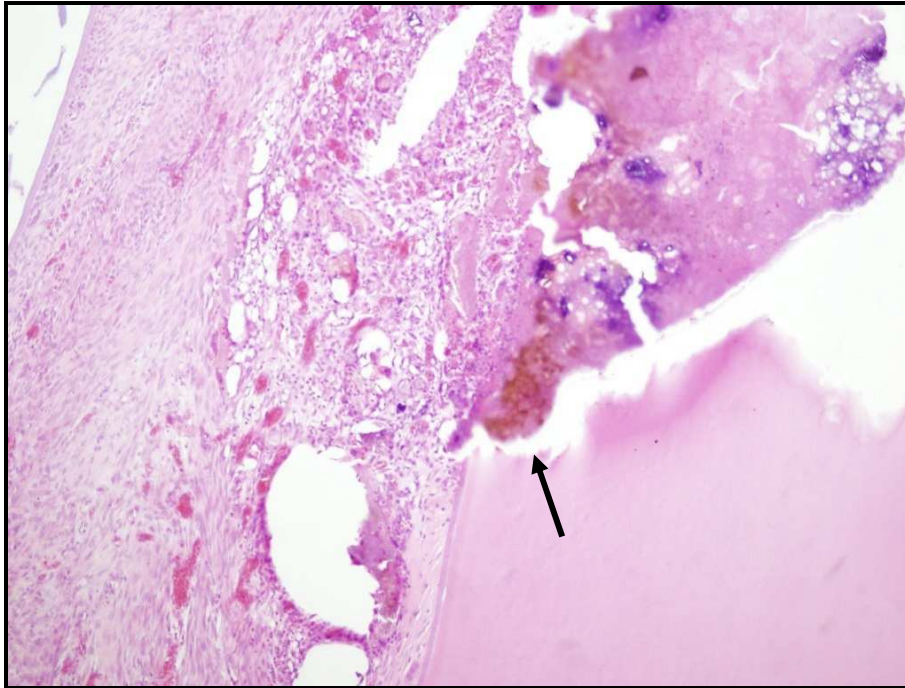
Ni u jednom uzorku nisu bile detektovane bakterije.



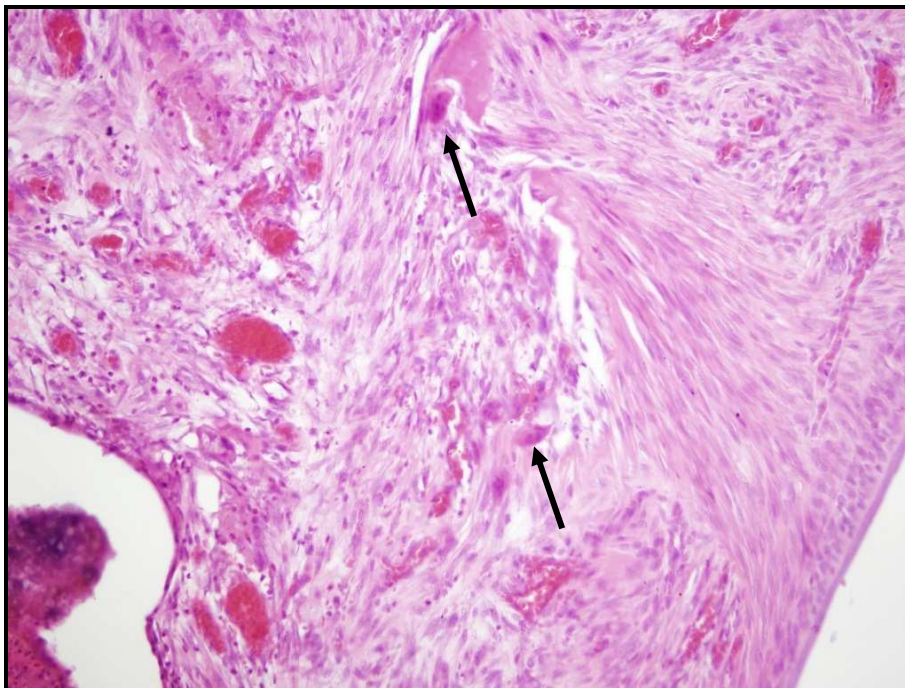
Slika 42. Materijal MTA. Defekt u zubnoj gleđi (pristupni kavitet). Reaktivno zapaljenje umerenog intenziteta sa česticama materijala za direktno prekrivanje. (HE,x40)



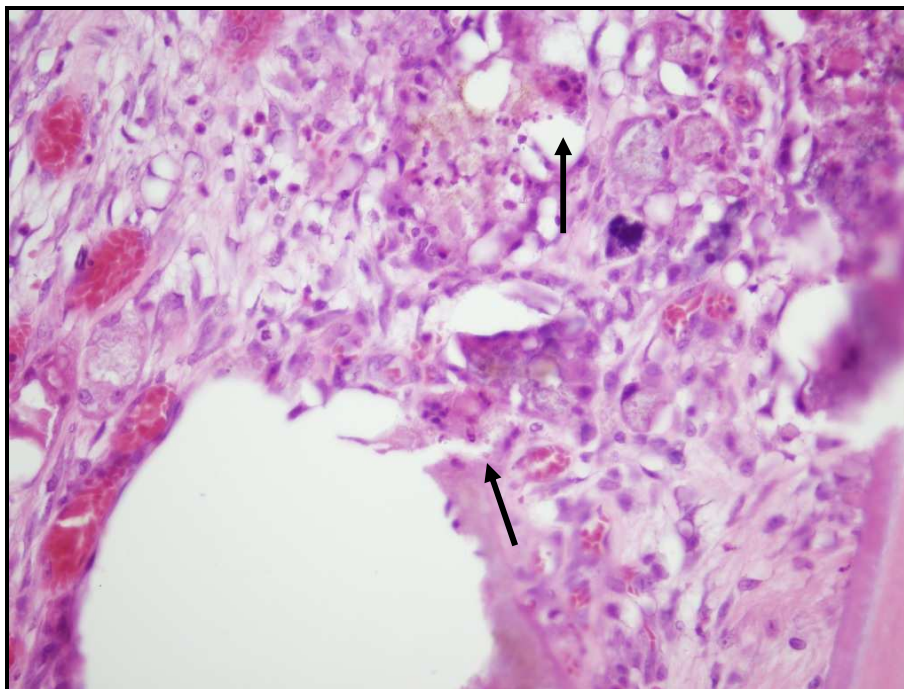
Slika 43. Prisutne rasprostranjene zone nekroze oko partikula MTA. Krvni sudovi pokazuju znake akutne hiperemije. (HE, x100)



Slika 44. Detalj sa prethodne mikrofotografije. Fokus nekroze (strelica) uz naglašenu aktionu hiperemiju. (HE, x100)



Slika 45. Materijal MTA. Oko partikula materijala prisutne retke džinovske ćelije tipa oko stranog tela (strelice). (HE, x200)



Slika 46. Materijal MTA. Umerena zapaljenska reakcija sa fagocitovanim materijalom, brojnim penastim histiocitima i džinovskim ćelijama, tipa oko stranog tela (strelice). (HE, x400)

5.4.2. Inflamacija pulpnog tkiva ispod CS

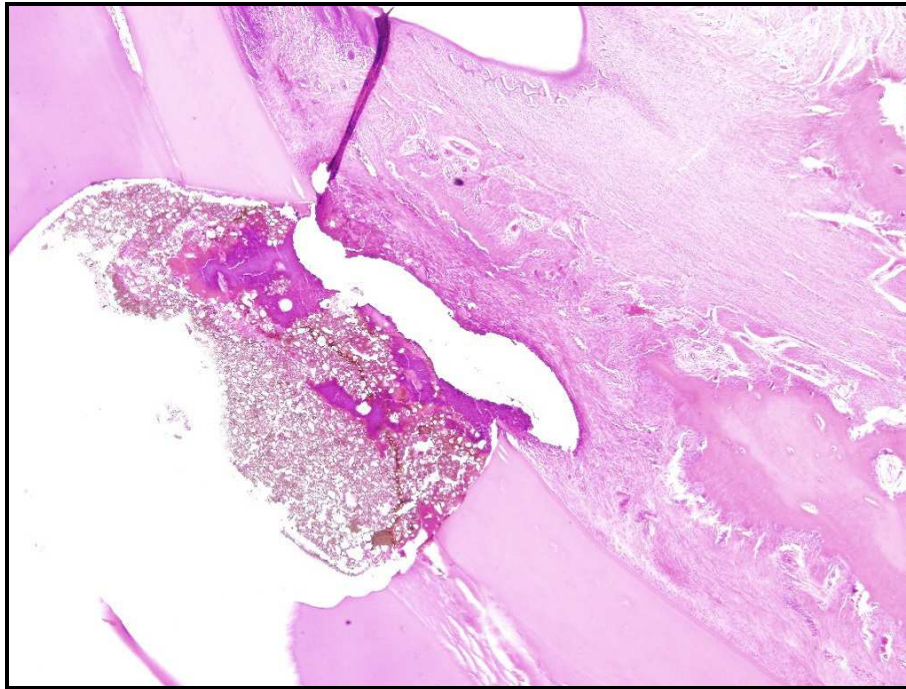
Dva uzorka, gde je kao materijal za direktno prekrivanje korišćen CS pokazivali su potpuno odsustvo zapaljenske reakcije (*Slika 47*). Ostali uzorci pokazivali su blagu zapaljensku reakciju sa manje od 10 zapaljenskih ćelija po polju velikog uveličanja (x400) (*Slika 48*). Samo je jedan uzorak bio ocenjen sa umerenom zapaljenskom reakcijom (*Slika 49*).

Raširenost inflamatorne reakcije bila je ocenjena kao blaga i umerena sa skorom 2 i 3, odnosno zapaljenske ćelije su detektovane samo u neposrednoj blizini implantiranog materijala (*Slika 48*).

Generalno stanje pulpe ukazivalo je na postojanje blage zapaljenske reakcije, što je bilo ocenjeno skorom 2. U pogledu generalnog stanja pulpe nije postojala statistički značajna razlika između testiranih materijala (CS i CS-HA). Postojala je značajna razlika između CS i MTA ($p=0.040$).

U dva uzorka je bio uočen mali broj gigantskih ćelija, koje se nalaze oko čestica rasutog materijala za direktno prekrivanje (*Slika 49*).

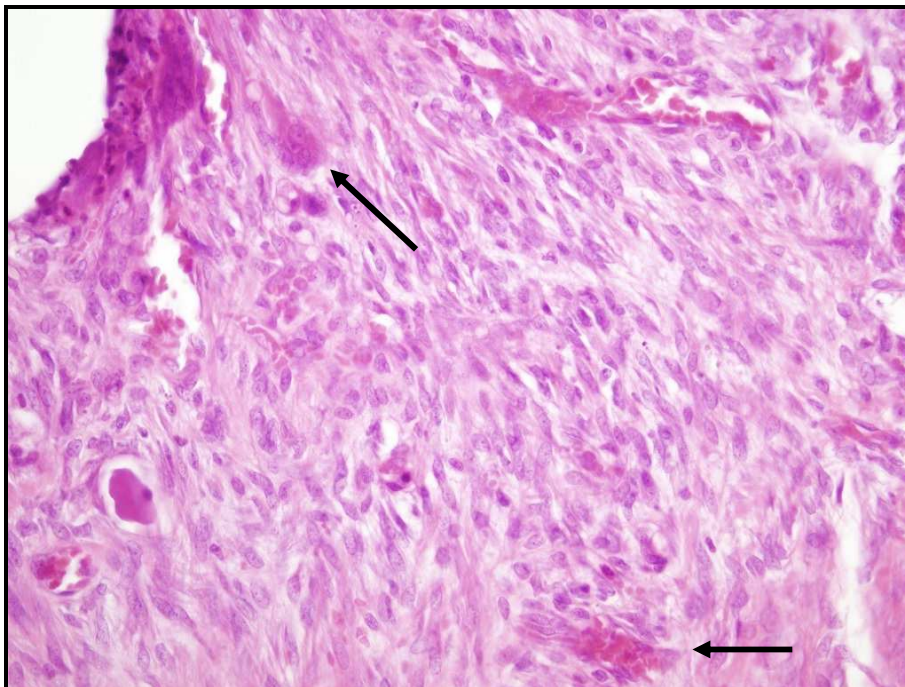
Ni u jednom uzorku nisu detektovane bakterije.



Slika 47. Materijal CS. Defekt u zubnoj gleđi (pristupni kavitet). Reaktivno zapaljenje slabog intenziteta sa prisutni česticama materijala za direktno prekrivanje. (HE, x40)



Slika 48. Materijal CS. Neposredno oko implantiranog materijala uočava se inflamatorni odgovor umerenog intenziteta (skor 2). (HE, x100)



Slika 49. Detalj sa prethodne mikrofotografije (obeležena zona na Slici 48). Reaktivno hronično zapaljenje sa retkim monojedarnim ćelijama i fokalno prisutnim džinovskim ćelijama tipa oko stranog tela (strelice)

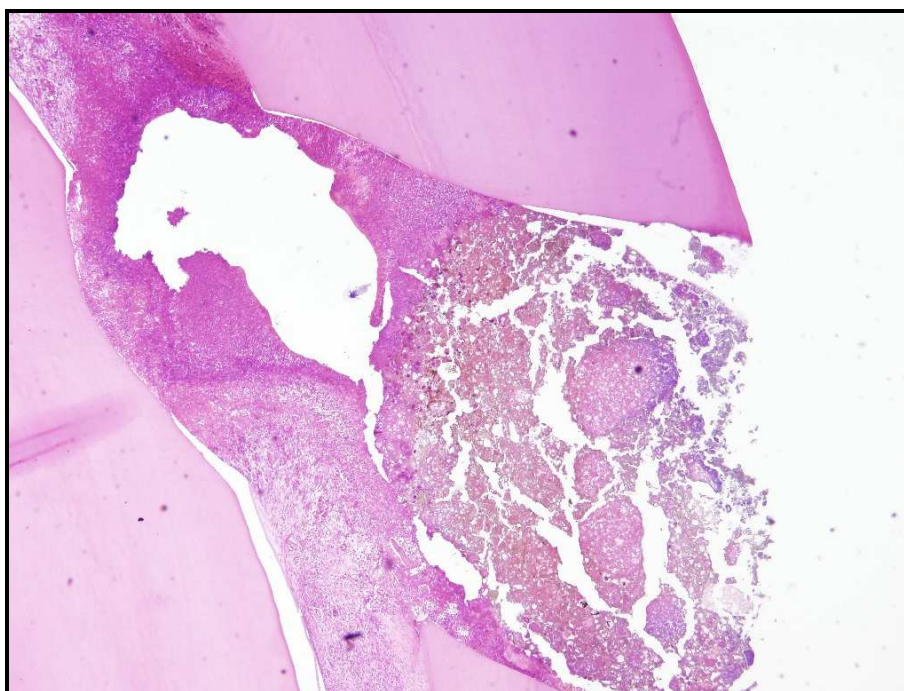
5.4.3. Inflamacija pulpnog tkiva ispod CS-HA

Svi posmatrani uzorci gde je kao materijal za direktno prekrivanje korišćen CS-HA pokazivali su znake umerenog zapaljenja (*Slika 50*), a samo u jednom uzoraku je bilo uočeno intenzivno zapaljenje, što je bilo ocenjeno *skorom* 4, što je statistički značajno u odnosu na CS ($p=0.0036$). Zapaljenski odgovor se javljao samo oko dela eksponirane pulpe.

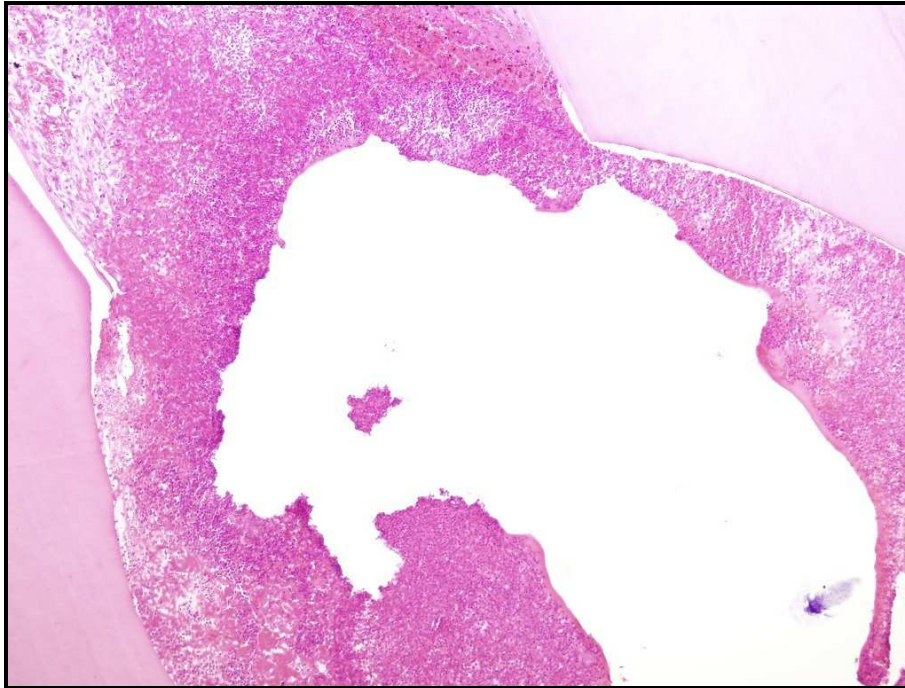
Ukupno stanje pulpe bilo je ocenjeno kao postojanje zapaljenskog odgovora (*skor* 2), a u jednom slučaju je konstatovan apsces, što je bilo ocenjeno *skorom* 3. (*Slika 51*).

U uzorcima je konstatovan znatan broj gigantskih ćelija i rasutih delova materijala (*Slike 52 i 53*), što je statistički značajno u odnosu na CS ($p=0.001$) i na MTA ($p=0.033$).

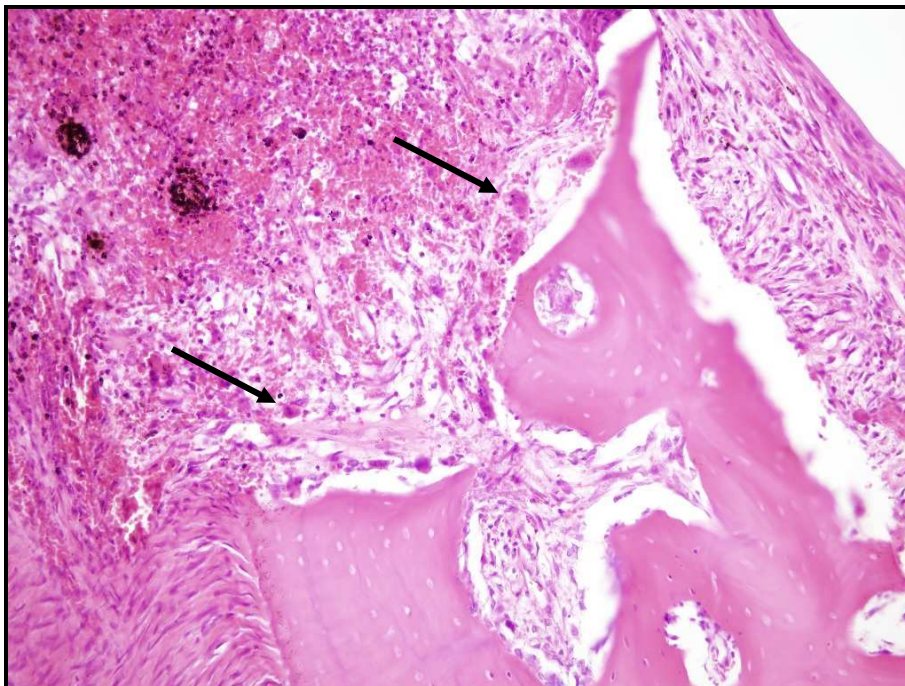
Ni u jednom uzorku nisu detektovane bakterije.



