

Sveučilište u Zagrebu
Stomatološki fakultet

Lucija Pavlović

***IN VITRO* ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI EKSPERIMENTALNIH
KALCIJ-SILIKATNIH CEMENATA**

Zagreb, 2025.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju na Institutu Ruđera Boškovića i Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Anje Baraba i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2024./2025.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-IP-2022-10-6065.

KRATICE

MM MTA - engl. mineral oxide aggregate, hrv. mineralni trioksidni agregat

BMP - engl. bone morphogenic protein, hrv-koštani morfogenetski proteini

MTT - engl. 3-(4,5-di methyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, hrv. 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5difeniltetrazolium bromid

DMSO - engl. dimethyl sulfoxide, hrv. dimetil sulfoksid

ATCC - engl. American Type Culture Collection, hrv. Američka zbirka kultura stanica

DMEM - engl. Dulbecco's modified Eagle's medium, hrv. Dulbecco modificirani Eagle medij

SGF - engl. short glass fibers, hrv. kratka staklena vlakna

FBS - engl. fetal bovine serum, hrv. fetalni goveđi serum

CAL27 - engl. human tongue squamous carcinoma cell, hrv. humane stanice karcinoma jezika

PS - engl. penicillin-streptomycin, hrv. penicilin-streptomycin

FCS - engl. fetal calf serum, hrv. fetalni teleći serum

PBS - engl. phosphate-buffered saline, hrv. fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom

SADRŽAJ RADA:

1.	UVOD	1
2.	HIPOTEZA	4
3.	MATERIJALI I METODE RADA	5
3.1.	Priprema uzoraka i radnih otopina	9
3.2.	Uzgoj stanica.....	11
3.3.	Nasađivanje stanica i tretiranje stanica materijalima	13
3.4.	MTT test.....	16
3.5.	Statistička analiza.....	19
4.	REZULTATI.....	20
5.	RASPRAVA	26
6.	ZAKLJUČCI.....	30
7.	ZAHVALE.....	31
8.	LITERATURA.....	32
9.	SAŽETAK	37
10.	SUMMARY	38
11.	ŽIVOTOPIS	39

1. UVOD

Mineralni trioksidni agregat (engl. mineral oxide aggregate, MTA) jedan je od najčešće primjenjivanih kalcij-silikatnih materijala u suvremenoj dentalnoj medicini zahvaljujući svojim izvanrednim svojstvima. Originalna formulacija materijala bila je Portland cement i bizmutov oksid, koji je materijalu osiguravao radiokontrastnost, međutim, današnji sastav primarno čine čestice trikalcij-silikata, dikalcij-silikata i aluminijevog silikata, uz dodatak radioopakera (1). Primjena MTA materijala je indicirana za direktno prekrivanje pulpe, zatvaranje perforacija korijena, a budući da MTA osigurava dobro brtvljenje, koristi se i za ortogradno te retrogradno punjenje korijenskih kanala (2).

Jedna od ključnih karakteristika MTA-a je njegova bioaktivnost koja ovisi o sposobnosti hidrolize i proizvodnje kalcijevog hidroksida, koji je odgovoran za stvaranje sloja apatita (3). Nakon kontakta s vodom, produkt hidratacije, kalcijev hidroksid, disocira na kalcijeve i hidroksilne ione (4). Kalcijevi ioni mogu potaknuti diferencijaciju osteoblasta i stanica pulpe omogućujući mineralizaciju tvrdog tkiva te modulirati koštane sijaloproteine i morfogenetske proteine (engl. bone morphogenic protein, BMP), kao i pojačati aktivnost pirofosfataze, koja pomaže u promicanju mineralizacije i stvaranju dentinskog mosta (5). Alkalni pH, koji nastaje oslobađanjem hidroksilnih iona, također može stimulirati alkalnu fosfatazu i oslobađanje BMP-2, što također igra ulogu u procesu mineralizacije (4, 5). Visoka pH vrijednost (12.5) također stvara izrazito alkalno okruženje pogodno za antimikrobno djelovanje, što dodatno doprinosi njegovoj učinkovitosti u endodontskoj terapiji, osobito u uvjetima visoke vlage korijenskih kanala (6).

Počeci kliničke primjene ovog materijala bili su vezani za ručno miješanje dviju komponenti cementa, praška i tekućine (7). Takav način pripreme materijala značio je i veći rizik za neuspjeh zahvata obzirom na ovisnost o ljudskom čimbeniku. Pojavom MM MTA (Micro-Mega, Besacon, Francuska) kao kapsuliranog oblika MTA, uvelike se olakšala manipulacija materijalom, preciznost aplikacije, ali se time osigurao optimalan i preporučeni omjer praha i tekućine prilikom miješanja. Također, dodatak kalcijevog karbonata u sastav MM MTA ubrzao je vrijeme stvrdnjavanja i time unaprijedilo i olakšalo kliničku uporabu materijala (8).

Unatoč brojnim prednostima MTA, često se u literaturi kao potencijalni nedostaci navode dugo vrijeme stvrdnjavanja, otežano rukovanje materijalom i diskoloracija tvrdih zubnih tkiva (9, 10). Modificiranje sastava MTA dovelo je do poboljšanja kemijskih, mehaničkih i bioloških svojstva, rješavanja problema diskoloracije i skraćenog vremena stvrdnjavanja (7).

Modifikacije materijala uključuju promjene njegovog sastava, bilo da je riječ o promjenama omjera gradivnih elemenata materijala, odnosno praha i tekućine, ili dodavanja različitih organskih i anorganskih čestica. Cilj svake modifikacije je dobiti bolju verziju postojećeg materijala kako bi se olakšalo rukovanje materijalom i poboljšala svojstva materijala, a time i uspješnost terapije (7).