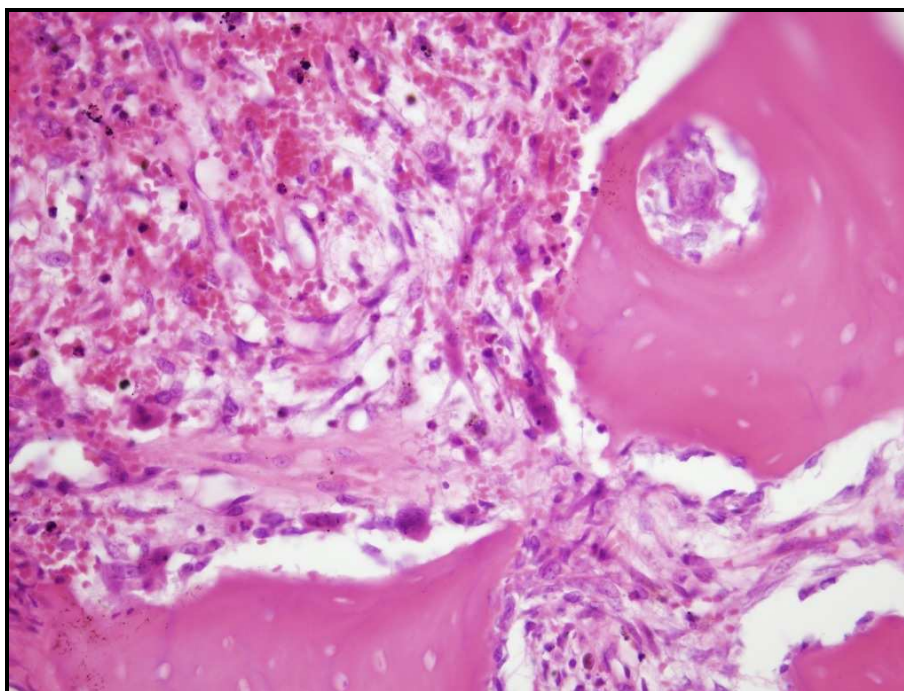
Slika 50. Materijala CS-HA. Defekt u zubnoj gleđi (pristupni kavitet). Implantirani materijal okružen umerenom do intenzivnom inflamatornom reakcijom pulpe sa fokusima nekroze (skor 4) (HE, x40)



Slika 51. Detalj sa prethodne mikrofotografije. Formiranje mikroapscesa oko implantiranog materijala, CS-HA (HE,x100)



Slika 52. U pulpnom tkivu se uočavaju rasute partikule materijala CS-HA okružene brojnim džinovskim ćelijama tipa oko stranog tela (strelice) (HE, x200)



Slika 53. Detalj sa prethodne mikrofotografije. Diskontinualno kalcifikovano tkivo uz brojne džinovske ćelije tipa osteoklasta (HE, x400)

5.4.4. Formiranje novog kalcifikovanog tkiva

Tabela 15. Srednja vrednost skorova kalcifikovanog tkiva i standardna devijacija

	Kontinuitet	Morfologija	Debljina	Lokalizacija
MTA	3,67±0,58	3,67±0,58	3,67±0,58	3,33±0,58
CS	4,00±0,00	3,50±0,55	3,83±0,41	4,00±0,00
CS-HA	3,17±0,41	2,67±0,52	3,17±0,41	2,83±0,98

U ovom kratkom opservacionom periodu, 3, 10 i 14 dana, ni u jednom uzorku nije bilo uočeno formiranje dentinskog mosta u predelu eksponirane pulpe.

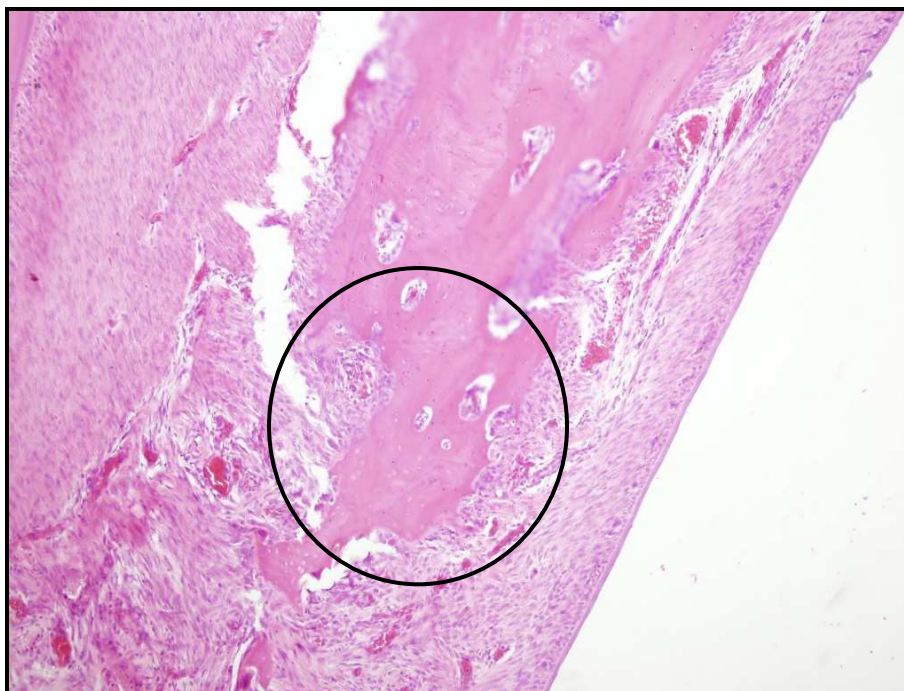
Posmatrajući uzorke sa MTA, na jednom uzorku je bila uočena veoma tanka lateralna depozicija novoformiranog kalcifikovanog tkiva (do 149 μm) u maksilarnom sekutiću posle 10 dana. (Slike 54 i 55)

U uzorcima gde je kao materijal za direktno prekrivanje eksponirane pulpe korišćen CS (posle 10 i 14 dana), konstatovana je depozicija veoma

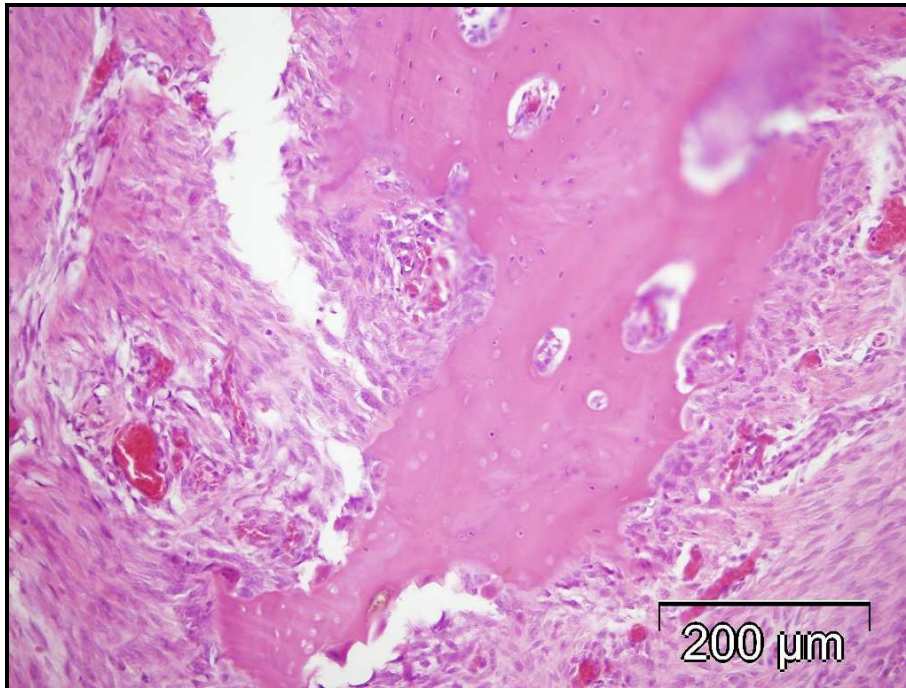
tankog sloja novoformiranog kalcifikovanog tkiva u maksilarnim sekutićima (Slike 56 i 57). Ovo novoformirano kalcifikovano tkivo je bilo regularne strukture, koja je ličila na reparatorni dentin. Na periferiji su uočene mezenhimalne ćelije sa odontoplastnom diferencijacijom.

Ni u uzorcima gde je kao zavoj na pulpnu ranu postavljan CS-HA nije bilo uočeno formiranje kompletnog dentinskog mosta na zubima maksile i mandibule.

Na eksperimentalnim uzorcima posle 10 dana bila je uočena lateralna depozicija veoma tankog, iregularnog sloja novoformiranog kalcifikovanog tkiva (do $149\mu\text{m}$), sa inkluzijama fibrovaskularnog tkiva (Slike 58 i 59).



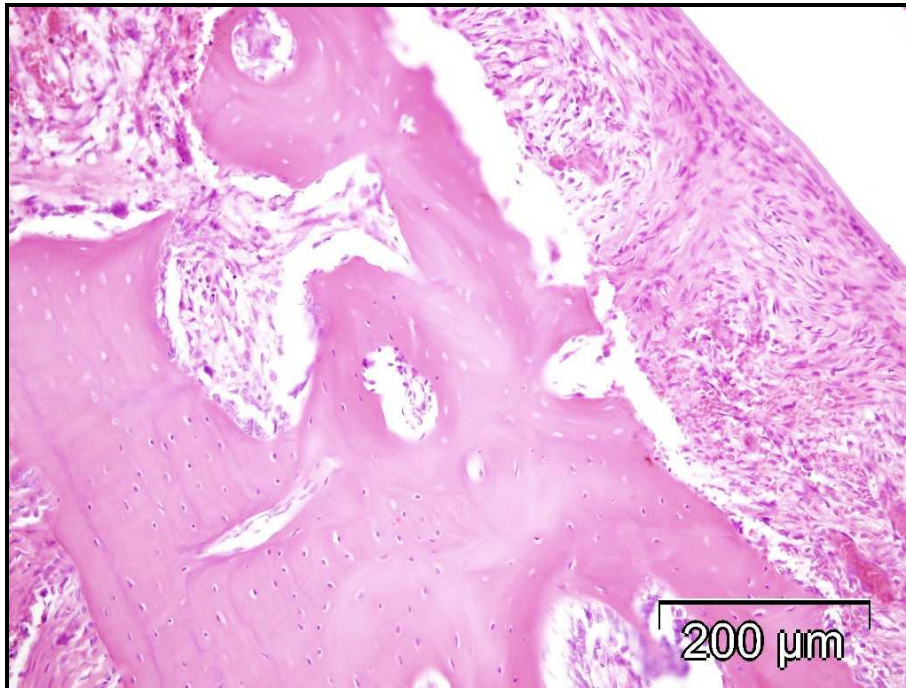
Slika 54. Novoformirano kalcifikovano tkivo ispod MTA, oko koga se uočavaju mezenhimalne ćelije sa odontoplastnom diferencijacijom. (HE, x100)



*Slika 55. Detalj sa prethodne mikrofotografije (obeležena zona na slici 54).
Hipercelularno novostvoreno kalcifikovano tkivo. (HE, x200)*



*Slika 56. Materijal CS. Novoformirano kalcifikovano tkivo regularne strukture,
okruženo mezenhimalnim ćelijama sa odontoplastičnom diferencijacijom (HE, x100)*



*Slika 57. Detalj sa prethodne mikrofotografije (obeležena zona na Slici 56.).
Inscipijentni dentinski most kontinualne strukture. (HE, x200)*



*Slika 58. Materijal CS-HA. Iregularan diskontinuirani most. Između plaža
novostvorenog osteoida prisutno fibrovaskularno tkivo (HE, x40)*



Slika 59. Detalj sa prethodne mikrofotografije. Fibrovaskularno tkivo razdvaja plaže novostvorenog kalcifikovanog tkiva (strelice) (HE, x100)

6. DISKUSIJA

Upotreba novih materijala kao zamena nekih tkiva u organizmu bila je poznata još kod starih civilizacija. Pre više od 2000 godina u zubarstvu je korišćeno zlato, drveni zubi, životinjske kosti.

Početakom XX veka počinje ekspanzija u proizvodnji veštačkih materijala. Njihova proizvodnja i ekonomska cena je bila vrlo povoljna za primenu u medicini, ali potreba za sistematskim proveravanjem, zbog njihove toksičnosti često je onemogućavala njihovu primenu. Danas je u tehnologiji ostvaren ogroman napredak u proizvodnji velikog broja novih i kvalitetnih materijala koji se koriste u kliničkoj praksi. Preduslov za njihovu primenu bio je da se utvrdi interakcija između biomaterijala i tkiva u telu, odnosno da se proveri njihova biokompatibilnost. Razumevanje pojmova i mehanizama u vezi sa ovim pitanjima postalo je osnovni zadatak predkliničkih ispitivanja i upotrebe biomaterijala u medicinske svrhe.

Materijali testirani u ovoj studiji bili su novosintetisani nanomaterijali na bazi trikalcijum i dikalcijum silikata i hidroksiapatita. Prvi materijal, u eksperimentima obeležen kao CS je mešavina β -C₂S i C₃S faze, kalcijum karbonata i barijum sulfata, koji je korišćen kao rendgen kontrastno sredstvo. Drugi materijal, CS-HA je bio mešavina hidroksiapatita (40%) i β -C₂S i C₃S u odnosu 2:1, kalcijum karbonata i barijum sulfata.

Njihova strukturna i biološka svojstva su upoređivana sa mineral trioksid agregatom (MTA), zlatnim standardom trikalcijum silikatnih cemenata. Kalcijum silikatni sistemi, patentirani po prvi put od strane Jokanovića i sar. (2008), dobijeni su, *hidrotermalnom sol-gel metodom i samoširećom reakcijom sagorevanja*, koje obezbeđuju visoku aktivnost i kratko vreme vezivanja materijala.

Kalcijum silikatni cementi privukli su veliku pažnju u ortopediji i stomatologiji zbog svoje odlične biokompatibilnosti i osteogeneze (Chiang

2013). Varijacije Portland cementa kojima je glavna komponenta kalcijum silikat razvijene su za endodontsku primenu kao alternativa MTA-u da bi se prevazišle njegove loše osobine. Pojava novih cemenata na bazi trikalcijum silikata bi trebalo da reši problem vremena vezivanja koje je kod MTA izrazito dugo (4-6 sati), odnosno da spreči otpuštanje teških metala i njihove štetne efekte na okolna tkiva. Novosintetisani materijali su pogodniji za upotrebu u kliničkim uslovima, imaju dobru bioaktivnost i prihvatljivu degradaciju (osobina implantiranog cementa da bude zamenjen prirodnim tkivom) (Grech i sar. 2013).

MTA je kalcijum silikatni hidraulični cement koji se danas koristi za različite endodontske indikacije i to za zatvaranje vrha korena posle apikotomija, za direktno prekrivanje pulpe, zatvaranje perforacija, odnosno kao apikalni čep za zube sa otvorenim apeksom i nezavršenim rastom korena (Parirokh i Torabinejad 2010.)

Bioaktivnost, kao najjače svojstvo MTA, je u njegovom kapacitetu da spontano stvara apatitni sloj na svojoj površini, kad se nađe u kontaktu sa fiziološkim fluidima koji sadrže fosfate (Gandolfi i sar. 2010). Apatitna formacija nastaje preko interakcije Ca^{2+} jona oslobođenih iz MTA sa fosfatima iz tkivnih fluida i smatra se ključem biokompatibilnosti ovog materijala ali i drugih neorganskih biomaterijala (Han i Okiji 2013).

Novosintetisani nanomaterijali korišćeni u ovoj studiji su keramički biomaterijali odn. hidraulični cementi na bazi di- i trikalcijum silikata, trikalcijum aluminata i gipsa. Ovi materijali ispoljavaju svoj bioaktivni potencijal tako što stvaraju apatitni sloj na površini koji je sličan koštanom tkivu i koji se kasnije integriše u okolno tkivo (Liu i sar. 2011). U toku hidratacije njihove hidrofилne komponente prolaze kroz seriju hemijskih reakcija formirajući nanoporozni gel, kalcijum-silikatni hidrat (CSH faza) i rastvorljive frakcije $Ca(OH)_2$ ili portlantid (Jokanović i sar. 2008, Gandolfi i sar. 2010). Formiranje apatitnog sloja na površini kalcijum silikatnih materijala nastaje rastvaranjem portlantida. Ova reakcija dovodi do porasta pH i koncentracije

Ca²⁺ jona, što u tkivnim tečnostima bogatim fosfatima podstiče precipitaciju kristala (Han & Okiji, 2011). Precipitacija apatita ukazuje na visoku bioaktivnost cementa u prisustvu fluida bogatih fosfatima. Ding (2011, 2013) je ukazao da bioaktivnost materijala na bazi SiO₂-CaO ne zavisi od fosfatnih jona koji su u sastavu materijala već od fosfatnih jona iz fluida (tečnosti) sa kojima dolazi u kontakt što utiče na formiranje apatitnog sloja..

Svi cementi na bazi trikalcijum silikata otpuštaju kalcijumove jone što rezultira visokim alkalnim pH vrednostima.

Novosintetisani kalcijum silikatni sistemi iz ove studije, imali su visoke pH vrednosti 12.42 i nakon 21 dan. Slične nalaze dobio je i Grech i sar. (2013a) koji su ispitujući eksperimentalne kalcijum silikatne cemente potvrdili da pH vrednosti rastu od prvog dana postavljanja cementa u vlažnu sredinu i održavaju se tokom 28 dana (u opsegu od 11.7 do 12.4).

Osim dobre biokompatibilnosti, dugogodišnja klinička primena ukazala je na izvesne mane MTA.

Važan zahtev za svaki stalni dentalni materijal je njegova otpornost na degradaciju (rastvorljivost) kad je izložen delovanju oralne sredine tokom dužeg vremenskog perioda. Jedna od mana MTA je ispiranje odn. dezintegracija svežeg materijala posle kontakta sa krvlju ili drugim tkivnim fluidima. Ovo je u najvećoj meri posledica dugog vremena vezivanja ali i strukture samog materijala (Formosa i sar. 2013). Na tržištu su se pojavili novi cementi slični MTA, ali sa dodatkom aditiva koji smanjuju ispiranje materijala (anti-washout agent) kao što su natrijum hijaluronat, natrijum alginat, kitosan ili modifikovani škrob. Međutim, ovi aditivi ne bi smeli uticati na bioaktivnost cementa, smanjivati mu mehaničku otpornost, produžiti vreme vezivanja ili uticati na rendgen kontrastnost materijala. Formosa i sar. (2013) su utvrdili da je dodavanje takvog jednog aditiva MTA-u (na vodenoj bazi sa malom količinom silikona, kalijuma, kalcijuma i hlora) uticalo na skraćanje vremena vezivanja cementa i povećanja otpornosti na pritisak, dok na mikrotvrdoću i rendgenkontrastnost ovi aditivi nisu uticali.