Tako je dodavanje cink oksida u strukturu MTA rezultiralo eliminacijom problema diskoloracije, a da pritom nije kompromitiralo mikrotvrdoću materijala (11). Eskandarinezhad i sur. (12) su utvrdili da dodavanje cink oksida i hidroksiapatitnih nanočestica u strukturu bijelog MTA nije dovelo do smanjenja tlačne čvrstoće, jednog od najvažnijih svojstava dentalnih materijala (12). Time je dodatno potvrđena sigurnost budućih modifikacija ovog materijala nanočesticama s obzirom na prednosti dodavanje čestica hidroksipapatita u sastav materijala (12). Pokazalo se da dodavanje galne kiseline u strukturu MTA dovodi do značajnog smanjenja vremena stvrdnjavanja (13). Dodavanje staklenih vlakana otpornih na alkalne uvjete povećalo je otpornost na frakture, kako kod MTA, tako i kod Biodentina (14). Modiciranje MTA dodatkom kofeinske kiseline dovelo je do poboljšanje adhezije i proliferacije fibroblasta unutar zubne pulpe te do pojačane angiogeneze i osteogeneze (15). Dodatak PBS-a (engl. phosphate-buffered saline, hrv. fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom) u strukturu MTA rezultiralo je povećanjem otpornosti korijena zuba na frakture (16). Određene modifikacije su pomogle u rješavanju nedostataka samog materijala, a nekima se postiže poboljšanje već postojećih osobina materijala pa je tako dodatak 5% kalcij fluorida povećao uspješnost regeneracije pulpe bez negativnih posljedica na topljivost materijala ili njegovo vrijeme stvrdnjavanja (17).

Modifikacija MM MTA dodatkom 5% i 10% kratkih staklenih vlakana je pokazala poboljšanje mikrotvrdoće i tlačne čvrstoće MM MTA (18). Poboljšanje navedenih mehaničkih svojstava pozitivno utječe na trajnost samog materijala, ali i uspješnost zahvata uzevši u obzir da je MTA izložen mastikatornim silama (18).

Međutim, ako se modifikacijom MTA materijala dobiju bolja mehanička svojstva materijala, važno je da biološka svojstva novoformiranog materijala nisu lošija kako bi se izbjegao potencijalan štetan utjecaj na vitalna tkiva s kojima materijal dolazi u kontakt, poput pulpe ili periapikalnih tkiva.

Biološka svojstva materijala odnose se na način na koji materijali ostvaruju interakciju s ljudskim tkivima (19). Biokompatibilni materijali su oni materijali koji u međudjelovanju s

ljudskim tijelom ostvaruju prikladan biološki odgovor (20). Naime, interakcija svakog materijala može rezultirati reakcijom preosjetljivosti, citotoksičnom reakcijom ili pak genotoksičnom reakcijom organizma na uneseni materijal. Kako bi se potvrdila biokompatibilnost materijala u dentalnoj medicini, potrebno je provesti biološka ispitivanja u kulturi stanica (*in vitro*) ili na životinjama (*in vivo*) (21).

Prema dostupnoj literaturi, ne postoje istraživanja o citotoksičnom učinku MM MTA modificiranog dodatkom 5% i 10% kratkih staklenih vlakana.

Svrha ovog istraživanja bila je ispitati *in vitro* citotoksičnost komercijalno dostupnog MM MTA, kao i njegovih modifikacija s dodatkom 5% i 10% kratkih staklenih vlakana i samih kratkih staklenih vlakana na stanicama karcinoma jezika i fibroblastima.

2. HIPOTEZA

Nulta hipoteza ovog rada je da ne postoji razlika u citotoksičnosti između komercijalno dostupnog MM MTA, njegovih modifikacija s dodatkom 5% i 10% kratkih staklenih vlakana te samih kratkih staklenih vlakana.

3. MATERIJALI I METODE RADA

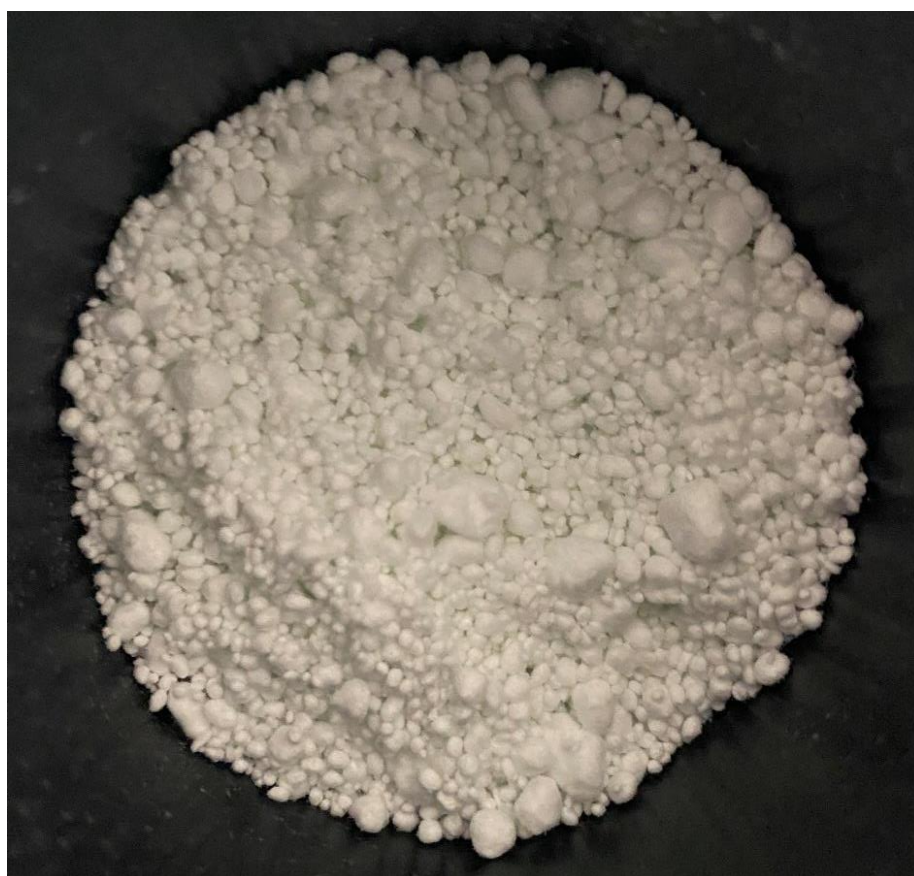
Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Stomatološkog fakulteta u Zagrebu (KLASA: 003-01/25-05/07, URBROJ: 251-60-4/119-11, datum, 3. srpnja 2025.). U istraživanju je ispitana citotoksičnost tri kapsulirana materijala: 1) komercijalno dostupan MM MTA (Micro-Mega, Besacon, Francuska), (Tablica 1 i Slika 1); 2) MM MTA s dodatkom 5% kratkih staklenih vlakana (engl. short glass fibers, SGF); 3) MM MTA s dodatkom 10% SGF te vlakana koja su dodana u MM MTA: 4) SGF, 10% (0,03 g), (Slika 2). Za modificirane materijale, MTA prah bio je uklonjen iz kapsule za 5% i 10% mase, a dodalo se 5% ili 10% SGF dužine 140 µm i promjera 6 µm (Central Glass Co., Tokio, Japan) (Slike 3-5). Uzorci MM MTA te modifikacije MM MTA s dodacima 5% i 10% SGF bili su zamiješani po uputama proizvođača.