Skraćeno vreme vezivanja smanjuje mogućnost ispiranja materijala i njegovo pomeranje sa mesta aplikacije. Smanjena mogućnost ispiranja je njegovo svojstvo da se odupre dezintergraciji kad dođe u kontakt sa krvlju ili drugim tkivnim tečnostima dok je u svežem stanju (Formosa i sar. 2013).

Chiang (2013.) je utvrdio da pH sredine i dužina izloženosti kiseloj sredini značajno utiču na fizičko hemijska svojstva (promene težine, poroznost, sposobnost istezanja) trikalcijum i dikalcijum silikatnih cementa. Ova degradacija cementa je spor proces, a gubitak težine se može objasniti oslobađanjem rastvorljivih komponenti, najviše Ca(OH)_2 .

Ova studija je potvrdila da je površinska zona čestica praha u direktnoj vezi sa vremenom vezivanja cementne baze materijala. Karakterizacija novih nanostrukturnih materijala CS i CS-HA pokazala je, da vreme vezivanja ovih materijala počinje već posle tri minuta i kompletno je u rasponu od 10 do 15 min, što je značajno kraće u poređenju sa vremenom vezivanja MTA (Jokanović i sar. 2008).

Struktura ovih kalcijum silikatnih sistema (CS) uređena je na tri hijerarhijska nivoa: aglomerati - veličine nekoliko mikrometara, čestice - sa dimenzijama između 117 i 477 nm i kristaliti (veličine oko 19.9 nm) koji pokazuju značajnu aktivnost sistema. Strukture napravljene na 3 hijerarhijska nivoa obećavaju, budući da nisu biološki destruktivne. Dimenzije aglomerata nisu uporedive sa kanalima unutar ćelijskih membrana, dok njihovi nano-elementi (nano-kristaliti) obezbeđuju evidentnu aktivnost, važnu za brzo vezivanje ovih mešavina pri primeni u endodontskoj terapiji. To potvrđuju i nalazu Saghiri-a koji smatra da manja veličina čestica i povećanje površinske zone igraju važnu ulogu u fizičkim i hemijskim svojstvima cementa, pre svega zbog bolje i brže hidratacije čestica, ali i manje poroznosti. Veća poroznost može ubrzati prodor kiseline u površinsku strukturu i smanjiti mikrotvrdoću površine materijala i stvaranje pukotina (Saghiri i sar. 2012).

Učinjeni su napor da se skрати vreme vezivanja kalcijum silikatnih cemenata, dodavanjem različitih aditiva kao što su CaCl_2 (Bortoluzzi i sar.

2006), polimeri (Chng i sar. 2005), plasticizeri (Oliveira i sar. 2010.) ili drugi materijali (Saghiri i sar. 2012) ali bez značajnih rezultata.

Odskora je na tržištu predstavljen novi trikalcijum silikatni cement, Biodentin kome je dodat kalcijum hlorid u tečnoj komponenti kako bi se skratilo vreme vezivanja. (Grech i sar. 2013a). Pokazalo se da ti aditivi uglavnom povećavaju toksičnost i kompromituju fizička svojstva odnosno bioaktivnost materijala (Torabinejad i Parirokh 2010).

Čak i nove formule trikalcijum silikatnih cemenata koje se pojavljuju na tržištu s ciljem da prevaziđu mane MTA, kao što su Biodentine i Bio aggregate, imaju duže vreme vezivanja (45min i 4 sata) (Grech i sar. 2013b) od CS i CS-HA korišćenih u ovoj studiji. To je rezultat pre svega potpuno novog (inovativnog) načina sintetisanja cementa, a ne dodavanja aditiva za ubravanje vezivanja.

Joannidis (2013.) je na osnovu svojih i drugih istraživanja utvrdio da obe formulacije MTA (sivi i beli) dovode do diskoloracije krunice zuba, kada se koriste kao biološka barijera u slučajevima regeneracije pulpe. Ovaj neželjeni efekat objašnjavaju prisustvom visoke koncentracije oksida teških metala (gvožđa, magnezijuma i aluminijuma). Akbari i sar. (2012.) zbog toga savetuju postavljanje dvostrukog sloja dentin adhezivnih sistema u pristupnom kavitetu. S ovim nalazom se slaže i Camilleri, ali i drugi istraživači koji su potvrdili prisustvo tragova olova, arsena i hroma u sastavu Portland cementa, MTA i Biodentina. Ovo je značajan problem ovih materijala s obzirom na dugotrajni kontakt materijala sa tvrdim i mekim tkivima nakon aplikacije (Camilleri sar. 2012, Grech i sar. 2013a).

Otpušanjem arsena iz različitih formulacija MTA i Portland cementa bavili su se i Duarte i sar.(2005) i Bramante i sar.(2008). Oni su zaključili da se ovaj toksični element otpušta, ali ispod nivoa propisanog ISO standardima.

Sa ovim nalazom se ne slažu Schembri (2010) i Camilleri (2012) koji su našli da je nivo arsena u MTA iznad nivoa preporučenim ISO standardom (2 mg kg⁻¹). Kad arsen dođe u kontakt s krvlju u toku hirurških zahvata, on biva apsorbovan i transportovan crvenim krvnim zrnima i taloži se u jetri i

bibrezima. Ako jetra ne može da ga metaboliše on postaje toksičan i izaziva oštećenja i u subletalnim koncentracijama. Ovi materijali su u kliničkoj upotrebi i smatraju se bezbednim, iako zakonska regulativa za dentalne standarde još nije odredila granice za dozvoljeni nivo otpuštanja pojedinih elemenata. Već duže vreme se povećan rizik od Alchajmerove bolesti dovodi u vezu sa pojačanim izlaganjem ljudskih tkiva aluminijumu iz dentalnih i drugih biomaterijala (Forbes&Gentleman 1998, Camilleri i sar. 2012).

Zato je važno istaći da novosintetisani nanomaterijali CS i HA-CS u svom sastavu nemaju teške metale (Jokanović i sar. 2006, 2008).

U kompoziciji MTA-a kao rendgen kontrastno sredstvo koristi se bizmut oksid. Efekti bizmut oksida na ljudske ćelije su kontraverzni. Dok jedni negiraju uticaj ovog elementa na biokompatibilnost cementa, drugi ističu da on izaziva citotoksičnost ćelija pulpe (Gandolfi i sar.2010). Drugi problem vezan za bizmut oksid je aktivno učešće u procesima hidratacije MTA. Bizmut iz MTA je inkorporiran unutar hidriranih kalcijum silikatnih struktura i tako modifikuje reakciju hidratacije MTA (Camilleri 2010).

Barijum sulfat koji je dodat kompoziciji testiranih novosintetisanih materijala je bezbedniji za kliničku upotrebu jer je inertan. Ovo je potvrdio i Camilleri u svojim istraživanjima i zaključio da se alternativna rendgen kontrastna sredstva (barijum sulfat, zlato i srebro/kalaj) ponašaju inertno i ne modifikuju hidratacione karakteristike kalcijum silikatnih cemenata (Camilleri 2010).

Hidroksiapatit (HA) je jedna od najčešće korišćenih kalcijum fosfatnih biokeramika koja ispoljava osteokonduktivna svojstva. Budući da je njegova struktura slična mineralima kosti, on može formirati direktnu vezu sa koštanim tkivom. HA ima nekoliko prednosti: dobro je prihvaćen i ugradiv u kost domaćina, ali obezbeđuje i osnovu za rast nove kosti (Suwanprateeb i sar. 2012). On poseduje izvrsnu biokompatibilnost, a površinski sloj ima glavnu ulogu u formiranju, rastu i održavanju veze između tkiva i biomaterijala (Liu i sar. 2011). Takođe, ne sadrži nikakve proteine pa ne uzrokuje bilo kakve alergijske

ili imunološke reakcije (Hu i sar. 2011). S druge strane, HA ima suštinski veoma slaba mehanička svojstva (Arun i sar. 2011).

Sa ciljem poboljšanja karakteristika i dobijanja novih endodontskih materijala, formulisana je nova smeša hidroksiapatita i kalcijum silikatnih sistema (CS-HA). Međutim, s obzirom na to da se radi o novim biokeramičkim materijalima, njihova kompatibilnost sa biološkim sistemima i ponašanje u fiziološkom okruženju nisu dovoljno proučeni. Neophodno je bilo proveriti ove materijale kroz niz pretkliničkih testova.

Ćelijski odgovor na HA čestice, koje su ugrađene u matiks ili su u vidu omotača, zavisi od svojstava kao što su veličina čestice, morfologija (štapičasta, sferična, nepravilna), hemijski sastav, kristalizacija i temperatura sinteze. Generalno je prihvaćeno da štapičasti oblik kristala izaziva zanemarljiv ćelijski odgovor u odnosu na čestice sferičnog oblika, zbog većeg površinskog napona zakrivljene površine (Wahl i sar. 2006.)

To je potpuno u saglasnosti sa ovim rezultatima, jer su nanočestice HA korišćene u smeši sa kalcijum silikatnim sistemima imale štapičast oblik (odnos dužina:prečnik 10:1). Ovo je značajno za modeliranje interakcije između skafolda i koštanih ćelija, odn. utiče na aktivnost koštanih ćelija i njihovu adaptabilnosti na površinu skafolda. Ovo potvrđuju i Fenoglio i sar. (2011) ističući da je veličina čestica ključni faktor u određivanju interakcije neorganskih čestica i bioloških sistema, a da je oblik čestice dominantan faktor u promenama koje se dešavaju tokom adsorpcije proteina. Petrović (2012) je ispitujući osteokonduktivni potencijal visokoporoznih HA potvrdio da nanostrukturne čestice HA pokazuju veći stepen bioaktivnosti i osteointegracije u odnosu na mikrostrukturni HA.

Iz istih razloga su Collares i sar. (2012) ispitivali svojstva eksperimentalnog endodontskog cementa na bazi metakrilata kome su dodali sintetski nanostrukturni HA (sa česticama od 26.8nm), a koji je dobijen procesom sečenja plamenom. Oni smatraju da dodavanje nanostrukturnog HA u endodontske cimente utiče na bolju adhezivnost ovih materijala, jer HA

kristali mogu da se talože na unutrašnju površinu korena zuba i popunjavaju praznine (gepove) duž zidova korena, nastale usled degradacije cemenata u funkciji vremena.

Dodavanjem sintetskih nanostrukturnih HA endodontskim cementima obezbeđuje se rast kristala i biomimikrijska mineralizacija okolnog tkiva, tako da razvoj ovakvih materijala vodi ka boljoj i stabilnijoj vezi zub/materijal (Collares i sar. 2012).

6.1. DISKUSIJA BIODOKOMPATIBILNOSTI NOVOSINTETISANIH NANOMATERIJALA NA BAZI KALCIJUM SILIKATNIH SISTEMA I HIDROKSIAPATITA: Procenom genotoksičnosti

Prva testiranja biokompatibilnosti bila su tzv. skrining testiranja (testovi procenjivanja). Skrining testovi mogu da se koriste za procenu podobnosti primene materijala sa gledišta biokompatibilnosti i tada se niz jednostavnih i standardizovanih postupaka sprovode *in vitro* ili *in vivo* testovima. Druga funkcija ovih testova je *in vitro* praćenje ponašanja materijala u simuliranim fiziološkim uslovima u odnosu na okolinu ili pojedine njene elemente. *In vivo* evaluacija opisuje promene u tkivima indukovane biomaterijalima, ali i uticaj tkiva na materijale.

Razumevanje mehanizma interakcije između bioloških fluida ili ćelija sa endodontskim materijalima je ključno za donošenje zaključaka o novim materijalima korišćenim u dijagnozi i terapiji, kao i za izbegavanje štetnih reakcija materijala nakon njihovog korišćenja (Fenoglio i sar.2011).

Jedno od najkontraverznijih pitanja koja se odnose na korišćenje novih biomaterijala i njihovu evaluaciju leži u području njihovog mutagenog i kancerogenog efekta. Poznato je da se neki implantirani materijali zadržavaju u organizmu godinama, pa i decenijama, i izuzetno je važno šta se dešava sa njima direktno, odnosno u okolnom tkivu tokom dužeg vremenskog perioda.

Nije dovoljno da biomaterijali imaju odlična fizička svojstva, već je neophodno da budu i bezbedni za upotrebu. U razvoju bezbednih nanotehnologija, veličina čestica se mora uzeti u obzir. Činjenica je da nanočestice mogu da dođu do nukleusa i dovedu do pojave različitih oštećenja molekula DNK i/ili uticati na njenu funkciju u smislu inhibicije replikacije, transkripcije i ćelijske proliferacije (Chen & Von Mikecz 2005).

Nanočestice CS sistema, veličine između 117 i 477 nm, a slične vrednosti imaju i aglomerati HA (60-470nm), pokazale su neznatne efekte na ćelijsku strukturu (vijabilnost ćelija) u ovom eksperimentu.

Istraživanja su pokazala da se čestice veličine između 20 i 45 nm mogu pronaći u organelama citoplazme (Goldđijev aparat, lizozomi, mitohondriji), ali da ih nema u nukleusu (Savic i sar. 2003). Pantè (2002) je elektronskim mikroskopom uočio da se čestice zlata (veličine oko 39nm) nalaze i u ćelijskom nukleusu.

Nanočestice, različite veličine i hemijske strukture, se najčešće talože u mitohondrijima, izazivajući znatna strukturalna oštećenja, zbog sinteze ROS-a (reaktivne kiseoničke vrste) koji dovodi do oksidativnog stresa. Mitohondrije su glavna mesta u ćeliji gde dolazi do produkcije ROS, pri čemu može nastati hidroksilni radikal (OH), jedan od najjačih oksidansa u prirodi. Oksidativni stres je najčešći mehanizam oštećenja ćelija, prouzrokovan nano i ultrafinim česticama (AshaRani i sar. 2009). Zato je preporučena dodatna obazrivost i pažnja pri proveru, ukrštanjem različitih testova u pretkliničkim ispitivanjima (Chen & Von Mikecz 2005).

Veliki broj testova se danas koristi u proveru genotoksičnosti određenih materijala. To su pre svega analiza hromozomskih aberacija, pojava mikronukleusa, razmena sestrinskih hromatida i dr. (Ribeiro i sar. 2005). Međutim, sve ove metode su tipično laboratorijske i zahtevaju dosta vremena i vrlo obučene tehničare za pravilno tumačenje i interpretaciju dobijenih rezultata.

Jedan od testova koji se razvio u poslednjoj deceniji XX veka je Komet test. Ovaj test u alkalnoj verziji se pokazao kao vrlo efikasan za testiranje genotoksičnosti različitih materijala, uključujući i dentalne (Braz i sar. 2006, Da Silva i sar. 2006, Ribeiro i sar. 2006a, 2006b).

To je brz, jednostavan i pouzdan test koji se može izvoditi i *in vitro* i *in vivo* na ćelijama sisara gajenim u kulturi, limfocitima iz periferne krvi, ćelijama kvasca, ćelijama biljaka, različitih vrsta protozoa, pa čak i na bakterijskim ćelijama (Singh i sar. 1999, Gichner 2003, Lah i sar. 2004, Brendler-Schwaab i sar. 2005, Collins 2004, Azqueta i sar., 2009, Gaivao i sar. 2009, Johansson i sar. 2009). Test postoji u dve verzije: neutralnoj, za detekciju dvolančanih prekida, i alkalnoj, za detekciju jednolančanih prekida (Fairbairn i sar. 1995). Prekidi na DNK mogu biti direktna posledica dejstva nekog agensa ili posledica AP mesta i oksidovanih baza koje se prevode u prekide u toku alkalne procedure testa (Collins i sar. 1997, Horvatova i sar. 1998). Takođe, prekidi mogu biti intermedijeri reparacionih procesa BER (reparacija ekcizijom baza) i NER (reparacija ekcizijom nukleotida).

Međutim, iako poređenja rezultata testova genotoksičnosti dobijenih *in vitro* i *in vivo* sugerišu da Komet test daje relevantne informacije, važno je naglasiti da *in vitro* testovi ne uzimaju u obzir kompleksne homeostatske uslove koji se javljaju u *in vivo* uslovima (Ribeiro 2008, Liuyun i sar 2009). Tako, razvoj tumora u ciljnim ćelijama ne zavisi samo od inicijalnog nivoa indukovanih oštećenja DNK i njenih kapaciteta za reparaciju, već i od drugih faktora kao što su produkcija reaktivnih metabolita, njihova distribucija i njihov efekat na ćelijsku proliferaciju. Neke supstance dovode do direktnih oštećenja DNK molekula, ali često oštećenja nastaju i indirektno različitim mehanizmima: lipidnom peroksidacijom, oksidacijom različitih makromolekula (proteina, lipida) i sl. (Braz i sar. 2006).

Najčešće ćelije koje su korišćene u *in vitro* studijama procene genotoksičnosti su ovarijumske ćelije kineskog hrčka (CHO) ili limfomske ćelije miševa soja L5178Y. Međutim, pokazalo se da postoje određeni nedostaci

vezani za ove ćelijske loze. Na primer, hromozomski materijal obično podleže ekstenzivnom rearanžiranju, pri čemu neki ključni geni koji imaju uticaja na preživljavanje ćelija, mogu mutirati, pa to utiče na tumačenje dobijenih rezultata (Da Silva 2006).

Humani limfociti imaju tu prednost da su kariotipične normalne ćelije kao i to da su dobri indikatori sistemskih poremećaja posle izloženosti štetnim faktorima. Primećeno je, takođe, da genotoksični testovi na ćelijama sisara u *in vitro* uslovima daju značajno visoke i neprihvatljive lažno pozitivne rezultate u poređenju sa ćelijama glodara. Ipak, postoje podaci koji ukazuju da ljudski limfociti ređe daju lažno pozitivne rezultate u poređenju sa aktuelnim ćelijskim linijama glodara. (Kirkland i sar. 2007)

Iz tih razloga je za procenu genotoksičnog efekta nanostrukturnih materijala HA, CS, CS-HA u ovim istraživanjima primenjen Komet test na humanim limfocitima iz periferne krvi.

Testirajući genotoksični potencijal HA u ovoj studiji utvrđeno je da genetska podloga (*background*) igra važnu ulogu u odgovoru ćelija na testiranu supstancu. Može se smatrati da je baš to uzrok DNK oštećenja samo na limfocitima donora 1, jer ih kod donora 2 i 3 nije bilo. Ipak, mora se istaći da je HA (u višim koncentracijama) smanjio nivo DNK oštećenja limfocita donora 2 i 3, što je verovatno posledica mogućih citotoksičnih efekata HA. Iako u tripan blue ekskluzionom testu nije registrovan citotoksični efekat HA, njegova potencijalna toksičnost nije isključena.

Prema podacima iz literature, HA pokazuje jak citotoksični efekat na mišje fibroblastne ćelijske linije NIH-3T3 (Gomes-Filho i sar. 2009). Međutim, nije bio mutagen u bakterijskim testovima (Jantova i sar. 2008, Hassan&Swaminathan 2011) niti genotoksičan na skafoldima MG63 i mezenhimalnim stem ćelijama (Liuyun i sar. 2009) odnosno na ćelijama leukemije L1210 (Jantova i sar. 2008).