Tablica 1. Vrsta, proizvođač i sastav kapsuliranog MM MTA

MATERIJAL	VRSTA MATERIJALA	PROIZVOĐAČ	SASTAV
MM MTA	Kalcij-silikatni cement	Micro-Mega (Besançon, Francuska)	Prah: trikalcijev silikat, dikalcijev silikat, trikalcijev aluminat, kalcijev karbonat, kalcijev sulfat i bizmutov oksid Tekućina: destilirana voda



Slika 1. MM MTA



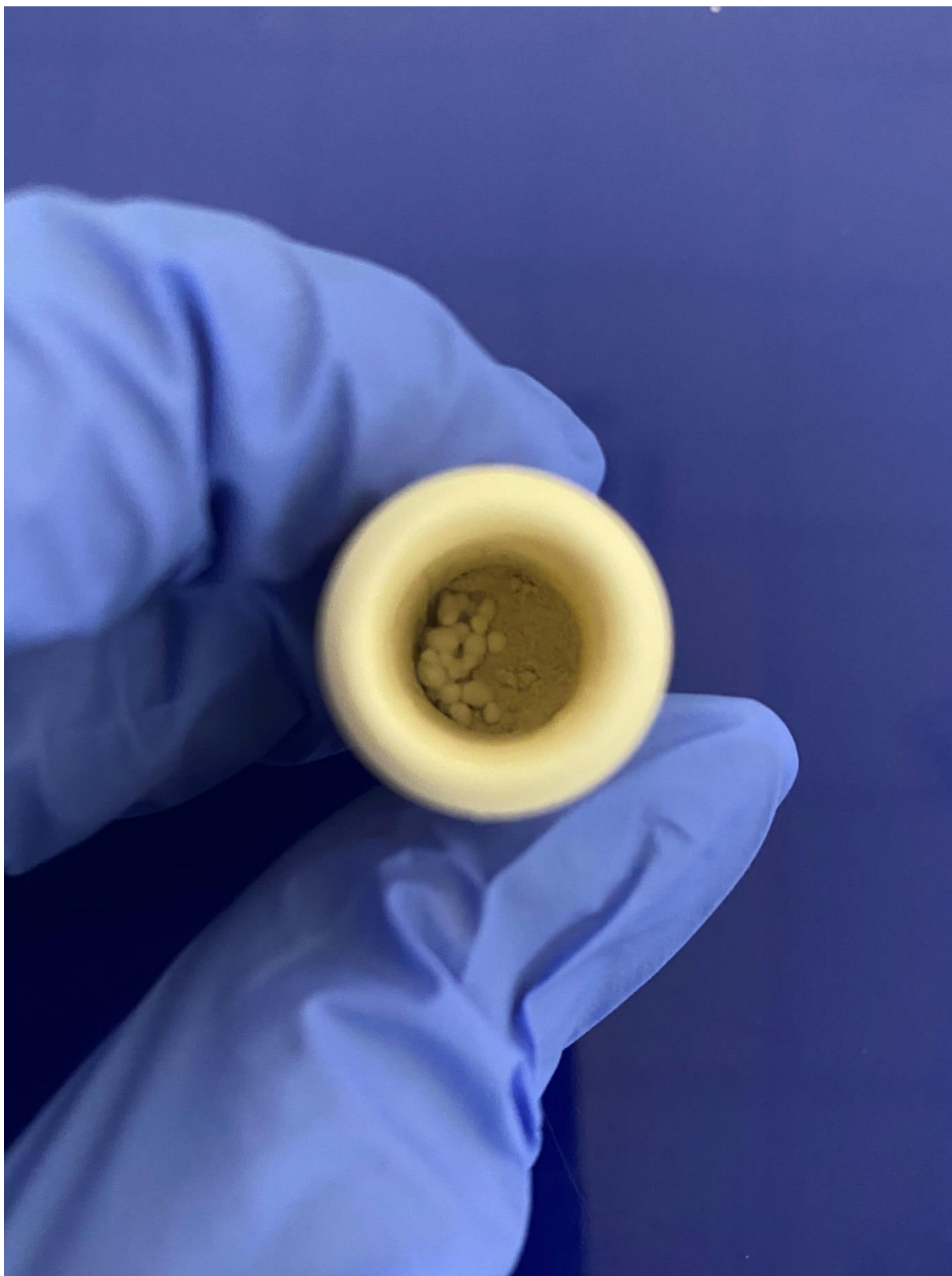
Slika 2. Staklena vlakna



Slika 3. Otvorena kapsula MM MTA



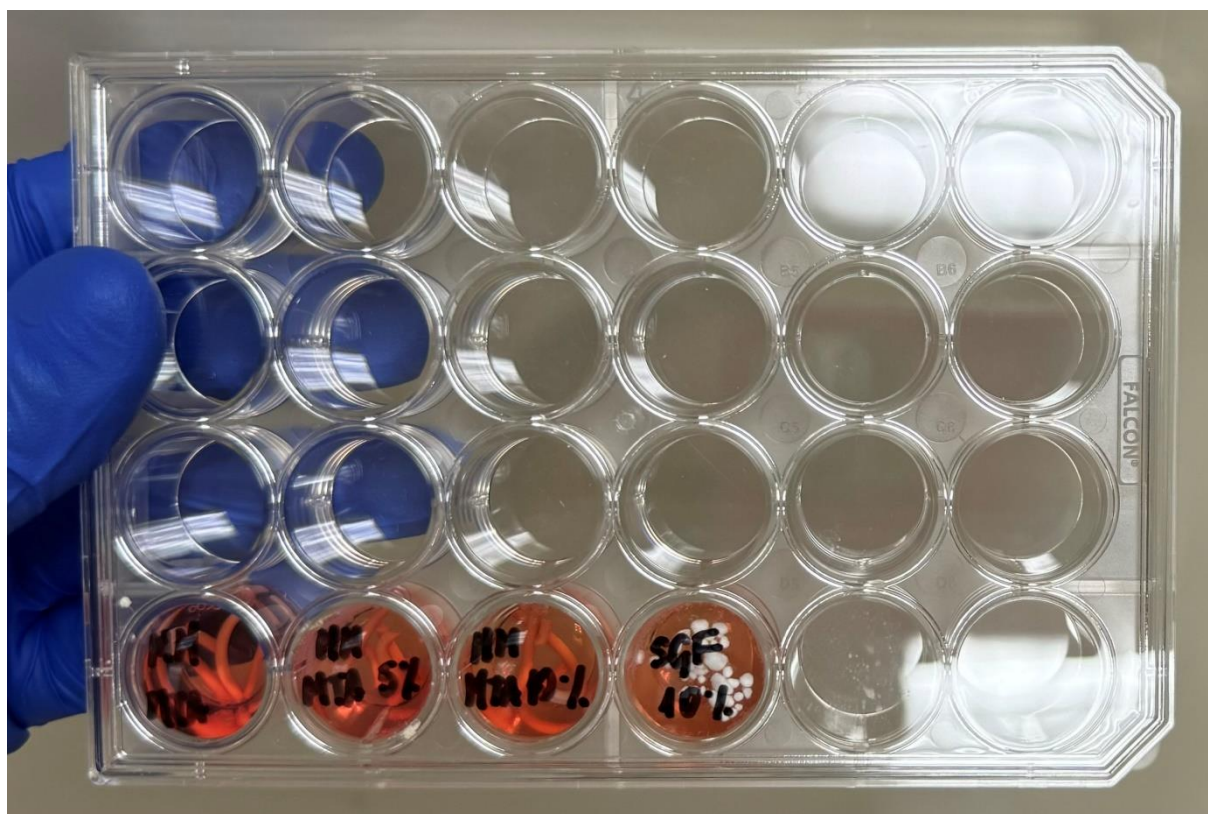
Slika 4. Mjerenje 0,03 g (10%) staklenih vlakana na preciznoj vagi



Slika 5. Dodavanje odvaganih kratkih staklenih vlakana u kapsulu MM MTA

3.1. Priprema uzoraka i radnih otopina

Uzorci konvencionalnog MM MTA te modifikacije MM MTA s dodacima 5% i 10% SGF zamiješani su prema uputama proizvođača. Uzorci su pomoću aplikatora postavljeni u bunariće pločice s 24 bunarića te su prekriveni s 2 mL hranjivog medija DMEM (engl. Dulbecco's modified Eagle's medium, hrv. Dulbecco modificirani Eagle medij, Sigma Aldrich, SAD) s 10% fetalnog goveđeg seruma (engl. fetal bovine serum, FBS, Sigma Aldrich, SAD), (Slika 7) nakon čega su pohranjeni u inkubator (Heracell 150, Thermo Fisher Scientific, Seoul, Koreja) pri temperaturi od 37°C tijekom 24 h (Slika 8). S obzirom na netopivost uzoraka u mediju te njihovo spontano trganje u manje komade, medij je filtriran filtrom s porama od 0,2 µm (SPE Polyethersulfone syringe filters, CHMlab, Terassa, Barcelona, Španjolska), (Slika 9) kako bi se osigurala čistoća i sterilnost filtrata.



Slika 7. Pripremljeni uzorci svih ispitivanih skupina prekriveni medijem



Slika 8. Inkubator



Slika 9. Filter s porama od 0,2 μm za filtriranje uzoraka

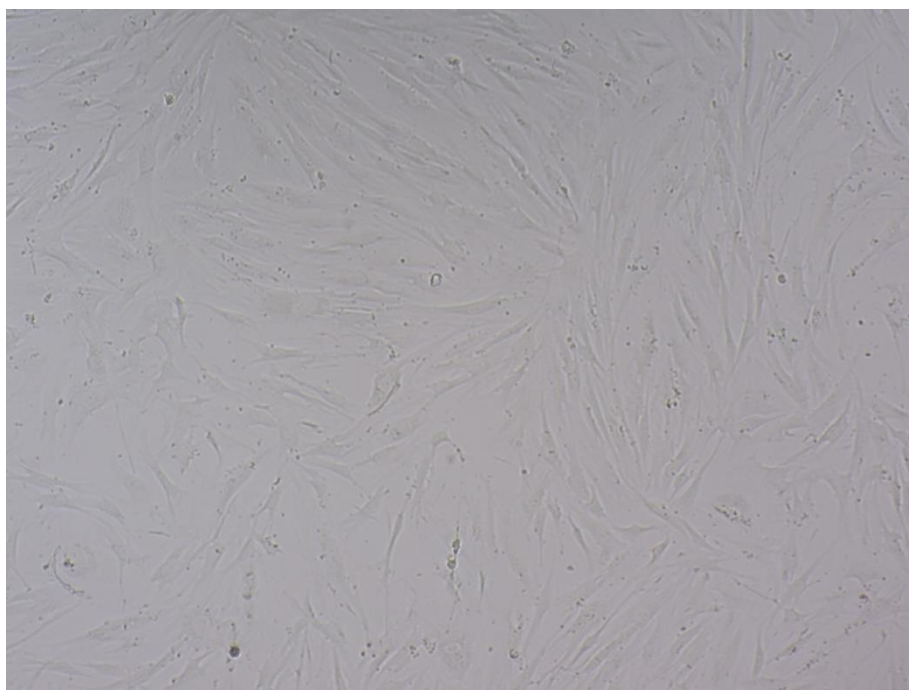
3.2. Uzgoj stanica

U radu su korištene dvije linije stanica, ljudske tumorske stanice raka jezika CAL27 (engl. human tongue squamous carcinoma cell) iz banke stanica i tkiva American Type Culture Collection (ATCC, hrv. Američka zbirka kultura stanica, Rockville, SAD), (Slika 10) i fibroblasti (Slika 11), model normalne humane linije stanica, izolirani iz zdravog donora. Sve stanice su uzgojene u inkubatoru pri 37°C, u mješavini zraka s 5% CO₂. Za uzgoj stanica, korišten je hranjivi medij DMEM obogaćen s 10% fetalnog telećeg seruma (engl. fetal calf serum, FCS) uz dodatak antibiotika, penicilin-streptomycin (engl. penicillin-streptomycin, PS) (Slika 12). Stanice su rasađivane dva puta tjedno kako bi se osigurao njihov optimalan rast.