Na osnovu podataka iz literature uočava se da razlike između ćelijskih linija i sistema testa i eksperimentalnih uslova mogu dovesti do različitih

rezultata citotoksičnosti (Scudiero i sar. 1988, Gomes-Filho i sar. 2009, Scelza i sar. 2012). Ovim problemom (lažno pozitivnih rezultata) bavili su se i eksperti iz Evropskog centra za valorizaciju alternativnih metoda (ECVAM) koji su istakli da ćelijski sistemi, odnosno test sistemi imaju brojne manjkavosti i da je potrebno modifikovati određene protokole i usaglasiti koncentracije testiranih hemikalija. Koncentracije koje se koriste u *in vitro* testovima, moraju se prilagoditi *in vivo* testovima. Takođe, oštećenja izazvana testiranim supstancama su posledica procesa koji su specifični samo za *in vitro* test sisteme ili uslove. Ovi procesi se retko ili nikad ne dešavaju i često su irelevantni za procenu rizika kod ljudi (Kirkland i sar. 2007a, 2007b).

Kalcijum silikatni sistemi (CS) nisu pokazali genotoksičnost u testiranim rasponima koncentracija, sa izuzetkom limfocita donora 1, gde je primećena visoka indukcija DNK oštećenja, što se može objasniti individualnom osetljivošću ćelija ovog donora. Zeferino i sar. (2010) ističu da godine, metabolički i hormonalni status donora može uticati na ćelije iz primarne ćelijske linije (limfocite).

Da su CS cementi biokompatibilni i da nisu genotoksični istakli su i drugi autori koristeći različite ćelijske linije: MG63 (Ding i sar. 2010), L929 (Ghodduzi i sar. 2008), fibroblaste pulpe (Laurent i sar. 2008). Kao predstavnik kalcijum silikatnih cemenata istakao se MTA, koji je derivat Portland cementa. Mnoga istraživanja su se bavila genotoksičnošću ovih cemenata i njihovim uticajem na DNK molekule humanih limfocita. Ribeiro je istakao da Komet test, korišćen u eksperimentalnim uslovima, nije otkrio prisustvo oštećenja DNK posle tretmana sa sivim, odnosno belim MTA-om (Ribeiro i sar. 2005a, 2005b, 2006, 2008), a to su potvrdila i druga istraživanja (Camargo i sar. 2009, Zeferino i sar. 2010).

Mešavina kalcijum silikatnih sistema i hidroksiapatita (CS-HA) je pokazala genotoksičnost samo na limfocitima donora 2, dok nije bilo statistički značajnog povećanja oštećenja molekula DNK na ćelijama ostala četiri donora. Neusaglašenost u genotoksičnom odgovoru, ćelija izloženih različitim

endodontskim materijalima, dobijena u ovom radu, nije iznenađujuća. I druga istraživanja su takođe pokazala različite ćelijske odgovore na različita genotoksična oštećenja (Brzović i sar. 2009, Camargo i sar. 2009, Kalmodia i sar. 2011).

Da postoji različita osetljivosti limfocita dobijenih od više donora, potvrđena je i u ovom eksperimentu pri testiranju HA, CS, CS-HA kao i kod pozitivne kontrole.

Različita osetljivost ćelija dobijenih od različitih donora može biti rezultat različite genetske osnove donora i shodno tome različitog reparativnog kapaciteta DNK molekula. Da bi se istakle ove genetske razlike između donora, izvedeno je poređenje negativne kontrole (netretiranih ćelija) sa ćelijama koje su tretirane sa t-BOOH-om (pozitivna kontrola).

Razlike između pojedinaca kao i razlike unutar jedne individue mogu se izraziti koeficijentom varijacije (CV). U ovom istraživanju, srednja vrednost CV netretiranih kontrolnih ćelija je bila 34%, dok je kod pozitivne kontrole ona bila 80.6%. Tako visoke vrednosti koeficijenta varijacije ukazuju na veliku varijabilnost testiranih ćelija u ovom eksperimentu, što je posledica individualnih genetskih razlika između donora. Iako, ne postoji statistički značajna razlika između negativne i pozitivne kontrole kod različitih donora, primećeno je da među njima ima razlike u indukciji oštećenja DNK molekula. Limfociti donora 2 pokazali su najveću osetljivost na pozitivnu kontrolu (t-BOOH), gde je intenzitet repa bio 66%, dok je osetljivost donora 3 bila najniža (intenzitet repa 22%). Ovi rezultati potvrđuju da postoje individualne razlike u kapacitetima reparacije molekula DNK. To je u saglasnosti sa nalazima Hazre i sar. (2007), koji je pokazao visoku varijabilnost gena uključenih u BER (reparacija ekcizijom baza) i NER (reparacija ekcizijom nukleotida) reparatorne procese DNK u limfocitima zdravih osoba. Budući da t-BOOH dovodi do stvaranja ROS (reaktivnih kiseoničkih vrsta), koje učestvuju u reparaciji DNK oštećenja, prvenstveno preko BER mehanizama (osim u slučaju dvostrukog prekida lanca), rezultati ovih istraživanja najverovatnije sugerišu na različite

BER kapacitete donora. Što je sistem složeniji (npr: ljudske ćelije nasuprot ćelijama mikroorganizama ili gajenim ćelijskim linijama) može se očekivati veća statistička varijabilnost rezultata testiranja (Raković i sar. 2010).

U ovom istraživanju korišćeno je više od jedne koncentracije testiranih materijala. Odgovarajući nivo koncentracija koje treba testirati zavisi od apsorpcije supstance u biološkim fluidima i ćelijama, kao i njihovog metabolizma unutar ćelija. Da bi se tačno ocenio nivo testirane koncentracije, važno je naglasiti da je tretman ćelija vršen u rastvorima. Smatra se da su ćelije više izložene testiranoj supstanci kad su u suspenziji, nego kad rastu u monosloju (Mitić-Ćulafić i sar. 2009).

Shodno ovome, može se smatrati da su limfociti u rastvoru bili duže izloženi delovanju testiranih materijala nego što bi to bile ćelije dentalnog ili parodontalnog tkiva, odnosno testirane koncentracije su višestruko prevazilazile doze koje bi regularno bile apsorbovane u *in vivo* uslovima.

Dobijene vrednosti oštećenja DNK jasno sugerišu da je mešavina kalcijum silikatnih sistema i hidroksiapatita (CS-HA) pokazala niži genotoksični potencijal od HA i CS ponaosob. U dostupnim literaturnim podacima nema istraživanja koja su se bavila sličnom mešavinom HA i CS. Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju može se pretpostaviti da je dodavanjem HA kalcijum silikatnoj fazi došlo do blage redukcije pH vrednosti ovog cementa. To je umanjilo citotoksični efekat koji nastaje kao posledica visoke vrednosti pH (>12). Poznato je da supstance sa visokim pH vrednostima dovode do ćelijske smrti, posle čega dolazi do dezintegracije ćelijskih komponenti i fragmentacije genetskog materijala, koji se može detektovati Komet testom i možda protumačiti kao genotoksični efekat (Baraba i sar. 2011).

Budući da je hidroksiapatit već u upotrebi u endodontskoj praksi i da je potvrđen nizak nivo njegovog genotoksičnog potencijala, čini se da je upotreba CS-HA u humanim aplikacijama sasvim bezbedna. Rezultati dobijeni u ovom radu svakako ohrabruju dalja istraživanja.

6.2. DISKUSIJA BOKOMPATIBILNOSTI NOVOSINTETISANIH NANOMATERIJALA NA BAZI KALCIJUM SILIKATNIH SISTEMA I HIDROKSIAPATITA - Implantacijom u potkožno tkivo pacova

Tehnološki razvoj i kontinuirano predstavljanje novih endodontskih materijala za različite kliničke primene, uslovalo je praćenje bioloških svojstava novih materijala kao obavezan uslov za njihovu rutinsku upotrebu u kliničkim uslovima. Prateći regulativu i standarde ISO 7405 i ISO 10993 utvrđena su tri koraka za testiranje dentalnih materijala, odnosno njihove biokompatibilnosti (Damaschke 2010): 1. skrining testovi za nespecifičnu toksičnost (na ćelijama); 2. testovi za specifičnu toksičnost na eksperimentalnim životinjama (subkutane ili intraosealne implantacije) i 3. klinički kontrolisane studije na ljudima.

Histološka reakcija mekih tkiva na biomaterijal je davno ustanovljena i često korišćena mera procene biokompatibilnosti (Holland i sar. 1999, Moretton i sar. 2000, Figueiredo i sar. 2001, Ozbas i sar. 2003, Kaplan i sar. 2003, Sumer i sar. 2006, de Moraes i sar. 2006, Bodrumlu i sar. 2008, Lotfi i sar. 2009, Martinez Lalis i sar. 2009, Yavari i sar. 2009, Khashaba i sar. 2011, Silva-Herzog i sar. 2011, Parirokh i sar. 2011, Gomes-Filho i sar. 2012).

Široka primena ove metode proizilazi iz činjenice da je implantacija potencijalnog biomaterijala u potkožno tkivo životinja pre svega jednostavna, a ovaj skrining test vrlo pouzdan za određivanje iritacije tkiva i interakcije tkiva i biomaterijala. Činjenica je da su *in vitro* testovi na tkivima ili ćelijskim kulturama važan inicijalni korak u proceni biokompatibilnosti, ali se ipak ne dobija kompletna slika o interakciji materijala sa tkivima. Zato *in vivo* testovi pružaju mnogo više informacija o inflamatornom i imunom odgovoru koji se javlja na testirani materijal (Martinez Lalis i sar. 2009). *In vitro* studije se fundamentalno razlikuju od onih *in vivo* gde proteini, tkivni fluidi i drugi faktori mogu redukovati toksične efekte materijala (Yavari i sar. 2009). *In vivo*

testovi nam pružaju kompletnije i klinički relevantnije informacije o tkivnom odgovoru u dužem vremenskom periodu.

U ovoj ekperimentalnoj studiji testirani materijali su pre implantacije kondenzovani u tubice dužine 10mm sa ciljem da se prevenira rasipanje i difuzija materijala u okolno vezivno tkivo, što simulira situaciju u kanalu korena. Druga prednost ove metode je standardizacija eksperimenta i izloženost iste površine materijala kontaktu sa vezivnim tkivom.

Za ovu vrstu eksperimenta korišćene su različite vrste tubica: silikonske (Kaplan i sar. 2003, Martinez Lalis i sar. 2009), dentinske tubice (Holland i sar. 1999), polistirenske i polipropilenske (Martinez Lalis i sar. 2009) ili teflonske (Khalil&Eid 2013).

U ovom eksperimentu korišćene su polietilenske tubice, jer je njihova upotreba najraširenija (de Moraes i sar. 2006, Lotfi i sar. 2009, Gomes-Filho i sar. 2011, Khashaba i sar. 2011, Parirokh i sar. 2011) pre svega zbog njihove inertnosti. One ne izazivaju tkivnu reakciju, a na kontrolisan i efikasan način izlažu testirani materijal živom tkivu. Prvi put su korišćene još 1967. godine, a danas je ovaj metod usvojen i preporučan od strane ADA i ISO (Figueiredo i sar. 2001).

U literaturi su opisane različite metode za postavljanje materijala u potkožno tkivo malih ekperimentalnih životinja. Neki autori koriste direktno ubacivanje materijala (Bodrumlu i sar. 2008), drugi predlažu injekciono ubrizgavanje materijala u potkožno tkivo (Figueiredo i sar. 2001, Silva-Herzog i sar. 2011), dok treći materijal kalupe i u potkožno tkivo ubacuju u obliku diskova ili tableta (Moretton i sar. 2000, Modaresi i sar. 2005). Nedostaci većine ovih tehnika su u tome što je velika površina materijala u kontaktu sa okolnim tkivom. Primećen je i mnogo izraženiji zapaljenski odgovor kao posledica difuzije materijala u okolno tkivo. Istraživanja pokazuju da se kod submukoznih implantacija materijala koji sadrže srebro (N-Rickert i AH 26), pojavljuju tzv. tkivne tetovaže, što je mnogo manje izraženo u slučajevima kada je implantirani materijal na neki način ograničen (Figueiredo i sar. 2001).

Postoje mnogi kriterijumi za evaluaciju intenziteta subkutane reakcije na dentalne materijale (raširenost zapaljenja, broj i vrsta zapaljenskih ćelija, debljina fibrozne kapsule, prisustvo apscesa i nekroze), što nekad može dovesti i do konfuzije u tumačenju rezultata kod različitih istraživača.

Poznato je, da je pojava zapaljenja jedan od najvažnijih kriterijuma kod utvrđivanja biokompatibilnosti. Takođe je poznato i da je debljina kapsule pouzdan i dobar marker zapaljenja (Khashaba i sar. 2011). Stoga se i ova studija utvrđivanja biokompatibilnosti novih nanostrukturnih materijala bazira na postojanju uzajamnog odnosa zapaljenja i debljine fibrozne kapsule, što je i uočeno u rezultatima.

Uočeno je da sa smanjenjem broja zapaljenskih ćelija, dolazi do porasta debljine fibrozne kapsule što je jasan dokaz o direktnom odnosu između ova dva parametra za sve testirane materijale tokom opservacionog perioda od 7. do 60. dana.

Praćenje specifičnog odgovora na strano telo nakon implantacije materijala počinje *zapaljenjem (inflamacijom)*, nastavlja se kroz faze *zarastanja rane* sa učešćem raznih tipova ćelija koji su specifični indikatori faze oporavka tkiva. Odmah posle adhezije proteina na implantat, neutrofili i mononuklearne ćelije infiltriraju kontaktne površine tkivo-materijal i pridružuju se *akutnom zapaljenju*. Zajedno sa edemom tkiva, narušenim integritetom vlakana, promenom vaskularne mreže ovo stanje traje pet-šest dana i smenjuje ga *hronično zapaljenje* praćeno smanjenjem broja neutrofila i pojavom monocita. Oni adheriraju na površinu implanta i diferenciraju se u makrofage. Takođe, u ovoj fazi zapaljenja limfociti postaju dominantni. Sa smanjenjem zapaljenskog procesa opada i ukupan broj inflamatornih ćelija, dok proces zarastanja rane ide ka stvaranju granulacionog tkiva i *fibrozne inkapsulacije* implantiranog materijala (Marković 2009).

U ovom eksperimentu praćeni su kratkoročni, ali i dugoročni efekti materijala na tkivo, jer su ovi podaci relevantni za kliničku upotrebu endodontskih materijala. Eksperiment je trajao 60 dana što je u saglasnosti sa

mnogim istraživačima (Yaltirik i sar. 2004, Lotfi i sar. 2009, Scarparo i sar. 2010, Parirokh i sar.2011). Dve činjenice idu u prilog izboru ovog evaluacionog perioda. Prva je životni vek pacova, jer je jedan mesec života pacova ekvivalent za 30 meseci ljudskog života. Druga činjenica je sam biološki odgovor tkiva na implantirani materijal posle 60 dana, jer je mala verovatnoća da će posle toga doći do zapaljenja ili kolonizacija bakterija, odnosno štetnih efekata na tkivo (Moretton i sar. 2000).

Tkivo oko testiranih biokeramičkih materijala (CS, CS-HA) pokazalo je najizraženiji stepen zapaljenja u prvih 15 dana, sa umerenim narušavanjem struktura vezivnog tkiva. Posle sedam dana zapaljenska reakcija kod oba materijala, CS i CS-HA, je bila ocenjena kao umereno zapaljenje (3), da bi posle 15 dana došlo do opadanja intenziteta zapaljenja. Zapaljenska reakcija za CS je bila blaga (2), a za CS-HA je ocenjena kao minimalna (1.6). Dobro ograničena inflamatorna reakcija bila je okružena nežnom kapsulom, razvijenijom kod CS-HA (2.2), malim kapilarima, hroničnim infiltratom i aktivnim fibroblastima.

Reakcija tkiva na prazne tubice (negativna kontrola) u ovom eksperimentu bila je slična nalazima drugih istraživača (Vosoughhosseini i sar. 2008, Yavari i sar. 2008, Gomes-Filho i sar. 2011). Bila je najjače izražena 7. i 15. dana (od 3.2 sedmog dana do 1.9 petnaestog dana) sa ćelijskim infiltratom gde su dominirali limfociti i plazmociti, što ukazuje na hroničnu zapaljensku reakciju. Ponegde uočene džinovske ćelije govore u prilog reakciji tkiva na strano telo. Ovakva reakcija bi delimično mogla biti i posledica hirurške traume prilikom postavljanja tubica u tkivo. Na kraju četvrte i osme nedelje ćelije zapaljenskog infiltrata su iščezavale, a tkivo na mestu kontakta sa cevčicom je bilo ograničeno dobro razvijenom kapsulom (ocenjenom 2.2). To ukazuje na kapacitete organizma da ograniči zapaljensku reakciju i tako spreči dalje oštećenje tkiva, što su u svojim radovima potvrdili i Sumer (2006) i Scarparo (2010).

Veživno tkivo oko MTA pokazalo je znake najizraženije zapaljenske reakcije sa difuznim i fokalnim subkapsularnim i perivaskularnim infiltratima, što je ocenjeno kao umereno i izrazito zapaljenje (sa ocenom 3.3).

Ovakav jak tkivni odgovor dobili su i drugi istraživači uočavajući čak i koagulationu nekrozu i distrofične kalcifikacije (Parirokh i sar. 2011). Ova inicijalno izražena zapaljenska reakcija na MTA je uzrokovana brojnim faktorima. Visoke pH vrednosti sveže zamešanog materijala, oslobađanje toplote prilikom vezivanja, odnosno stimulisanje inflamatornih citokina (interleukin 1 i interleukin 6) doprinosi ovom jakom tkivnom odgovoru na MTA (Moretton i sar. 2000, Modaresi i sar. 2005, Camilleri 2006, Lotfi i sar. 2009).

U daljem toku oporavka tkiva (posle 30 i 60 dana) kod svih testiranih materijala je uočeno značajno opadanje intenziteta zapaljenja, iščezavanje ćelija zapaljenskog infiltrata, ali i oporavak i remodeliranje tkiva. Zapaljenje je u ovom periodu ocenjeno sa 0.4 za CS-HA i 0.5 za CS. Sa smanjenjem zapaljenja uočavala se sve bolje organizovana fibrozna kapsula u kontaktu sa svim materijalima.

Najrazvijenija kapsula uočena je kod CS-HA (2.8) što ukazuje na vrlo dobru toleranciju tkiva na ovaj materijal. Ovakve nalaze je istakla i Marković (2009), koja je analizirala površinu biokeramičkih implantata, posebno HA (SEM analizom). U svojim istraživanjima je u defektima na površini materijala uočila kolagena vlakna i fibroblaste, što govori o intimnoj vezi HA i fibrozne kapsule koja okružuje implantat.

Ovakav zapaljenski odgovor posle četiri i osam nedelja ovog eksperimenta može se objasniti indukcijom oslobađanja proinflamatornih citokina od strane oslobođenih partikula hidroksiapatitnog sloja koji se formirao na površini biokeramičkih materijala. Ovo takođe ukazuje na dobru interakciju između materijala i ćelija iz tkivnog okruženja, što je znak dobre biokompatibilnosti ovih materijala.

Bioaktivnost jednog materijala povezana je i sa načinom njegove sinteze. Ovi novosintetisani biomaterijali na bazi kalcijum silikatnih sistema dobijeni su novom tehnologijom, kombinacijom dve metode, sol- gel procesima i samoširećom reakcijom sagorevanja. Materijali dobijeni sol-gel procesima su bioaktivniji u odnosu na materijale istog sastava koji su dobijeni drugim metodama sintetisanja (Li&De Grot 1994, Chen i sar. 2011).