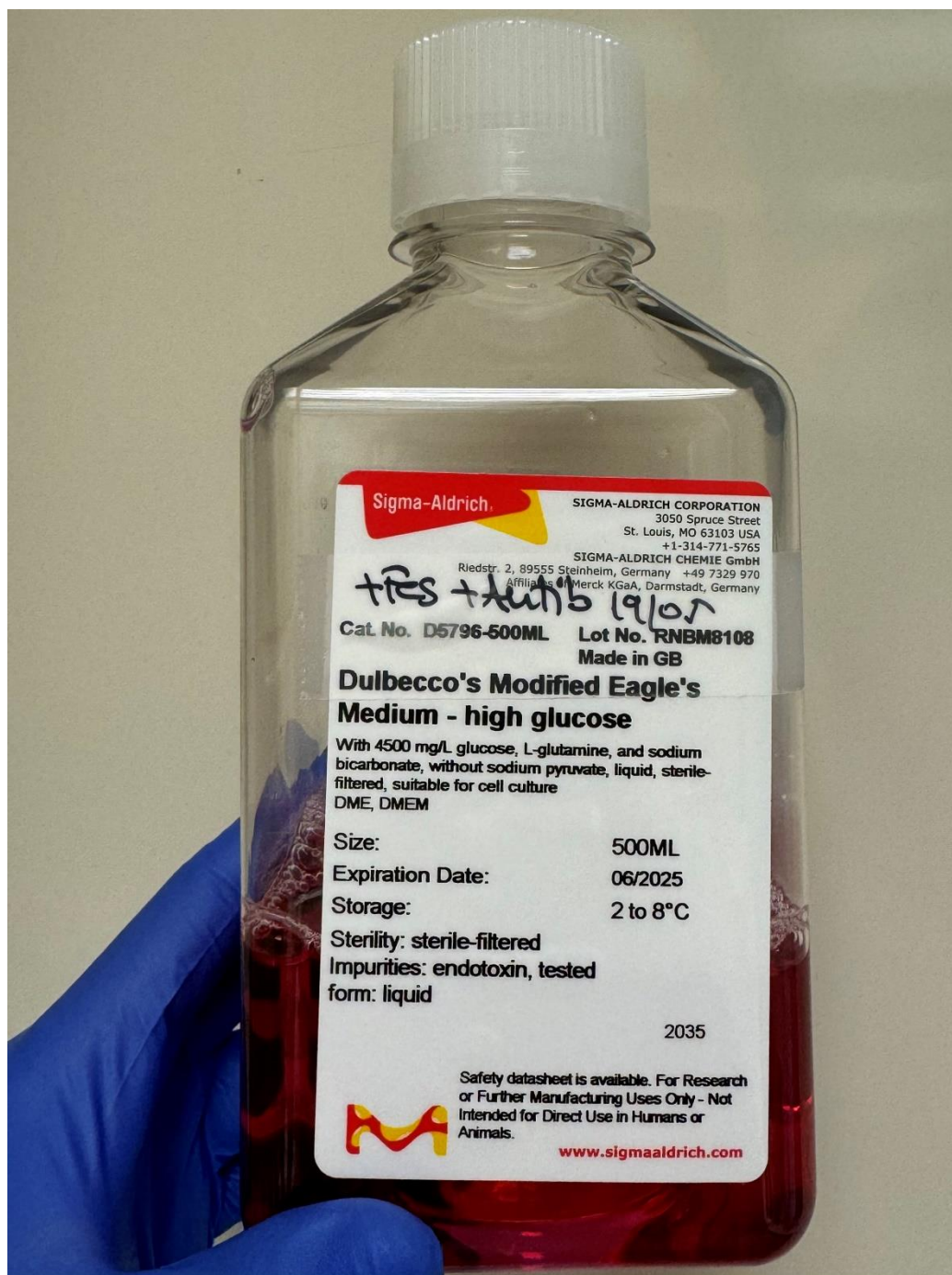
Postupak rasađivanja stanica podrazumijevao je uklanjanje hranjivog medija DMEM-a u kojem su stanice prethodno rasle. Nakon uklanjanja medija slijedila je tripsinizacija stanica dodatkom proteolitičkog enzima tripsina nakon čega je provedena inkubacija u inkubatoru 3-5 minuta pri temperaturi od 37°C i vlažnoj atmosferi s 5% CO₂, prilikom čega je došlo do odvajanja adherentnih stanica jednih od drugih, ali i od same podloge. Naposljetku, stanice su se resuspendirale u svježem hranjivom mediju čime se ostvarila inaktivacija tripsina. Dio stanične suspenzije bio je odvojen i korišten za provođenje eksperimenata, a ostatak je bio vraćen u inkubator u svrhu održavanja stanica u kulturi.



Slika 10. Kultura stanica CAL27



Slika 11. Fibroblasti, mikroskopsko povećanje od 10×/0,25 NA

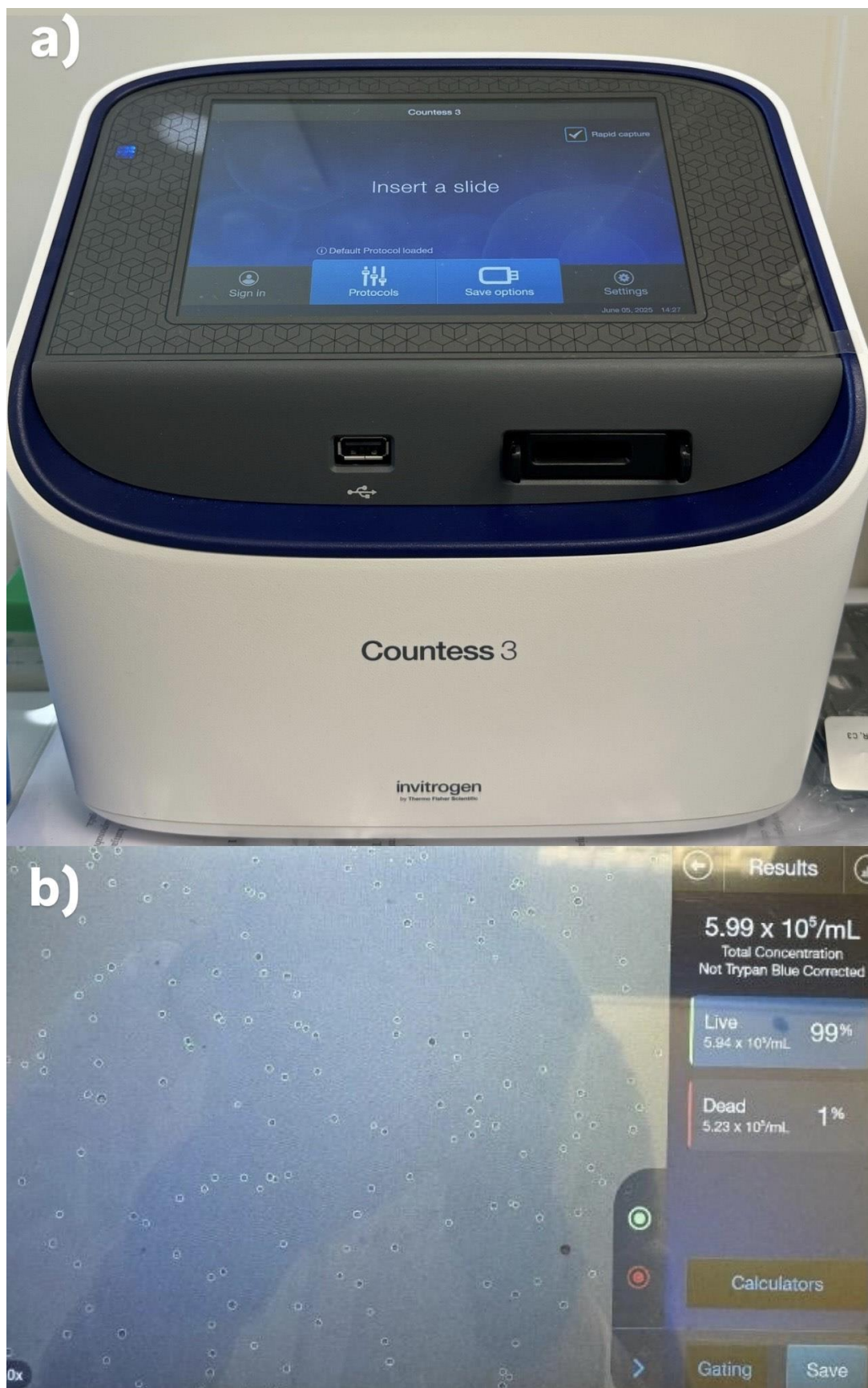


Slika 12. Hranjivi medij DMEM s 10% fetalnog goveđeg seruma uz dodatak antibiotika

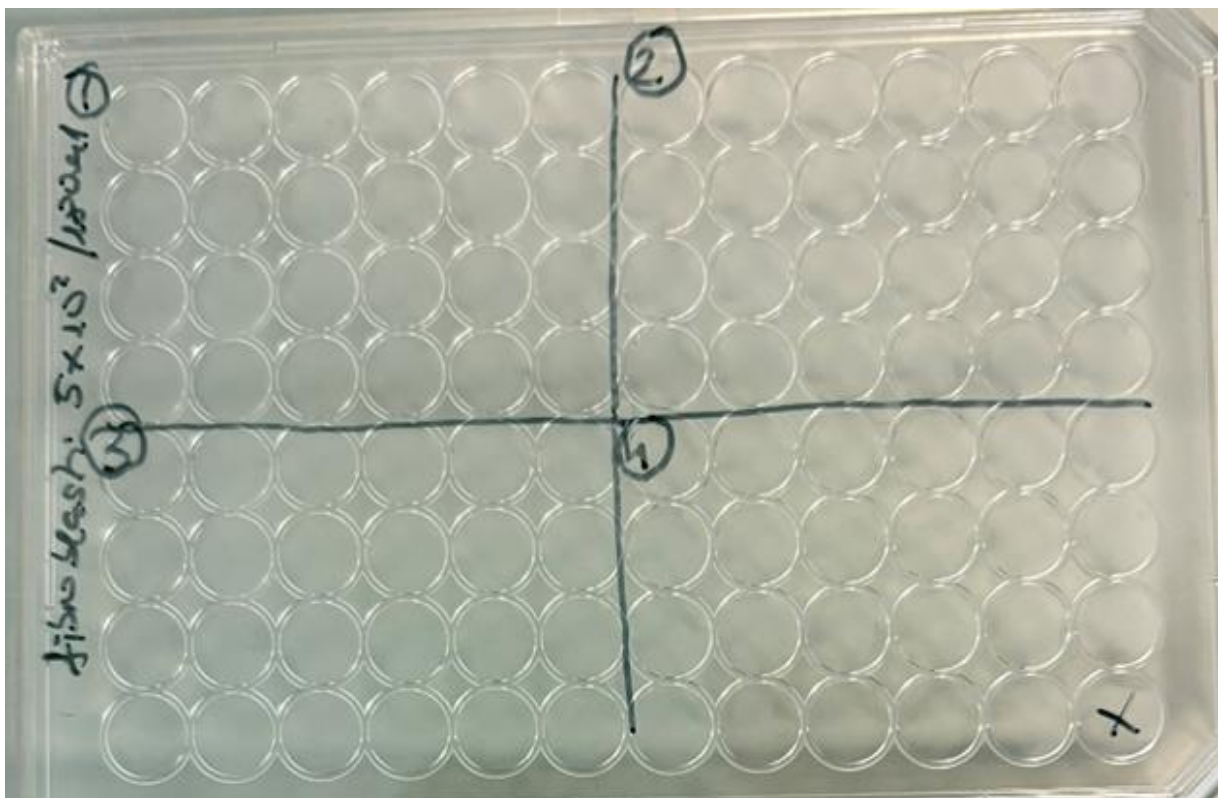
3.3. Nasađivanje stanica i tretiranje stanica materijalima