6.3. DISKUSIJA BIOFUNKCIONALNOSTI NOVOSINTETISANIH NANOMATERIJALA NA BAZI KALCIJUM SILIKATNIH SISTEMA I HIDROKSIAPATITA - Direktnim prekrivanjem pulpe zuba kunića

Kao jedan od najvažnijih endodontskih modaliteta, direktno prekrivanje pulpe je često korišćeno kao terapijski postupak za očuvanje vitaliteta zubne pulpe. Definiše se kao tretman na otvorenom pulpnom tkivu, gde se pulpna rana prekriva materijalima koji će podsticati formiranje reparativnog dentina (Zhang i sar. 2013). Budući da materijal za direktno prekrivanje dolazi direktno u kontakt sa pulpnim tkivom, on igra ključnu ulogu tokom ovog tretmana.

Idealan materijal za direktno prekrivanje treba da ima sledeće karakteristike: da ne stimuliše pulpu ali da stimuliše formiranje reparativnog dentina, da je propustljiv i da sprečava prodor bakterija u dentalnu pulpu (Tziafas i sar. 2000).

Najčešće korišćeno sredstvo za direktno prekrivanje pulpe je kalcijum hidroksid (Ca(OH)_2) koji može da stvori dentinski most preko površine rane. Međutim, ovako formiran dentinski most ima neke nedostataka kao što je prisustvo tunela u mostu, slaba adhezija, degradacija posle nagrizanja kiselinama (Zhang i sar. 2013), odnosno izraženija zapaljenska reakcija u pulpi posle njegove aplikacije (Zarrabi i sar. 2010), i pojava nekroze i distrofičnih kalcifikacija (Briso i sar. 2006, Ando i sar. 2009). Nepredvidivost ishoda terapije je takođe česta, jer samo u trećini slučajeva dolazi do uspešnog ishoda sa stvaranjem dentinskog mosta (Roberts i sar. 2008, Orhan i sar. 2012). Po

mišljenju nekih autora ovakvi zubi mogu ostati vitalni u proseku samo 12 godina nakon terapije direktnog prekrivanja kalcijum hidroksidom, što se smatra nezadovoljavajućim ishodom terapije (Haskell i sar. 1978, Zarrabi i sar. 2010).

U eri regenerativne endodoncije se očekuje uvođenje novih postupaka i materijala u cilju biološke terapije i revitalizacije zuba. U terapiju se uvode biomaterijali kao što su kalcijum fosfati, kalcijum silikati, odnosno bioaktivni staklo-keramički cementi. Ovi bioaktivni dentalni materijali su neophodni za bolji i efikasniji regenerativni endodontski tretman (Güven i sar. 2013).

Već dugi niz godina na tržištu je mineral trioksi agregat (MTA) koji je pokazao bolje terapijske ishode kod direktnog prekrivanja pulpe u odnosu na kalcijum hidroksid. Zbog svoje biokompatibilnosti, manje izraženog zapaljenskog odgovora, ali i zbog debljeg i strukturno sličnijeg dentinskog mosta u odnosu na tradicionalni kalcijum hidroksid, MTA je postao standard u ovoj terapijskoj proceduri (Ford&Torabinejad 1996, Menezes i sar. 2004, Faraco Junior & Holland 2004, Briso i sar. 2006, Min i sar. 2008, Zarrabi i sar. 2010, Orhan i sar. 2012, Zhang i sar. 2013).

Iz tih razloga je i u ovoj studiji korišćen MTA kao pozivna kontrola i kao standard za upoređivanje biokompatibilnosti i biofunktionalnosti materijala za direktno prekrivanje pulpe. Ipak, neke njegove osobine kao što su dugo vreme vezivanja (3 do 4 sata), gruba, peskasta granulacija cementa i teška manipulacija i aplikacija naveli su istraživače na patentiranje novih kalcijum silikatnih cemenata sa sličnim biokompatibilnim karakteristikama, ali i unapređenim svojstvima vezanim za kraće vreme vezivanja i lakše rukovanje.

U ovoj studiji su kao sredstvo za direktno prekrivanje ekspanirane pulpe korišćeni nanomaterijali na bazi kalcijum silikatnih sistema (Jokanović i sar.) koji su dobijeni inovativnim tehnikama sinteze što im je povećalo bioaktivnost, drastično smanjilo vreme vezivanja (10-15 min), a veličina nanočestica i struktura kristala obezbedila odgovarajuću biokompatibilnost koja je potvrđena u prethodnim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima.

Kao animalni model korišćeni su zubi glodara (kunića). Oni se često smatraju neprikladnim modelom za ovakvu vrstu eksperimenta zbog njihove specifičnosti koja se ogleda u konstantnom rastu i trošenju zuba, pogotovo frontalnih (Verstraete i sar. 2005).

Međutim, mnogi se ne slažu s tim i ističu da pulpo-dentinski kompleks glodara ima značajan potencijal za ispitivanje mnogih aspekata reaktivne dentinogeneze (Sloan i Smith 1999.) kao i za praćenje reakcija pulpe na bioaktivne molekule (Orhan i sar. 2012).

Jean i sar. (1993) nisu uočili razlike u procesima zarastanja posle direktnog prekrivanja pulpe kalcijum hidroksidom između eksperimenata na svinjama, glodarima i psima u periodu od tri nedelje do 4 meseca. Dammaschke (2010.) čak ističe da su mnogi istraživači zaključili da su rezultati postupka direktnog prekrivanja zuba glodara uporedljiviji sa ljudskim zubima, u odnosu na rezultate dobijene u eksperimentima na psima. Primećeno je češće migriranje materijala za direktno prekrivanje u pulpu pasa, nego kod glodara. Taj rasuti materijal deluje kao strano telo i izaziva zapaljensku reakciju. Smatra se da zapaljenska reakcija kod glodara (hrčaka, pacova) identična onoj kod ljudi (Dammaschke, 2010). Čak se biološki odgovori odvijaju brže nego kod ljudi, što je posebno istakao Moretton činjenicom da je tri godine u životu pacova ekvivalent 90 godina ljudskog života (Moretton i sar. 2000).

Često korišćene životinje za ovu vrstu eksperimenata su majmuni kao razvijenija vrsta. Međutim, s tim se ne slaže Brännström (1981) jer ističe da postoje razlike u pulpnoj reakciji između ljudi i majmuna, jer je produkcija reparativnog dentina različita odn. neuporediva. Byers je ispitujući inervaciju dentina na zubima majmuna, ustanovila da je njihov reparatorni dentin slabo inervisan, različite tubularne strukture, često bez odontoblastnih nastavaka (Byers i sar. 1983). Iako su majmuni evolutivno bliži i sličniji ljudima nego psi i glodari, po ovim nalazima, reakcija pulpnog tkiva nije slična (Dammaschke 2010).

Zbog izrazite reaktivnosti pulpnog tkiva i ubrzanih bioloških odgovora, a posebno zbog brige o dobrobiti razvijenijih životinjskih vrsta, eksperiment je realizovan na laboratorijskim eksperimentalnim životinjama, kunićima.

Biomaterijali postavljeni u kontakt sa zubnim/koštanim tkivima trebali bi podsticati tkivni odgovor u smislu adhezije, proliferacije i diferencijacije ćelija. Topografija i hemizam površine cementa ima važnu ulogu u adheziji odontoblasta na biomaterijal. Poznato je da mikro- i nano-topografija površine i adsorbovani proteini direktno utiču na ponašanje i aktivnost ćelija pre svega u smislu njihove adhezije i održivosti na mestu aplikacije (Gandolfi i sar. 2009).

Nanostrukturne površine kalcijum silikatnih cemenata pokazuju povećanu osteoplastnu adheziju, proliferaciju i diferencijaciju, jer je i kost sama po sebi nanostrukturna, a veličina i geometrija kristala mogu modifikovati odgovor okolnog tkiva.

Interakcija između materijala za direktno prekrivanje i povređenog pulpnog tkiva kao i način na koji se pokreću i razvijaju procesa izlječenja i regeneracije, nije još uvek potpuno jasan. Postoje mnoge hipoteze, ali novije studije glavnu ulogu pripisuju faktorima rasta u angiogenezi, mobilizaciji progenitornih ćelija, diferencijaciji i konačno mineralizaciji potpomognutoj biomaterijalima (Laurent i sar. 2012).

Kao posledica eksperimentalne perforacije, ali i inicijalnog efekta testiranih materijala u svim posmatranim uzorcima zuba se javila blaga do umerena zapaljenska reakcija. Zapaljenski infiltrat se nalazio u neposrednoj blizini postavljenog materijala, bez daljeg širenja u koronarnu pulpu. Najslabiju zapaljensku reakciju, negde čak i potpuno odsustvo pokazali su uzorci gde je kao materijal za direktno prekrivanje postavljen kalcijum silikatni cement (CS) što se slaže sa nalazima i drugih istraživača, koji nalaze i do 50% uzoraka bez znakova zapaljenja u ranoj fazi (Asgary i sar. 2008, Zarrabi i sar. 2010, da Silva i sar. 2011). Umereno zapaljene je konstatovano kod CS-HA i MTA, što potvrđuju i slični eksperimenti gde se zapaljenje javlja kod više od 62% uzoraka sa MTA posle dve nedelje, dok intenzitet opada posle osam nedelja.

Ovaj inicijalno izražen zapaljenski odgovor je rezultat koagulacione nekroze pulpnog tkiva u kontaktu sa MTA (pH je 9-10). Ova mumificirana zona deluje stimulatивно na okolno vitalno pulpno tkivo, koje pokreće lanac procesa koji će dovesti do izlečenja. Usled bio-degradacije materijala u kontaktu sa tkivnim fluidima, dolazi do oslobađanja Ca i P jona i stvaranja alkalnog okruženja, koje deluje povoljno na adheziju i proliferaciju ćelija uključenih u procese izlečenja (Accorinte i sar. 2008a, 2008b, Shayegan i sar. 2009, Zarrabi 2010).

Poznato je da prisustvo bakterija značajno usporava procese zaceljenja pulpne rane. Faraco Junior i Holland (2004), kao i Briso (2006) u ekperimentima na zubima pasa uočavaju prisustvo gram-pozitivnih *coca*, a Accorinte i sar. (2008b) u čak 10 % uzoraka ljudskih zuba detektuje gram-negativne mikroorganizme. Smatraju da je osnovni problem u neadekvatnom ispunu i koronarnom curenju (duž marginalne pukotine) ili u rasejavanju bakterija krvlju tzv. anahorezom.

U ovoj studiji ni na jednom uzorku nisu uočene bakterije, što govori o striktnom pridržavanju protokola o aseptičnom endodontskom zahvatu, zatim o dobrim zaptivnim karakteristikama testiranih materijala i konačno o dobroj hemijskoj vezi između glas-jonomera, koji je korišćen za definitivno zatvaranje pristupnih kaviteta, i gleđi zuba. Dobar izbor materijala za zatvaranje kaviteta sprečava pojavu marginalne pukotine i naknadni prodor bakterija do pulpne rane.

Odgovor pulpnog tkiva na materijal počinje prvo sa akutnim zapaljenjem, koje ne mora biti zastupljeno u svim slučajevima (Leprince i sar. 2012), a koje podrazumeva vaskularnu reakciju sa infiltracijom neutrofila čiji proteolitički enzimi oštećuju lokalno tkivo. Posle ove više ili manje izražene faze, zapaljenje prelazi u hronično gde polimorfonukleare zamenjuju limfociti i makrofagi. Posle 3-5 dana stvaraju se klonovi limfocita i tkivo je infiltrirano imunokompetentnim ćelijama (T limfocitima). Oni aktiviraju makrofage (ćelijski adaptivni imuni sistem) koji tada proizvode različite zapaljenske medijatore kao

što su interleukini (IL-1), prostaglandini (PGE₂), tumor necrosis faktor α i drugi (da Silva i sar. 2011).

Formiranje, kvalitet i debljina kalcifikovanog mosta, prisustvo zapaljenskih ćelija i očuvanost pulpnog tkiva su važni pokazatelji tkivnog odgovora u terapiji direktnog prekrivanja (Parirokh & Torabinejad 2010, Shahravan i sar. 2011). Ti parametri (prema Accorinte i sar. 2008) su uzeti kao relevantni i korišćeni su za histološku ocenu uspešnosti terapije sa testiranim nanomaterijalima u ovoj studiji.

Formiranje dentinskog mosta na spoju pulpe i materijala za direktno prekrivanje je tema za diskusiju, jer dentinski most ne mora nužno da predstavlja znak očuvanosti (zdravlja) pulpe. On može biti protumačen kao znak izlečenja ili kao reakcija na iritaciju. U ovoj studiji je interpretiran kao znak biokompatibilnosti i bioaktivnosti materijala, što je stav i drugih istraživača (Asgary i sar. 2008, Zarrabi i sar. 2010).

Pulpo-dentinski kompleks ima regenerativni potencijal koji se ogleda formiranjem tercijarnog dentina. Tercijarni dentin čine reaktivni i reparatorni dentin. *Reaktivni dentin* stvaraju preostali odontoblasti koji su preživeli «povredu». Usled intenzivnijih povrede koje dovode do uništenja odontoblasta, stem/progenitorne ćelije se regrutuju (aktiviraju) na mestu povrede, diferenciraju se u ćelije slične odontoblastima i tada stvaraju *reparativni dentin* (Sloan & Smith 2007, Yang i sar. 2010, Frozoni i sar. 2012). Reparativni dentin je često masivno, atubularno tkivo koje Frozoni naziva osteodentin. Ovakva vrsta često ne samo da nema strukturne karakteristike dentina, već ni funkcionalna svojstva primarnog dentina. Ćelije slične odontoblastima, po mišljenju Franssona i sar. (2011) ne mogu da pokrenu imunološke i inflamatorne odgovore koji se viđaju kod primarnih odontoblasta. To može biti razlog za neuspeh u terapiji direktnog prekrivanja pulpe u kliničkim studijama.

Kato i sar. (2010) ističu da se u toku reparativne dentinogeneze stvaraju proteini odgovorni za osteogenezu pre svega alkalna fosfataza (ALP), kolagen tipa I (COL-1) i koštani sijeloprotein (BSP), osteokalcin i osteopontin. ALP je

neophodan faktor u mineralizaciji dentina, a BSP je nekolageni protein koji se nalazi u kostima, dentinu i pulpi, a predstavlja rani marker diferencijacije osteoblasta i ćelija sličnih odontoblastima. COL-1 čini 90% dentinskog matriksa. Dentinski matriks nije samo skafold za pokretanje i razvoj mineralizovanog tkiva, već je i rezervoar faktora rasta koje luče odontoblasti i pulpni fibroblasti (Chen i sar. 2009). Ovi faktori rasta hipotetički daju signal za proliferaciju, diferencijaciju i okupljanje pulpnih ćelija na mestu oštećene pulpe i iniciraju regeneraciju tkiva. Specifični faktori koji deluju na stem ćelije dentalne pulpe da odgovori na povredu još nisu identifikovani (Howard i sar. 2010). Laurent i sar. (2012) ističu da je uloga i mehanizam delovanja faktora rasta u slučajevima direktnog prekrivanja pulpe, kad je prirodni odontoblastni sloj uništen, još uvek nejasan.

U svim uzorcima ove studije u periodu od 10. do 14. dana je uočeno formiranje tankog sloja kalcifikovanog tkiva. Ne može se govoriti o dentinskom mostu, jer je zbog izbora animalnog modela eksperiment trajao dve nedelje. Ovaj interval praćenja odgovara istraživanjima Tziafas-a i sar. (2002) i Zarrabi-a i sar. (2010) koji su uočili inicijaciju formiranja tvrdog tkiva i posle 2 nedelje.

Formiranje novog kalcifikovanog tkiva za ovo relativno kratko vreme je iznenađujući, ali veoma ohrabrujući nalaz. Veći sloj organizovanijeg novog kalcifikovanog tkivo uočen je u uzorcima sa eksperimentalnim cementima (CS i CS-HA). Ovakav nalaz je u korelaciji sa blagim i umerenim stepenom zapaljenja kod uzoraka sa CS i CS-HA i potvrda je njihove biokompatibilnosti. Pulpni odgovor na MTA je bio intenzivniji i cela koronarna pulpa je bila infiltrirana ćelijama zapaljenja. Ovakav zapaljenski odgovor je usporio stvaranje kalcifikovanog tkiva na mestu pulpne rane.

Chen i sar. (2009) su prvi objavili da CS cementi stimulišu ekspresiju koštanih markera (COL-1, ALP, BSP) već posle 7 dana. Lee (2010) i D'Antó (2010) smatraju da kalcijum silikatni cementi podržavaju tkivnu regeneraciju tako što promovišu adheziju, proliferaciju i migraciju mezenhimalnih stem ćelija i podstiču aktiviranje odontoblastnih markera, pre svega ALP-a. Iste

pozitivne rezultate dobili su Hakki i sar. (2013) koji su ispitivali efekte različitih kalcijum silikatnih cemenata na održivost i ekspresiju gena vezanih za mineralizaciju cementnog tkiva.

MTA je u ovoj studiji, u ovom ograničenom vremenskom opsegu, pokazao najmanju sposobnost stimulisanja pulpnog tkiva na stvaranje kalcifikovane barijere. Uočene su lateralne depozicije kalcifikovanog tkiva ali sa najmanjom sličnošću sa dentinskim tkivom. Nalazi su u suprotnosti sa istraživanjima Roberts-a (2008) koji je na zubima glodara uočio kompletan dentinski most ispod sivog MTA već posle dve nedelje, dok Zarrabi (2010) posle dve nedelje uočava samo fibrozno tkivo bez kalcifikacija.

Ipak većina istraživača ističe jasne dokaze o pojavi reparativne dentinogeneze u pulpi ispod MTA ili pojavu kalcifikovanog tkiva tek posle mesec dana (Hwang i sar. 2008, Frozoni i sar. 2012). Oni ističu da 33% uzoraka ima kompletan dentinski most (Shahravan i sar. 2011), dok se posle 8 nedelja dentinski most sa iregularnim tubulima uočava kod 60- 75% uzoraka (Briso i sar. 2006, Min i sar. 2008, Zarrabi i sar. 2010). Gomes-Filho (2012) u svojim istraživanjima naglašava da MTA konstantno indukuje formiranje strukturno superiornijeg dentina i u većoj količini nego kalcijum hidroksid.

Asgary ističe da novi endodontski cementi sa sličnom strukturom kao MTA, ali sa unapređenim fizičko-hemijskim svojstvima (u koje spadaju i nanomaterijali ovde testirani), pokazuju bolji pulpni odgovor (slabiju zapaljensku reakciju) i deblji dentinski most nego MTA. Takođe, nalazi da se sloj ćelija sličnih odontoblastima češće uočava kod uzoraka sa eksperimentalnim CS cementima, nego kod MTA. Objašnjenje za to on nalazi u činjenici da u sastav novih cemenata ulaze različita kalcijumova jedinjenja koja su bogat izvor Ca i P jona, neophodnih u procesima stvaranja hidroksiapatita (Asgary i sar. 2008).

Već je ranije istaknuto da osobine biomaterijala kao što su topografija, hemizam ili površinska energija igraju važnu ulogu u adheziji osteoblasta na biomaterijal. Posebno inicijalna faza interakcije ćelija/materijal i kvalitet ove

veze imaju uticaja na kapacitete ćelija da proliferišu i da se diferenciraju. Ćelijski odgovor na biomaterijal počinje sa adsorpcijom proteina, prati ga faza vezivanja u koju su uključene fizičko-hemijske veze između ćelija i materijala, a ostvaruje se jonskim vezama (Ko i sar. 2007).