Rad sa staničnim kulturama proveden je u sterilnim uvjetima. Broj stanica u suspenziji stanica izmjeren je korištenjem brojača stanica (Countess 3, Automated Cell Counter, Life Technologies Corporation, Washington, USA), (Slika 13 a i b). Obje vrste stanica bile su nasađene u koncentraciji od 5×10^3 stanica u 180 μL medija po jednom bunariću pločice s ukupno 96 bunarića. Zbog pojednostavljenja, mikrotitarska pločica je podijeljena u četiri dijela

koja su označena oznakama od 1-4 (Slika 14). Oznaka 1 predstavljala je bunariće u kojima su stanice bile tretirane konvencionalnim MM MTA u dvostrukim razrjeđenjima, oznaka 2 predstavljala je bunariće u kojima su stanice bile tretirane MM MTA s dodatkom 5% SGF u dvostrukim razrjeđenjima, oznaka 3 je predstavljala bunariće u kojima su stanice bile tretirane MM MTA s dodatkom 10% SGF u dvostrukim razrjeđenjima, a oznaka 4 su bunarići u kojima su stanice bile tretirane SGF u dvostrukim razrjeđenjima (Slika 14). Unutar svakog označenog odjeljka, prvi vertikalni red bunarića predstavljao je stanice izložene čistom mediju koji je služio kao kontrola, drugi red stanica bio je izložen uzorku materijala u 100% koncentraciji, a svaki sljedeći vertikalni red bila je početna koncentracija uzorka u dvostrukom razrjeđenju što nas dovodi do toga da smo sva četiri materijala ispitivali u ukupno 5 koncentracija, odnosno 4 razrjeđenja.



Slika 13. a) Uređaj za mjerenje koncentracije stanica; b) Brojčana vrijednost stanica koju je uređaj izmjerio u suspenziji stanica



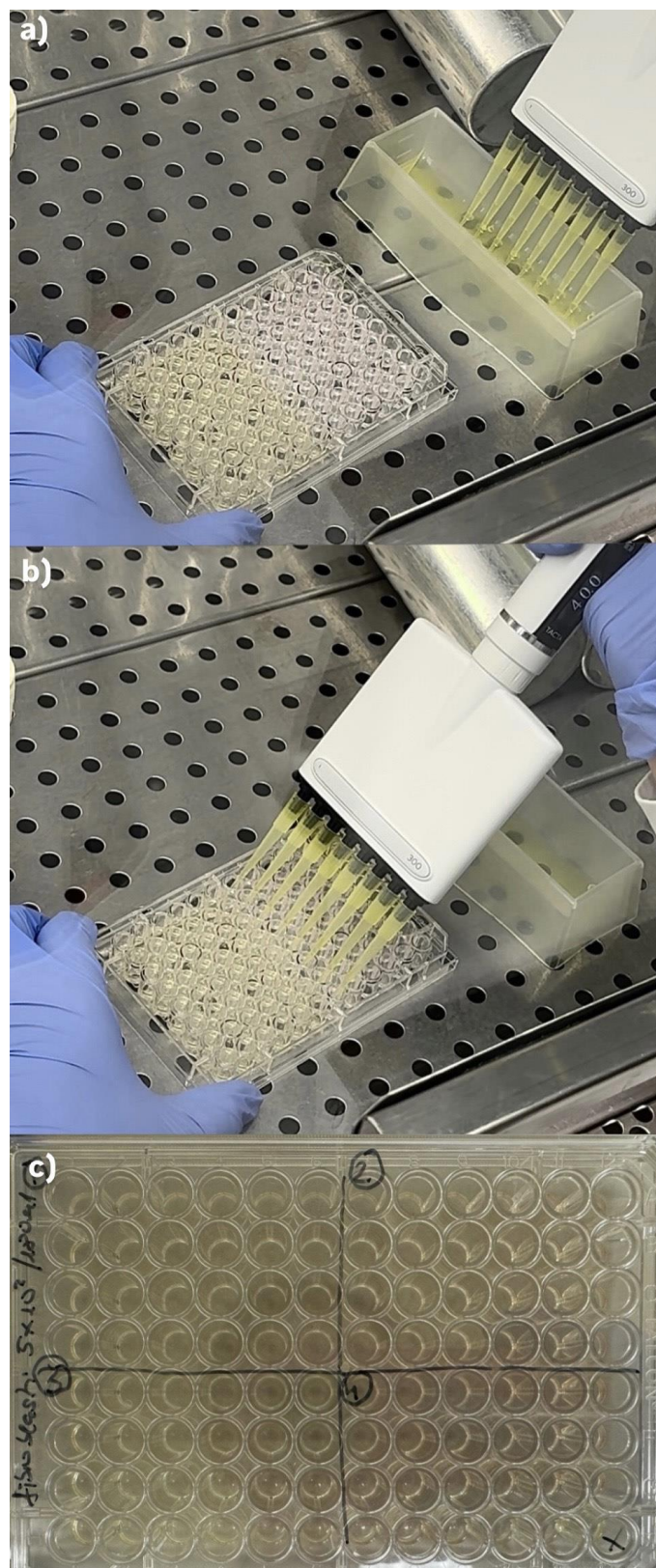
Slika 14. Mikrotitarska pločica podijeljena oznakama od 1-4 u četiri odjeljka za četiri različita materijala