Kalcijum silikatni materijali poseduju dobru biokompatibilnost koja se ispoljava indukcijom formiranja sloja sličnog apatitu koji može da stimuliše taloženje mineralizovanog tkiva na svoju površinu i kasnije integraciju sa okolnim tkivom *in vivo* (Liu i sar. 2011). Ovi cementi predstavljaju bogat izvor kalcijumovih i fosfatnih jona, koji su neophodni za sintezu hidroksiapatita, što je inače prirodni proizvod ćelija zubne pulpe. Ovim procesima može se objasniti njihova biokompatibilnost (Zarrabi i sar. 2010).

Gandolfi (2009) je dokazala da kalcijum silikatni cementi (MTA i njemu slični cementi) pokazuju osteokonduktivnost, odnosno ćelijsku adheziju i proliferaciju čak i na sveže zamešanom cementu. Ovo se dešava verovatno zbog otpuštanja silikatnih jona koji mogu da stimulišu sintezu kolagena tip I i diferencijaciju ćelija u ćelije slične odontoblastima (Gandolfi i sar. 2010, Liu i sar. 2011). Si-OH grupe na površini hidrogela deluju kao centri nukleacije apatitnih precipitacija (Coleman i sar. 2008).

Da Silva (2011) i Gomes-Filho (2012) smatraju da kalcijum silikatni cementi otpuštaju kalcijumove jone koji učestvuju u aktivaciji kalcijum zavisne adenozin trifosfataze i dalje reagujući dovode do stvaranja kalcijum karbonatnih kristala koji su nukleus kalcifikacije. Iz bogate ekstracelularne mreže fibronektin se taloži na površini kristala kalcita i to predstavlja inicijalni korak u formiranju tvrdog tkiva. Kalcijum je, takođe, neophodan za ćelijsku migraciju i diferencijaciju. Ovi procesi diferencijacije ćelija dentalne pulpe su još kontrolisani i podržani različitim faktorima rasta, signalnim molekulima i transkriptivnim faktorima (Qi i sar. 2013).

Studije o hidroksiapatitu (HA) kao materijalu za direktno prekrivanje daju potpuno oprečne rezultate i po pitanju zapaljenskog odgovora i po pitanju formiranja kalcifikovanog mosta. HA poseduje izvrsnu biokompatibilnost, ali

po mišljenju Ando-a (2009) nema dentinogene efekte na pulpu kad se koristi za direktno prekrivanje. Da su rezultati studija konfuzni slaže se i Danesh i sar. (2012), koji ukazuju da se rezultati zapaljenja kreću od umereno hroničnih, preko ekstenzivnih distrofičnih kalcifikacija, pa do potpunog odsustva zapaljenskog odgovora. Pojedini autori ukazuju na odsustvo dentinskog mosta, dok drugi nalaze dobro kalcifikovan most posle tri meseca (Jabbarifar i sar. 2007).

Pri tumačenju rezultata mora se voditi računa i o vrsti tkiva i eksperimentalnom modelu (životinjskom ili ljudskom) jer je tkivni odgovor različit, ali i o načinu ocenjivanja (skorovanja) histoloških nalaza i sl.

Za neuspeh HA kao materijala za direktno prekrivanje pulpe, Danesh ističe činjenicu izostanka hemijske iritacije tkiva, koja se viđa kod MTA (inicijalna toksičnost i iritacija) i koja je neophodna za pokretanje lanca reakcija za reparaciju tkiva.

Da bi se istakle sve dobre strane HA keramike, a minimizirala njegoa slaba mehanička svojstva, danas u eri regenerativne endodoncije HA se kombinuje sa kalcijum silikatnim ili kalcijum fosfatnim cementima, gde kao skafoldi vode tkivnu regeneraciju i mogu da indukuju formiranje tvrdih tkiva.

U ovoj studiji je korišćena formulacija HA/CS u odnosu 40/60 koja je pokazala dobru biokompatibilnost u prethodnim eksperimentima. I u ovom eksperimentu dobijen je pozitivan biološki odgovor odn. depozicija kalcifikovanog tkiva na lateralnim zidovima zuba obe vilice. Ovo kalcifikovano tkivo je bilo iregularne strukture. Kod smeše HA-CS primećeno je i rasipanje materijala u pulpno tkivo, što je dovelo do reakcije džinovskih ćelija prema stranom telu. Ovi procesi su svakako usporili stvaranje funkcionalnijeg tkiva za reparaciju posle direktnog prekrivanja pulpne rane. Ovaj nalaz se delimično može objasniti intenzivnim i ubrzanim fiziološkim metaboličkim procesima koji se dešavaju u pulpi glodara, a posledica su otvorenog apeksa, pluripotentne pulpe i konstantnog rasta zuba.

Svojstvo ovih biokeramičkim materijala (CS, CS-HA, MTA) je hidroksiapatitni sloj, koji se formira na njihovoj površini odmah posle kontakta sa biološkim fluidima bogatim fosfatnim jonima. Ovaj sloj može se integrisati sa dentinom (Liu i sar. 2011). Biokeramički materijali su poznati po interakciji sa dentinom gde dovode do intertubularne inkorporacije Ca i Si jona i intrafibrilarnom taloženju apatita što ističe njihova biokompatibilna svojstva (Han i Okiji 2011).

Rezultati prikazani u ovoj *in vivo* studiji na animalnom modelu dokazali su da kalcijum silikatni sistemi i MTA imaju povoljan biološki odgovor kad se koriste kao sredstvo za direktno prekrivanje pulpe. Sva tri materijala su pokazala biokompatibilnost i sposobnost indukovanja kalcifikacije tkiva na spoju sa pulpnim tkivom u periodu od 14 dana.

Ipak, mora se naglasiti, da su se eksperimentalni nanostrukturni cementi korišćeni u ovom istraživanju pokazali pogodnijim i efikasnijim u odnosu na MTA, s obzirom na mnogo kraće vreme vezivanja ovih materijala.

Na kraju, treba istaći da su ovi nalazi rezultat odgovora zdrave pulpe, bez inflamacije, a da ponašanje ovih materijala u odnosu na inflamiranu pulpu tek treba proveriti u daljim istraživanjima.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja novosintetisanih nanostrukturnih kalcijum silikatnih sistema - CS i mešavine kalcijum silikatnih sistema i hidroksiapatita - CS-HA, može se zaključiti:

- Nanostrukturni CS nisu doveli do indukcije genotoksičnih oštećenja u humanim limfocitima 4 donora u koncentracijama od 0.01-5mg/ml.
- Najviša testirana koncentracija CS (10mg/ml) je indukovala oštećenja DNK molekula (do 7% DNK u repu).
- Nanostrukturno dizajnirani CS-HA nije doveo do genotoksičnih oštećenja DNK molekula kod 4 donora.
- Subkutana implantacija biokeramičkih materijala na bazi CS izazvala je umerenu zapaljensku reakciju vezivnog tkiva, posle 7 dana.
- Subkutana implantacija biokeramičkih materijala CS-HA izazvala je umerenu zapaljensku reakciju vezivnog tkiva, posle 7 dana.
- U opservacionom periodu od 15 dana, došlo je do opadanja intenziteta zapaljenske reakcije za CS, što je pratilo i razvijanje veoma tanke fibrozne kapsule.
- U opservacionom periodu od 15 dana, za materijal CS-HA došlo je do značajnijeg opadanja intenziteta zapaljenske reakcije i formiranja tanke kapsule.
- U opservacionom periodu od 30 dana, opada intenzitet zapaljenja za materijal CS, a uočava se bolje formirana fibrozna kapsula.
- U opservacionom periodu od 30 dana, uočava se minimalna zapaljenska reakcija za materijal CS-HA i dobro razvijena fibrozna kapsula.

- Posle 60 dana, tkivo oko CS je bez zapaljenske reakcije, bez vaskularne kongestije i sa očuvanim integritetom vezivnog tkiva. Formirana je umereno razvijena kapsula.
- Subkutana implantacija materijala na bazi CS-HA, od početka do kraja eksperimentalnog perioda je imala blažu zapaljensku reakciju.
- Debljina fibrozne kapsule oko CS-HA je bila značajno deblja u odnosu na vrednosti kontrolnog materijala, što ukazuje na veoma dobru tolerantnost tkiva na ovaj materijal.
- Biofunktionalnost CS *in vivo*, je potvrđena novoformiranim kalcifikovanim tkivom, pravilnije strukture (osteodentin) na mestu kontakta sa materijalom za direktno prekrivanje pulpe.
- Biofunktionalnost CS-HA materijala za direktno prekrivanje pulpe potvrđena je novoformiranim kalcifikovanim tkivom atubularne građe debljine do 149 μ m na zubima obe vilice.
- Na osnovu ovog istraživanja može se zaključiti da su novositetisani biomaterijali CS i CS-HA biokompatibilni i sa izraženim osteokonduktivnim potencijalom.

8. LITERATURA

1. **About** I, Raskin A, de Meo M, Déjou J. Cytotoxicity and Genotoxicity of a New Material for Direct posterior Fillings. *European Cell and materials* 2005;10 Suppl 4:23
2. **Accorinte** MLR, Holland R, Reis A, Bortoluzzi MC, Murata SS, Dezan E, Souza V, Loguercio AD. Evaluation of Mineral Trioxide Aggregate and Calcium Hydroxide Cement as Pulp-Capping Agents in Human Teeth. *J Endod* 2008b; 34:1-6
3. **Accorinte** MLR, Loguercio AD, Reis A, Carneiro E, Grande RHM, Murata SS, Holland R. Response of Human Dental Pulp Capped with MTA and Calcium Hydroxide Powder. *Operative Dentistry* 2008a;33(5):488-495
4. **Akbari** M, Rouhani A, Samiee S, Jafarzadeh H. Effect of dentin bonding agent on the prevention of tooth discoloration produced by mineral trioxide aggregate. *Journal of Dentistry* 2012. Article ID 563203.
5. **Ando** Y, Honda MJ, Ohshima H, Tonomura A et al. The induction of dentin bridge-like structures by constructs of subcultured dental pulp-derived cells and porous HA/TPC in porcine teeth. *J Med Sci* 2009;71:51-62
6. **Arun** M, Silja PK, Mohanan VP. Evaluation of hydroxyapatite-bioglass and hydroxyapatite-ethyl vinyl acetate composite extracts on antioxidant defense mechanism and genotoxicity. *Toxicol Mech Meth.* 2011; 21(7):561-566.
7. **Asad** LMBO, Medeiros DC., Felzenszwalb I., Leitão AC., Asad, NR. 2000. Participation of stress-inducible systems and enzymes involved in BER and NER in the protection of *Escherichia coli* against cumene hydroperoxide Mutation Research - DNA Repair 2000;461(1):31-40
8. **Asgary** S, Eghbal MJ, Parirokh M, ghanavati F, Rahimi H. A comparative study of histologic response to different pulp capping materials and a novel endodontic cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:609-14
9. **Asgary** S, Eghbal MJ, Parirokh M, Ghoddusi J, Kheirieb S, Brink F. Comparison of Mineral Trioxide Aggregates Composition with Portland Cements and a New Endodontic Cement. *J Endod* 2009;35(2):243-250

10. **Asgary S**, Skahabi S, Jafarzadeh T, Amini S, Kheirieb S. The properti of a New Endodontic Material. J Endod 2008;34(8):990-3
11. **AshaRani PV**, Mun GLK; Hande MP, Valiyaveettil. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. ACS Nano 2009;3(2).279-290
12. **Azqueta A**, Lorenzo Y, Collins A. In vitro comet assay for DNA repair: a warning concerning application to cultured cells. Mutagenesis. 2009; 24:379-381.
13. **Baraba A**, Žeželjić, Kopjar N, Mladinić M, Anić I, Miletić I. Evaluation of citotoxic and genotoxic effects of two resin-based root -canal sealers and their components on human leucocytes *in vitro*. Int Endod J 2011;44:652-661
14. **Besinis A**, van Noort R, Martin N. Remineralization potential of fully demineralized dentin infiltrated with silica and hydroxyapatite nanoparticles. Dental Materials 2014;30:249-62
15. **Blanco E**, Hsiao A, Ruiz-Esparza GU, Landry MG, Meric-Bernstam F, Ferrari M. Molecular-targeted nanotherapies in cancer: Enabling treatment specificity. Molecular oncology 2011;5:492-503
16. **Bodrumlu E**, Muglali M, Sumer M, Guvenc T. The Response of Subcutaneous Connective Tissue to a New Endodontic Filling Material. Journal of Biomedical Materials Research Part B:Applied Biomaterials 2008;84B:463-467
17. **Bohner M**, Lemaitre J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? Biomaterials. 2009; 30:2175-2179.
18. **Bortoluzzi EA**, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. J Endod 2006;9:897-900
19. **Bose S**, Darsell J, Hosick H, Yang L, Sarkar D, Bandyopadhyay A. Processing and characterization of porous alumina scaffolds. J Mater Sci-Mater M. 2002; 13: 23-28.
20. **Bramante CM**, Demarchi AC, Moraes IG et al. Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008;106:909-13
21. **Brännström M**. Dentin and Pulp in Restorative dentistry. Nacka:Dental Therapeutics 1981;81

22. **Brayan** TE, Khechen K, Brackett MG, et al. *In vitro* Osteogenic Potential of an Experimental Calcium Silicate-based Root Canal Sealer. *J Endod* 2010;36(7):1163-69
23. **Braz** MG, Camargo EA, Salvadori DMF, Marques MEA, Ribeiro DA. Evaluation of genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to mineral trioxide aggregate and portland cements. *J Oral Rehabil.* 2006; 33:234-9.
24. **Brendler-Schwaab** S., Hartmann A., Pfuhler S, Speit G. (2005). The in vivo comet assay: Use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 2005;20: 245-254
25. **Briso** ALF, Rahal V, Mestrener SR, Dezan Jr E. Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Braz Oral Res* 2006; 20(3):219-25
26. **Brzović** V, Miletić I, Zeljezić D, Mladinić M, Kasuba V, Ramić V, Anić I. In vitro genotoxicity of root canal sealers. *Int Endod J.* 2009; 42:253-63.
27. **Buzea** C, Pacheo II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2007;2(4):MR17-71
28. **Byers** MR, Dong WK. Autoradiographic location of sensory nerve endings in dentin of monkey teeth. *The Anatomical Record* 1983;205(4):441-454
29. **Camargo** SEA, Camargo CHR, Hiller K-A, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J.* 2009; 42:227-37.
30. **Camilleri** J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Pitt Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dental Materials* 2005;21:297-303
31. **Camilleri** J & TR Pitt Ford. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J* 2006;39:747-54
32. **Camilleri** J. A review of the methods used to study biocompatibility of Portland cement-derived materials used in dentistry. *Malta amedical ajournal* 2006;18(3):9-14
33. **Camilleri** J. Hydration Characteristics of Calcium Silicate Cements with Alternative Radiopacifiers Used as Root-end Filling Materials. *J Endod* 2010;36(3):502-8

34. **Camilleri J.** & Mallia B. Evaluation of the dimensional changes of mineral trioxide aggregate sealer. *Int Endod J* 2011;44:416-424
35. **Camilleri J,** Kralj P, Veber M, Sinagra E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. *Int Endod J* 2012;45:737-743
36. **Camilleri J,** Formosa L, Damodot D. The setting characteristics of MTA Plus in different environmental conditions. *Int Endod J* 2013;46:831-840
37. **Cavalcanti BN,** Zeitlin BD, Nör JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dental Materials* 2013;29:97-102
38. **Chen CC,** Huang TH, Ding SJ, Shie MY, Kao CT. Comparison of Calcium and Silicate Cement and Mineral Trioxide Aggregate Biologic Effects and Bone Markers Expression in MG63 Cells. *J Endod* 2009;35(5):682-5
39. **Chen CC,** Kao CT, Ding SJ, Shie MY, Huang TH. Expression of the Inflammatory Marker Cyclooxygenase-2 in Dental pulp Cell Cultured with Mineral Trioxide Aggregate or Calcium Silicate Cements. *J Endod* 2010;36:465-8
40. **Chen CC,** Wang WC, Ding SJ. *In vitro* physiochemical properties of a biomimetic gelatin/chitosan oligosaccharide/calcium silicate cement. *Journal of Biomedical Materials Research B:Applied biomaterials* 2010;95B(2):456-465
41. **Chen CC,** Shie MY, Ding SJ. Human dental pulp cell responses to new calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J* 2011;44:836-842
42. **Chen M,** Von Mikecz A. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Exp Cell Res.* 2005; 305:51-62.
43. **Chen S,** Schultz PG, Brock A. An Improved System for the Generation and Analysis of Mutant Proteins Containing Unnatural Amino Acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Mol.Biology* 2007;371:112-122
44. **Chen YZ,** Lü, Liu GD. A novel root-end filling material based on hydroxyapatite, tetracalcium phosphate and polyacrylic acid. *Int Endod J* 2013;46:556-564

45. **Chen Y, Cui D.** Non-spherical Gold Nanoparticles: Tumor Imaging and Therapy. *Nano Biomed.Eng.* 2013;5(4):153-160
46. **Chen F, Zhu Y, Wu J, Huang P, Cui D.** Nanostructured Calcium Phosphates:Preparation and Their Application in Biomedicine. *Nano Biomed.Eng.* 2012;4(1):41-9
47. **Chiang TY, Ding SJ.** Physicochemical properties of radiopaque dicalcium silicate cement as a root-end filling material in an acidic environment. *Int Endod J* 2013;46:234-241
48. **Chng HK, Islam I, Yap AU, Tong YW, Koh ET.** Properties of a new root-end filling material. *J Endod* 2005;10:917-29
49. **Coleman NJ, Awosanya K, Nicholson JW.** Aspect of the in vitro bioactivity of hydraulic calcium (alumino) silicate cement. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2008;166-174
50. **Collares FM, Leitune VCB, Rostirolla FV, Trommer RM, Bergmann CP, Samuel SMW.** Nanostructured hydroxyapatite as filler for methacrylate-based root canal sealers. *Int Endod J* 2012;45:63-67
51. **Collins AR, Dobson LV, Dušinska M, Kennedy G, ŠtetinaR.** The Comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research* 1997;375: 183-193
52. **Collins AR.** The Comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* 2004;26:249-261
53. **Connor RE, Tirrell DA.** Non-Canonical Amino Acids in Protein Polymer Design. *Pol Reviews* 2007;47:9-28
54. **Dai X, Cui D.** Advances In The Toxicity Of Nanomaterials. *Nano Biomed.Eng.* 2012;4(3)
55. **D'Antó V, Di Caprio MP, Ametrano G, Simeone M, Rengo S, Spagnuolo G.** Effect of Mineral Trioxide Aggregate on Mesenchymal Stem Cells. *J Endod* 2010;36:1839-43
56. **Da Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS.** Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. *Int Endod J* 2011;44:100-110

57. **Da Silva** GN, Braz MG, Camargo Ea, Salvadori DMFS, Ribeiro DA. Genotoxicity in primary human peripheral lymphocytes after exposure to regular and white mineral trioxide aggregate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:e50-e54
58. **Dammaschke** T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Animal* 2010;44:1-6
59. **Danesh** F, Vahid A, Jahanbani J, Mashhadiabbas F, Arman E. Effect of white mineral trioxide aggregate compared with biomimetic carbonated apatite on dentine bridge formation and inflammatory response in dental pulp model. *Int Endod J* 2012; 45:26-34
60. **De Moraes** CAH, Bernardineli N, Garcia RB, Duarte MAH, guerisoli DMZ. Evaluation of tissue response to MTA and Portland cement with iodoform. *Oral Surg Oral Med Oral path Oral Radiol Endod* 2006;102:417-22
61. **Ding** SJ, Kao CT, Chen CL, Shie MY, Huang TH. Evaluation of human osteosarcoma cell line genotoxicity effects of mineral trioxide aggregate and calcium silicate cements. *J Endod.* 2010; 36(7):1158-62
62. **Duivenvoorden** D. et al., Mulder WJM. A statin-loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticle inhibits atherosclerotic plaque inflammation. *Nature Communications* 2014,5
63. **Duarte** MAH, De Oliveira Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, De Campos Fraga S. Arsenic release provided by MTA and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:648-50
64. **El-Backly** RM, Massoud AG, El-Badry AM, Sherif RA, Marei MK. Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. *Aust Endod J* 2008;34:52-67
65. **Fairbairn** DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 1995;339: 37-59
66. **Fan** JP, Kalia P, Di Silvio L, Huang J. In vitro response of human osteoblasts to multi-step sol-gel derived bioactive glass nanoparticles for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 2014;36:206-14

67. **Faraco Junior** IM, Holland R. Histomorphological Response of Dogs Dental Pulp Capped with White Mineral Trioxide Aggregate. *Braz Dent J* 2004; 5(2):104-8
68. **Felippe** WT, Felippe MCS, Rocha MJC. The effect of mineral trioxide aggregate on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. *Int Endod j* 2006;39:2-9
69. **Fenech** M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 2000; 455:81-95.
70. **Fenoglio** I, Fubini B, Ghibaudi EM, Turci F. Multiple aspects of the interaction of biomacromolecules with inorganic surface. *Adv Drug Deliver Rev.* 2011; 63:1186-1209.
71. **Figueiredo** JAP, Pesce HF, Gioso MA, Figueiredo MAZ. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. *Int Endod J* 2001;34:377-385
72. **Forbes** WF, Gentleman JF. Risk factors, causality, and policy initiatives: the case of aluminium and mental impairment. *Experimental Gerontology* 1998;33:141-54
73. **Formosa** LM, Mallia B, Camilleri. Mineral trioxide aggregate with anti-washout gel- Properties and microstructure. *Dental Materials* 2013;29:294-306
74. **Fransson** H, Petersson K, Davies JR. Dentine sialoprotein and Collagen I expression after experimental pulp capping in humans using Emdogain Gel. *Int Endod J* 2011;44:259-267
75. **Freshney** RI, Liss AR. Culture of animal cells: A manual of basic technique. Inc., New York 1987. ISBN 0-8451-4241-0.
76. **Frozoni** M, Balic A, Sagomyants K, Zaia AA, Line SRP, Mina M. A feasibility study for the analysis of reparative dentinogenesis in pOBCol3.6GFPTpz transgenic mice. *Int Endod J* 2012;45:907-14
77. **Gaivao** I, Piasek A, Brevik A, Shaposhnikov S, Collins A. Comet assay -based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter- and intra-individual variation. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25:45-52.

78. **Gandolfi** MG, Perut F, Ciapetti G, Mongiorgi R, Prati C. New Portland Cement-based Materials for Endodontics Mixed with Articaine Solution: A Study of Cellular Response. *J Endod* 2008;34(1):39-44
79. **Gandolfi** MG, Ciapetti G, Perut F, Taddei P, Modena E, Rossi PL, Prati C. Biomimetic calcium-silicate cements aged in simulated body solutions. Osteoblast response and analyses of apatite coating. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics* 2009;7(3):160-170
80. **Gandolfi** GM, Taddei P, Tinti A, Prati C. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *Int Endod J*. 2010;43:917-29.
81. **Gandolfi** MG, Ciapetti G, Taddei P, Perut F, Tinti A, Cardoso MV, Van Meerbeek B, Prati C. Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. *Dental Materials* 2010;26:974-992
82. **Ghoddsi** J, Afshari JT, Donyavi Z et al. Cytotoxic effect of a new endodontic cement and mineral trioxide aggregate on L929 line culture. *Int endod J* 2008;3(2):17-23
83. **Gichner** T. DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase-deficient transgenic tobacco. Cellular and acellular Comet assay. *Mutation Research* 2003;535:187-193
84. **Gomes-Filho** JE, Watanabe S, Simonetti Lodi C et al. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX. *Dental Traumatology* 2012;28:452-56
85. **Gou** Z, Chang J, Zhai W, Wang J. Study on the self-setting property and the in vitro bioactivity of beta-Ca₂SiO₄. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;73:244-51
86. **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* 2013a;46:632-641
87. **Grech** L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dental Materials* 2013b;29:e20-e28
88. **Gui** C, Dai X, Cui D. Advances of Nanotechnology Applied to Biosensors. *Nano Biomed. Eng.* 2011;3(4):260-273

89. **Guigand** M, Vulcain JM, Morazin AD, Mallet MB. An Ultrastructural Study of Root Canal Walls in Contact with Endodontic Biomaterials. *J Endod* 1997;23(5):327-330
90. **Güven** EP, Taşlı PN, Yalvac ME, Sofiev N, Kayahan MB, Sahin F. In vitro comparison of induction capacity and biomineralization ability of mineral trioxide aggregate and a bioceramic root canal sealer. *Int Endod J* 2013;46:1173-1182
91. **Hakki** SS, Bozkurt BS, Ozcopur B, Gandolfi MG, prati C, Belli S. The response of cementoblasts to calcium phosphate resin-based and silicate-based commercial sealers. *Int Endod J* 2013;46:242-252
92. **Han** L.&Okiji T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. *Int Endod J* 2011;44:1081-87
93. **Han** L.&Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J* 2013;46:808-814
94. **Haskell** EW, Stanley HR, Chellemi J, Stringfellow H. Direkt pulp capping treatment:a long term follow up. *J Am Dent Assoc* 1978;97:607-12
95. **Hassan** A, Swaminathan D. An In vitro Study to Evaluate the Genotoxicity of Value Added Hydroxyapatite as a Bone Replacement Material. *Sains Malays*. 2011; 40:163-171.
96. **Hazra** TK, Das A, Das S, Choudhury S, Kow YW, Roy R. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. *DNA Repair*. 2007; 6:470-480.
97. **Hensen-Pettersen** A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J* 1988;21:89-99
98. **Higashi** T, Okamoto H. Influence of Particle Size of Hydroxyapatite as a Capping Agent on Cell Proliferation of Cultured Fibroblasts. *J Endod* 1996;22(5):236-9
99. **Holland** R, Souza V, Nery MJ, Filho JAO, Bernabè PFE, Dezan Jr E. Reaction of Rat Connective Tissue to Implanted Dentin Tubes Filled With Mineral Trioxide Aggregate or Calcium Hydroxide. *JOE* 1999;25(3):161-6

100. **Holland R**, Mazuqueli L, deSouza V, Murata SS, Dezan Junior E, Suzuki P. Influence of the Type of Vehicle and Limit of Obturation on Apical and Periapical Tissue Response in Dogs Teeth after Root Canal Filling With Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 2007;33(6):693-7
101. **Horváthová E**, Slameňová D, Hlinčíková L, Mandal TK, Gábelová A, Collins AR. (1998). The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay, *Mutation Research - DNA Repair* 1998; 409:163-171
102. **Howard C**, Murray PE, Namerow KN. Dental Pulp Stem Cell Migration. *J Endod* 2010;36(12):1963-6
103. **Hsieh SC**, Teng NC, Lin YC, Lee PY, Ji DY, Chen CC, Ke ES, Lee SY, Yang JC. A novel accelerator for improving the handling properties of dental filling materials. *J Endod*. 2009; 35:1292-5.
104. **Hsien HC**, Cheng YA, Lee YL, Lan WH, Lin CP. Repair of Perforating Internal Resorption with Mineral Trioxide Aggregate: A Case Report. *J Endod* 2003;29(8):538-9
105. **Huang X**, Miao X. Novel porous hydroxyapatite prepared by combing H₂O₂ foaming with PU sponge and modified with PLGA and bioactive glass. *Journal of Biomaterials Applications* 2007
106. **Hu H-t**, Xu G-h, Liu J-c et al. biological security of nano-hydroxiapatite whisker and β -tricalcium phosphate composited bone substitute. *Journal of Clinical rehabilitative Tissue Engineering Research* 2011;15:9575-8
107. **Hwang YC**, Hwang IN, Oh WM, Park JC. Influence of TGF- β 1 on the expression of BSP, DSP, TGF- β 1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis. *J Mol Hist* 2008;39:153-160
108. **International Organization for Standardization**. ISO 10993: 2009 ed.
109. **International Standard Organisation**. ISO 7405 *Dentistry-Preclinical Evaluation of Biocompatibility of Medical Device Used in Dentistry-Test metod for Dental Material*. Geneva, Switzerland 1997
110. **Ioannidis K**, Mistakidis I, Beltes P, Karagiannis. Spectrophotometric analysis of coronal discolouration induced by grey and white MTA. *Int Endod J* 2013;46:137-144

111. **Jabbarifar E**, Razavi SM, Ahmadi N. Histopathologic Responses of Dogs Dental pulp to Mineral Trioxide Aggregate, Bio Active Glass, Formocresol, Hydroxyapatite. *Dental Research Journal* 2007;4:83-7
112. **Jantova S**, Theiszova M, Letašiova S, Birošova L, Palou M. In vitro effects of fluor- hydroxyapatite, fluorapatite and hydroxyapatite on colony formation, DNA damage and mutagenicity. *Mutat Res.* 2008; 652: 139-144.
113. **Jean A**, Kerebel B, Kerebel LM, Legeros RZ, Hamel H. Effects of Various Calcium Phosphate Biomaterials on Reparative Dentin Bridge Formation. *J Endod* 1988;14(2):83-7
114. **Jean AH**, Pouézat JA, Daculsi G. Pulpal response to calcium phosphate materials. *In vivo* study of calcium phosphate materials in endodontics. *Cell Mater* 1993;3:193-200
115. **Johansson C**, Møller M, Forchhammer L, Loft S, Godschalk R, Langie S, Lumeij S, Jones G, Kwok R, Azqueta A, Phillips D, Sozeri O, Routledge M, Charlton A, Riso P, Porrini M, Allione A, Matullo G, Palus J, Stepanik M, Collins A, Molleret L. An ECVAGy trial on assessment of oxidative damage to DNA measured by the comet assay. *Mutagenesis.* 2010; 25:125–132.
116. **Jokanović M**. Markov J, Ristić S, Piperski V. Ispitivanje biokompatibilnosti medicinskih sredstava prema novim zahtevima evropske regulative. *ekonferencije.com* 2011
117. **Jokanović V**, Izvonar D, Dramićanin M, Jokanović B, Živojinović V, Marković D, Dačić B. Hydrothermal synthesis and nanostructure of carbonated calcium hydroxyapatite. *J Mater Sci-Mater M.* 2006; 17:539-46.
118. **Jokanović V**, Jokanović B, Marković D, Živojinović V, Pašalić S, Izvonar D, Plavšić M.. Kinetics and sintering mechanisms of hydrothermally obtained hydroxyapatite. *Mater Chem Phys.* 2008; 111:180-5.
119. **Jokanović V**. NANOMEDICINA najveći izazov 21. veka. *Data Status*, Beograd, 2012
120. **Kalmodia S**, Sharma V, Pandeu KA, Dhawan A, Basu B. Cytotoxicity and Genotoxicity Property of Hydroxyapatite-Mullite Eluates. *J Biomed Nanotechnol.* 2011; 7:74-5.

121. **Kaplan** AE, Ormaechea MF, Picca M, Canzobre MC, Ubios AM. Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. *Int Endod J* 2003;36:527-532
122. **Karapinar-Kazandag** M, Bayrak OF, Yalvaç ME, Ersev H, Tanalp J, Şahin F. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *Int Endod J* 2011;44:626-34
123. **Kato** T, Shirayama K, Tsutsui TW, Tsutsui T. Induction of mRNA expression of osteogenesis-related genes by guaiacol in human dental pulp cells. *Odontology* 2010;98:165-169
124. **Keleştemur** S, Kilic E, Uslu U, Cumbul A, Ugur M, Akman S, Culha M. Wound Healing Properties Of Modified Silver Nanoparticles And Their Distribution In Mouse Organs After Topical Application. *Nano Biomed.Eng.* 2012;4(4)
125. **Key** JE, Rahemtulla FG, Eleazer PD. Citotoxicity of a New Root Canal Filling Material on Human Gingival Fibroblasts. *J Endod* 2006;32(8):756-8
126. **Khalil** WA & Eid NF. Biocompatibility of BioAggregate and mineral trioxide aggregate on the liver and kidney. *Int Endod J* 2013;43:730-737
127. **Khashaba** RM, Moussa MM, Chutkan NB, Borke JL. The response of subcutaneous connective tissue to newly developed calcium phosphate-based root canal sealers. *Int Endod J* 2011;44:342-352
128. **Kirkland** DJ, Aardema M, Banduhn N, Carmichael P, Fautz R, Meunier JR, Pfuhler S. *In vitro* approaches to develop weight of evidence (WoE) and mode of action (MoA) discussions with positive *in vitro* genotoxicity results. *Mutagenesis* 2007a;22(3):161-175
129. **Kirkland** DJ, Pfuhler S, Tweats D, Aardema M et al. How to reduce false positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutat Rea* 2007b;628(1):31-55
130. **Ko** HC, Han JS, Bächle M, Jang JH, Shin SW, Kim DJ. Initial osteoblast-like cell response to pure titanium and zirconia/alumina ceramics. *Dental Materials* 2007;23:1349-55
131. **Koulaouzidou** EA, Economides N, Beltes P, Geromichalos G, Papazisis K. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of ProRoot MTA and MTA Angelus. *Journal of oral science* 2008;50(4):397-402

132. **Lah B, Malovrh S, Narat M, Cepeljnik T, Marinsek-Logar R.** (2004). Detection and quantification of genotoxicity in wastewater-treated *Tetrahymena thermophila* using the Comet assay. *Environ. Toxicol.* 2004; 19:545-553
133. **Landsiedel R, Kapp MD, SchultM, Wiench K, Oesch F.** Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations- many questions, some answers. *Mutat Res* 2009;681(2-3):241-58
134. **Laurent P, Camps J, De Meo M, Dejou J, About I.** Induction of specific cell responses to a Ca_3SiO_5 -based posteripr restorative material. *Dental Materials* 2008;24:1486-94
135. **Laurent P, Camps J, About I.** Biodentine induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int endod J* 2012;45:439-448
136. **Leary S, Liu C, Apuzzo M.** Toward the Emergence of Nanoneurosurgery: Part III-Nanomedicine: Targeted Nanotherapy, Nanosurgery, and Progress Toward the Realization of Nanoneurosurgery. *Neurosurgery* 2006;58(6):1009-26
137. **Lee SK, Lee SK, Lee SI, Park JH, Jang JH, Kim HW, Kim EC.** Effect of Calcium Phosphate Cements on Growth and Odontoblastic Differentiation in Human Dental Pulp Cells. *J Endod* 2010;36(9):1537-42
138. **Leprince JG, Zeitlin BD, Tolar M, Peters OA.** Interaction between immune system and mesenchymal stem cell in dental pulp and periapical tissues. *Int Endod J.* 2012;45:689-701
139. **Li C, Cui D.** Superoxide Dismutase, A Potential Theranostics Against Oxidative Stress Caused by Nanomaterials. *Nano Biomed Eng.* 2012;4(4):195-206
140. **Li P, de Grot K.** Better bioactive ceramics trough sol-gel process. *J Sol-Gel Sci Technol* 1994;2:797-801
141. **Lin KL, Chang JA, Lu JX, Wu W, Zeng Y.** Properties of beta- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ bioceramics prepared using nano-sized powders. *Ceram Int* 2007;33:979-85

142. **Liu** WN, Chang J, Zhu YQ, Zhang M. Effect of tricalcium aluminate on the properties of tricalcium silicate-tricalcium aluminate mixtures: setting time, mechanical strength and biocompatibility. *Int Endod J*. 2011;44:41-50
143. **Liu** X, Morra M, Carpi A, Li B. Bioactive calcium silicate ceramics and coating. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2008;62:526-529
144. **Liu** H, Shen G. Ordered Arrays of Carbon Nanotubes: From Synthesis to Applications. *Nano Biomed. Eng.* 2012;4(3):107-117
145. **Liuyun** J, Yubao L, Chengdong X. Preparation and biological properties of a novel composite scaffold of nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose for bone tissue engineering. *J Biomed Sci.* 2009; 16:65-4.
146. **Lotfi** M, Vosoughhosseini S, Saghiri MA, Mesgariabbasi M, Ranjkesh B. Effect of White Mineral Trioxide Aggregate Mixed With Disodium Hydrogen Phosphate on Inflammatory Cells. *J Endod* 2009;35(5):703-5
147. **Marković** D. Histomorfometrijska istraživanja biokompatibilnosti biokeramičkih materijala na bazi kalcijum fosfata. Doktorska disertacija 2009, Beograd
148. **Martinez Lalis** R, Esain ML, Kokubu GA, Willis J, Chaves C, Grana DR. Rat Subcutaneous Tissue Response to Modified Portland Cement, a New Mineral Trioxide Aggregate. *Braz Dent J* 2009;20(2):112-117
149. **Matsumoto** TJ, An SH, Ishimoto T, Nakano T, Matsumoto T, Imazato S. Zirconia-hydroxyapatite composite material with micro porous structure. *Dental Materials* 2011;27:e205-e212
150. **McNamara** RP, Henry Ma, Schindler Wg, Hargreaves KM. Biocompatibility of Accelerated Mineral Trioxide Aggregate in a Rat Model. *J Endod* 2010;36(11):1851-5
151. **Menezes** R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VGG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular end white Portland cements as wound dressings. *Oral Surgery Oral Medicine and Oral Pathology* 2004;98:376-9

152. **Min** KS, Park HJ, Lee SK, Park SH, Hong CU, Kim HW, Lee HH, Kim HW. Effect of Mineral Trioxide Aggregate on Dentine Bridge Formation and Expression of Dentin Sialoprotein and Heme Oxygenase-1 in Human Dental Pulp. *J Endod* 2008;34:666-670
153. **Mitchel** PJC, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 1999;20:167-173
154. **Mitić-Ćulafić** D, Žegura B, Nikolić B, Vuković-Gačić B, Knežević-Vukčević J, Filipič M. Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47:260-5.
155. **Modaresi** J, Yavari AS, Diant O, Shahrabi S. A comparison of Tissue Reaction to MTA and an Experimental Root-End Restorative Material in Rats. *Australin Endodontic Journal* 2005;31(2):69-72
156. **Modareszadeh** MR, Chogle SA, Mickel AK, Jin G, Kowsar H, Salamat N, Shaikh S, Qutbudin S. Cytotoxicity of set polymer nanocomposite resin root-end filling materials. *Int Endod J* 2011;44:154-161
157. **Morais** CAH, Bernardineli N, Garcia RB, Duarte MAH, Guerisoli DMZ. Evaluation of tissue response to MTA and Portland cement with iodoform. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:417-21
158. **Moretton** TR, Brown CE Jr, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res A.* 2000; 52:528-33.
159. **Murray** PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *JOE* 2007;33:377-90
160. **Nedel** F, Soki FN, Conde MCM, Zeitlin BD, Tarquinio SBC, Nör JE, Seixas FK, Demarco FF. Comparative analysis two colorimetric assays in dental pulp cell density. *Int Endod J* 2011;44:59-64
161. **Nishimura** H, Higo Y, Ohno M, Tsutsui TW, Tsutsui T. Ability of root canal antiseptics used in dental practice to induce chromosome aberrations in human dental pulp cells. *Mutation Research* 2008;649:45-53

162. **Noetzel J, Özer K, Reissbauer BH, Anil A, Rossler R, Neumann K, Kielbassa AM.** Tissue responses to an experimental calcium phosphate cement and mineral trioxide aggregate as materials for furcation perforation repair: a histological study in dogs. *Clin Oral Invest* 2006;10:77-83
163. **Oberdörster G. Toxicology of ultrafine particles: *in vivo* studies.** *Phil Trans R Soc Lond A* 2000;358:2719-40
164. **Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K et al.** Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol* 2005;2:8
165. **Okiji T. & Yoshihara K.** Reparative Dentinogenesis Induced by Mineral Trioxide Aggregate: A Review from the Biological and Physicochemical Point of View. *Int Journal of Dentistry* 2009;Article ID464280,12pages
166. **Oliveira IR, Pandolfelli VC, Jacobovitz M.** Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. *Int Endod J* 2010;12:1069-76
167. **Oliveira M, Mansur HS.** Synthetic Tooth Enamel:SEM Characterization of a Fluoride Hydroxyapatite Coating for Dentistry Applications. *Materials Research* 2007;10(2):115-18
168. **Orhan EO, Maden M, Senguven B.** Odontoblast-like cell numbers and reparative dentine thickness after direct pulp capping with platelet-rich plasma and enamel matrix derivative: a histomorphometric evaluation. *Int Endod J* 2012;45:317-325
169. **Ozbas H, Yaltrik M, Bilgic B, Issever H.** Reactions of connective tissue to compomers, composite and amalgam root-end filling materials. *Int Endod J* 2003;36:281-287
170. **Pantě N, Kann M.** Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of 39nm. *Mol. Biol. Cell* 2002;13:425-434
171. **Papić-Obradović M, S. Miljković, L. Matija, J. Munćan, U. Koruga.** *Osnove nanomedicine-embriologija-farmakologija-nanotehnologija.* DonVas/Nauka, Beograd 2009.

172. **Parirokh** M and Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: A comprehensive literature review-part III: Clinical applications, drawbacks and mechanism of action. *J Endod.* 2010; 36:400-13.
173. **Parirokh** M, Mirsoltani B, raof M, Tabrizchi H, Haghdoost AA. Comparative study of subcutaneous tissue responses to a novel root-end filling material and white and grey mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2011;44:283-289
174. **Parirokh** M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010; 36:16-27.
175. **Petrović** M. Biološka aktivnost kompozitnih ćelijskih nosača na bazi visokoporoznih hidroksiapatita i njihov uticaj na tkivno inženjerstvo kosti. Doktorska disertacija 2012
176. **Pissiotis** E, Spangberg LCW. Biological Evaluation of Collagen Gels Containing Calcium Hydroxide and Hydroxyapatite. *J Endod* 1990;16(10):468-73
177. **Pistorius** A, Willershausen B, Briseno Marroquin B. Effect of apical root-end filling materials on gingival fibroblasts. *Int Endod J* 2003;36:610-615
178. **Qi** SC, Cui C, Yan YH, Sun GH, Zhu SR. Effects of high-mobility group box 1 on the proliferation and odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *Int Endod J* 2013;46:1153-63
179. **Radaković** M, Đelić N, Stanimirović Z, Plećaš-Solarović B, Spremo-Potparević B, Živković L, Bajić V. Evaluacija dejstva efedrina na limfocite čoveka u Komet testu. *Acta Veterinaria* 2011;61(4):363-371
180. **Rajab** NF, Yaakob TA, Ong BY, Hamid M, Ali AM, Annuar BO, Inayat-Hussain SH. DNA damage evaluation of hydroxyapatite on fibroblast cell L929 using the single cell gel electrophoresis assay. *Med J Malaysia* 2004;59 Suppl B:170-1
181. **Raković** D, Uskoković D, Balać I i sar. Biomaterijali. Institut tehničkih nauka SANU:Društvo za istraživanje materijala, Beograd 2010 (Beograd:Draslav partner): 221-240
182. **Rempel** MA, Hester B, DeHaro H, Hong H, Wang Y, Schlenk D. Effects of 17 β -estradiol, and its metabolite, 4-hydroxyestradiol on fertilization, embryo development and oxidative DNA damage in sand dollar (*Dendraster excentricus*)sperm. *Science of The Total Environment* 2009;407(7):2209-15

183. **Ribeiro** DA, Duarte MAH, Matsumoto MA, Marques MEA, Salvadori DMF. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland Cements. *J Endod.* 2005a; 31:605-607.
184. **Ribeiro** DA, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. In vitro biocompatibility tests of two commercial types of mineral trioxide aggregate. *Braz Oral Res.* 2005b; 19:183-7.
185. **Ribeiro** DA, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. *Ex vivo* biocompatibility tests of regular and white forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2006a;39:26-30
186. **Ribeiro** DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006b; 101:258-61.
187. **Ribeiro** DA, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. Biocompatibility of gutta-percha solvents using in vitro mammalian test-system. *Oral Surg Oral Med oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:e106-e109
188. **Ribeiro** DA. Do endodontic compounds induce genetic damage? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105:251-6.
189. **Roberts** HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral Trioxide Aggregate material use in endodontic treatment: A review of the literature. *Dental Materials* 2008;24:149-164
190. **Saghiri** MA, Asgar K, Lotfi M, Garcia-Godoy F. Nanomodification of mineral trioxide aggregate for enhanced physiochemical properties. *Int Endod J* 2012;45:979-988
191. **Saidon** J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg LSW. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:483-9
192. **Saiz** E, Zimmermann EA, Lee JS, Wegst UGK, Tomsia AP. Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. *Dental Materials* 2013;29:103-115
193. **Sari** S, Sönmez D. Internal Resorption Treated with Mineral Trioxide Aggregate in a Primary Molar Tooth:18-Month Follow-Up. *J Endod* 2006;32(1):69-71

194. **Savic R**, Luo L, Eisenberg A, Maysinger D. Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles. *Science* 2003;300: 615-18
195. **Scarparo RK**, Haddad D, Acasigua GAX, Fossati ACM, Fachin EVF, Grecca FS. Mineral Trioxide Aggregate-based Sealer: Analysis of Tissue Reactions to a New Endodontic Material. *J Endod* 2010;36(7):1174-8
196. **Scelza MZ**, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J* 2012;45:12-18
197. **Schembri M**, Peplow G, Camilleri J. Analyses of heavy metals in mineral trioxide aggregate and portland cement. *J Endod* 2010;36:1210-16
198. **Scudiero DA**, Shoemaker RH, Paull KD et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research* 1988;48:4827-33
199. **Shahravan A**, Jalali SP, Torabi M, Haghdoost AA, Gorjestani H. A histological study of pulp reaction to various water/powder ratios of white mineral trioxide aggregate as pulp-capping material in human teeth: a double-blinded, randomized controlled trial. *Int Endod J* 2011; 44:1029-33
200. **Shayegan A**, Petein M, Vanden Abbeele A. The use of beta-tricalcium phosphate, with Portland cement and calcium hydroxide for direct pulp capping of primary pig teeth. *Dental Traumatology* 2009;25:413-419
201. **Silva MJB**, Caliari MV, Sobrinho APR, Vieira LQ, Arantes RME. An *in vivo* experimental model to assess furcal lesions as a result of perforation. *Int Endod J* 2009;42:922-29
202. **Silva EJNL**, Herrera DR, Almeida JFA, Ferraz CCR, Gomes BPF, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells by three root repair materials. *Int Endod J* 2012;45:815-20
203. **Silva-Herzog D**, Ramirez T, Mora J, Pozos AJ, Silva LAB, Silva RAB, Nelson-Filho P. Preliminary study of the inflammatory response to subcutaneous implantation of three root canal sealers. *Int Endod J* 2011;44:440-446

204. **Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175:184-91.
205. **Singh NP, Stephens ER, Singh H, Lai H.** Visual quantification of DNA double-strand breaks in bacteria. *Mutation Research* 1999;429:159-168
206. **Sloan AJ, Smith AJ.** Stimulation of dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor- β isoforms 1-3 in vitro. *Archives of Oral Biology* 1999;44:149-156
207. **Sloan AJ, Smith AJ.** Stem cells and the dental pulp: Potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Diseases* 2007;13:151-7
208. **Smaltz G.** Use of cell cultures for toxicity of dental materials-advantages and limitations. *J Dent* 1994; Suppl.2;22:6-11
209. **Sonay Ay, Keseroglu K, Culha M.** 2D Gold Nanoparticle Structures Engineered Through DNA Tiles for Delivery and Therapy. *Nano Biomed.Eng.* 2012;4(1):17-22
210. **Sonmez D, Sari S, Çetinbaş T.** A Comparison of Four Pulpotomy Techniques in Primary Molars: A Long-term Follow-up. *J Endod* 2008;34(8):950-5
211. **Sopyan I, Mel M, Ramesh S, Khalid KA.** Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Science and Technology of Advanced Materials* 2007;8:116-123
212. **Sousa CJ, Loyola AM, Versiani MA, Biffi JC, Oliveira RP, Pascon EA.** A comparative histological evaluation of the biocompatibility of materials used in apical surgery. *Int Endod J* 2004;37:738-48
213. **Stylios G, Wan T, Giannoudis P.** Present status and future potential of enhancing bone healing using nanotechnology. *Int J Care Injured* 2007;3851:563-574
214. **Sumer M, Muglali M, Bodrumlu e, Guvenc T.** Reactions of Connective Tissue to Amalgam, Intermediate Restorative Material, Mineral Trioxide Aggregate, and Mineral Trioxide Aggregate Mixed With Chlohexidine. *JOE* 2006;32(11):1094-96
215. **Suwanprateeb J, Thammarakcharoen F, Wasoontararat K, Chokevivat W, Phanphiriya P.** Preparation and characterization of nanosized silver phosphate loaded hydroxyapatite by single step co-conversion process. *Material Science and Engineering* 2012;32:2122-8

216. **Suzuki T**, Lee CH, Chen M et al. Induced migration of dental pulp stem cell for in vivo pulp regeneration. *Journal of Dental Research* 2011;90:1013-8
217. **Švajhler T**, Filipović-Zore I, Kobler P, Macam D. Uporaba eksperimentalnih životinja u ispitivanju dentalnih implantata. *Acta Stomatol Croat* 1997;31(3):213-220
218. **Takenaka Y**, Iijima M, Kawano S, Akita Y, Yoshida T, Doi Y et al. The development of carbonate-containing apatite/collagen composite for osteoconductive apical barrier material. *J Endod.* 2008; 34:1096-100.
219. **Teixeira S**, Rodriguez MA, Pena P, De Aza AH, De Aza S, Ferraz MP, Monteiro FJ. Physical characterization of hydroxyapatite porous scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 2008
220. **Theiszová M**, Jantová S, Dragúnová J, Grznárová J, Palou M. Comparison the cytotoxicity of hydroxyapatite measured by direct cell counting and MTT test in murine fibroblast NIH-3T3 cells. *Biomed Pap.* 2005;149:393-6.
221. **Tice RR**, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H. et al. Single cell gel comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35:206-21.
222. **Torabinejad M**, Hong CU, Pitt Ford TR, Kariyawasam P. Tissue Reaction to Implanted Super-EBA and Mineral Trioxide Aggregate in the Mandible of Guinea Pigs: A Preliminary Report. *J Endod* 1995a;21(11):569-71
223. **Torabinejad M**, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Citotoxicity of Four Root End Filling Materials. *J Endod* 1995; 21(10):489-492
224. **Torabinejad M**, Pitt Ford TR, Abedi HR, Kariyawasam P, Tang HM. Tissue Reaction to implanted Root-End Filling materials in the Tibia and Mandible of Guinea Pigs. *J Endod* 1998;24(7):468-71
225. **Torreira MG**, Dos Santos AA, Cobos MAR, Boquete F, Abelleira AC. The osteoinductive potential of MTA (Mineral Trioxide Aggregate): a histologic study in rabbits. *Eur J Anat* 2004;8(3):101-5

226. **Tredwin** CJ, Young AM, Georgiou G, Shin SH, Kim HW, Knowles JC. Hydroxyapatite, fluor-hydroxyapatite and fluorapatite produced via the sol-gel method. Optimisation, characterisation and rheology. *Dental Materials* 2013;29:166-173
227. **Troyer** D. Cell-Based Targeting of Anti-Cancer Nanotherapy to Tumors. *J Cancer Sci Ther* 2013;5(4):142-3
228. **Tucker** JD, Preston RJ. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research* 1996; 365:147-159
229. **Tziafas** D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Journal of Dentistry* 2000;28:77-92
230. **Tziafas** D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitrou S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short term capping experiments. *Int Endod J* 2002;35:245-54
231. **Urios** A, Blanco M. Specificity of spontaneous and t-butyl hydroperoxide-induced mutations in Δ oxyR strains of *Escherichia coli* differing with respect to the SOS mutagenesis proficiency and to the MutY and MutM functions. *Mutat Res.* 1996; 354: 95-101.
232. **Uskoković** V, Uskoković DP. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2011;96B:152-191
233. **Valey** JW, Simonian PT, Conrad EU. Carcinogenicity and metallic implants. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 1995;24:319-24
234. **Verstraete** FJM, Osofsky A. Dentistry in Pet Rabbits. *Compendium Vet* 2005; 671-683
235. **Vosoughhosseini** S, Lotfi M, Shabi S, Baloo H, Mesgariabbasi M, Saghiri MA, Zand V, Rahimi S, Ranjkesh B. Influence of White versus Gray Mineral Trioxide Aggregate on Inflammatory Cells. *JOE* 2008;34(6):715-17
236. **Wahl** DA, Czernuszka JT. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur Cell Mater.* 2006; 11:43-56.
237. **Willians** DF. Definitions in biomaterials: progress in biomedical engineering. Elsevier Science publishers Amsterdam Oxford New York Tokyo, 1987

238. **Witherspoon** DE, Small JC, Harris GZ. Mineral trioxide aggregate pulpotomies. A case series outcomes assessment. JADA 2006;137:610-18
239. **Yaltrik** M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. J Endod 2004;30:95-9
240. **Yang** IS, Lee DS, Park JT, Kim HJ, Son HH, Park JC. Tertiary Dentin Formation after Direkt Pulp Capping with Odonogenic Ameloblast-associated Protein in Rat Teeth. J Endod 2010;36(12):1956-62
241. **Yavari** HR, Shahi S, Rahimi S, Shakouie S, Roshangar L, Abbasi MM, Khavas SS. Connective tissue reaction to white and gray MTA mixed with distilled water or chlorhexidine in rats. Int Endod J 2009; 4(1):25-30
242. **Yilmaz** HG, Kalender A, Cengiz E. Use of Mineral Trioxide Aggregate in the Treatment of Invasive Cervical Resorption:A Case Report. J Endod 2010;36(1):160-3
243. **Zarrabi** MH, Javid M, Jafarian AH, Joushan B. Histologic Assessment of Human Pulp Response to Capping with Mineral Trioxide Aggregate and a Novel Endodontic Cement. J Endod 2010;36:1778-1781
244. **Zeferino** EG, Bueno CES, Oyama LM, Ribeiro DA. *Ex vivo* assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. Int Endod J 2010;43:843-848.
245. **Zhang** S, Yang X, Fan M. Bioaggregate and iRoot BP Plus optimize the proliferation and mineralization ability of human dental pulp cells. Int Endod J 2013;46:923-929.
246. **Zhang** W, Li Z, Peng B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. Int Endod J. 2010; 43:769-74.
247. **Zhou** N, Ni J, He R. Advances of Upconversion Nanoparticles for Molecular Imaging. Nano Biomed.Eng. 2013;5(3):131-9
248. **Warheit** DB, Webb TR, Colvin VL, Reed KL, Sayes CM. Pulmonary Bioassay Studies with Nanoscale and Fine-Quartz Particles in Rats: Toxicity is Not Dependent upon Particle Size but on Surface Characteristics. Toxicological Sciences 2007;95(1):270-80

249. **Warheit** DB. How Meaningful are the Results of Nanotoxicity Studies in the Absence of Adequate Material Characterization? *Toxicological Sciences* 2008;101(2):183-185
250. **White** JM, Goodis H. In Vitro Evaluation of a Hydroxyapatite Root Canal System Filling Material. *J Endod* 1991;17(11):561-6
251. **Witherspoon** DE. Vital Pulp Therapy with New Materials: New Directions and Treatment Perspectives-Permanent Teeth. *J Endod* 2008;34(7s):s25-s28
252. **Wu** C, Zhang Y, Wu X, Yang Y, Zhou X, Wu H. Biological Applications of Graphene and Graphene Oxide. *Nano Biomed.Eng.* 2012;4(4):157-162

9. BIOGRAFIJA

Dr Vanja Opačić Galić je rođena 28.06.1969. godine. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje je završila u Banjaluci. Stomatološki fakultet je upisala 1988. godine, a diplomirala sa prosečnom ocenom 9,05 1994. godine. Diplomski rad pod nazivom «Rendgenološka ocena ishoda terapije hroničnih apeksnih parodontitisa» kod mentora prof. dr Dragice Mijušković je odbranila 30. 5. 1994. godine sa ocenom 10 (deset).

Na Kliniku za bolesti zuba je primljena 1. 12. 1997. godine kao asistent pripravnik. Specijalistički ispit iz Bolesti zuba i endodoncije je položila 2002. godine sa ocenom *odličan*. Magistarsku tezu pod nazivom «Epidemiološko klinička ispitivanja radiksnih resorpcija» je odbranila 28.6.2003. godine. Mentor za izradu magistarske teze je bio prof. dr Slavoljub Živković.

Od 2004. godine je u zvanju asistenta, aktivno uključena u procese nastave na svim predmetima, kao i u zdravstvene i naučne aktivnosti Klinike za bolesti zuba.

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

Do sada je na domaćim i međunarodnim kongresima saopštila 17 radova i imala 3 predavanja po pozivu. U domaćim časopisima je objavila 6 radova, a dva u međunarodnim časopisima. Tri rada su sa SCI liste.

Objavila je dva rada koja se bave tematikom neposredno vezanom za temu doktorske disertacije.

Rad pod nazivom «New nanostruktural biomaterials based on active silicate systems and hydroxyapatite: characterization and genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes.» gde je prvi autor, je objavljen u International Endodontic Journal 2013. godine (M21).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а VANJA OPAČIĆ-GALIĆ

број индекса 186

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

«ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA
NA BAZI AKTIVNIH KALCIJUM SILIKATNIH SISTEMA I HIDROKSIAPATITA»

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

Потпис докторанда

У Београду, 22. 4. 2014.

Vanja Opačić Galić

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора VANJA OPAČIĆ-GALIĆ

Број индекса 186

Студијски програм _____

Наслов рада «ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI AKTIVNIH KALCIJUM SILIKATNIH SISTEMA I HIDROKSIAPATITA»

Ментор Prof. dr Slavoljub Živković

Потписани/а Vanja Opačić - Galić

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 22. 4. 2014.

Vanja Opačić Galić

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

«ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI NANOSTRUKTURNIH BIOMATERIJALA NA BAZI AKTIVNIH KALCIJUM SILIKATNIH SISTEMA I HIDROKSIAPATITA»

Dr Vanje Opačić-Galić

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 22. 4. 2014.

Vanja Opačić-Galić