3.4. MTT test

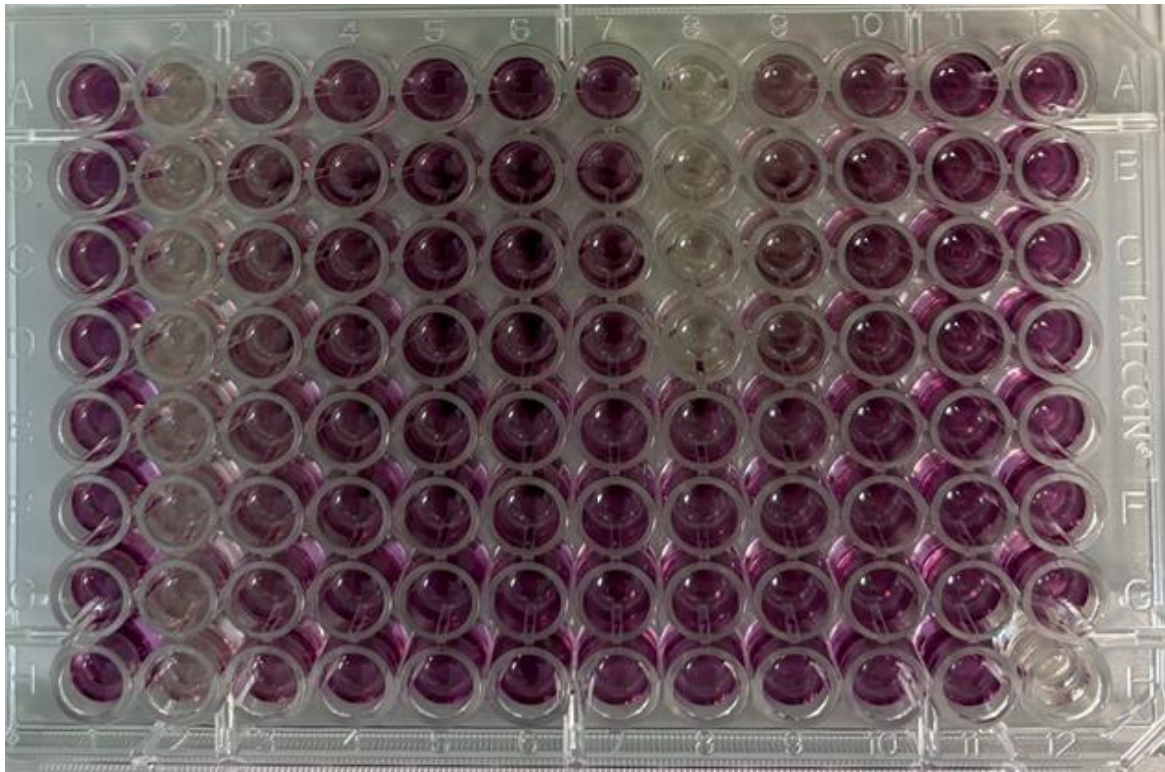
U svrhu određivanja djelovanja materijala na preživljenje stanice, korišten je 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (engl. 3-(4,5-di methyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) test koji je široko primjenjivan kolorimetrijski test za mjerenje metabolizma stanice temeljen na sposobnosti mitohondrijskih enzima, konkretno mitohondrijske reduktaze, da reducira žutu tetrazolijevu sol u ljubičaste kristale formazana.

Stanice karcinoma jezika i fibroblasti su se nakon inkubacije u tripsinu i resuspendiranja u hranjivom mediju DMEM nasadili u bunariće mikrotitarske pločice s 96 bunarića (5×10^3 stanica u 180 μL medija DMEM po bunariću). Stanice su nakon 24 sata tretirane uzorcima prethodno pripremljenih materijala u različitim koncentracija. Učinak svake koncentracije materijala ispitivan je u kvadriplikatu. Nakon 72 h inkubacije stanica s uzorcima materijala, medij je uklonjen iz bunarića, a dodano je 40 μL 0.5 mg/mL otopine MTT (Slika 15 a-c). Stanice su inkubirane 3 h pri 37°C, a potom su otopljene u volumenu od 170 μL dimetil sulfoksida (engl. dimethyl sulfoxide, DMSO) po bunariću. Svrha tretiranja stanica dimetil sulfoksidom bila je u

otapanju ljubičastih kristala formazana nastalih redukcijom tetrazolijske soli. Vizualno, intenzitet ljubičastog obojenja dobivenog otapanjem formazana bio je proporcionalan vijabilnosti stanica (Slika 16). Kako bi se dobili numerički podaci o broju preživjelih stanica, apsorbancija boje izmjerena je pomoću spektrofotometra (Spark (Multimode Microplate Reader), Tecan, Männedorf, Švicarska) s čitačem za mikrotitarske pločice pri valnoj duljini od 600 nm.



Slika 15. a) Postupak provođenja MTT testa – pripremljena suspenzija MTT reagensa i medija; b) Postupak provođenja MTT testa – aplikacija pripremljene suspenzije pomoću pipete u bunariće nakon prethodno uklonjenog medija iz bunarića; c) Izgled bunarića nakon aplikacije pripremljene suspenzije



Slika 16. Vizualni prikaz intenziteta ljubičastog obojenja kao rezultata MTT testa

3.5. Statistička analiza

Statistička analiza provedena je metodom dvosmjerne analize varijance, odvojeno za dva tipa stanica. Kod statistički značajnih razlika, razlike između pojedinih skupina uspoređene su post hoc LSD testom. Sve analize izvršene su General Linear Model modulom programa SPSS (IBM, USA), v.20. Razina statističke značajnosti je bila postavljena na 5%.

4. REZULTATI

Za MM MTA, u kulturi CAL27, dokazana je statistički značajna razlika između koncentracija od 0.75 g/mL i 1.5 g/mL te kontrole ($p=0.001$ i $p<0.001$) što upućuje na to da su navedene koncentracije uzrokovale citotoksičnost (Tablica 2).

U kulturi CAL27 koje su bile izložene MM MTA+5% SGF, zabilježena je statistički značajna razlika između koncentracije od 1.5 g/mL i kontrole te ostalih koncentracija ($p<0.001$) čime je dokazano da je samo spomenuta najveća koncentracija uzrokovala citotoksičnost (Tablica 2).

U kulturi CAL27 koje su bile izložene MM MTA+10% SGF, nije zabilježena statistički značajna razlika u broju preživjelih stanica u kulturi što znači da nije uočena citotoksičnost u testiranim koncentracijama ($p>0.05$), (Tablica 2).

U kulturi CAL27 koje su bile izložene samim staklenim vlaknima, nije bilo statistički značajnih razlika u broju preživjelih stanica ovisno o koncentraciji materijala ($p>0.05$) što upućuje na zaključak da nije pronađena citotoksičnost u testiranim koncentracijama (Tablica 2).

Ako se izračuna linearna ovisnost koncentracije materijala i citotoksičnog učinka u kulturi CAL27, pronalazi se značajna linearnu povezanost kod skupina MM MTA i MM MTA+5% SGF (R^2 vrijednosti su 0.473 i 0.669), dok ista nije pronađena kod MM MTA+10% SGF i samih staklenih vlakana (R^2 0.075 i 0.084), (Slika 17).

U kulturi stanica fibroblasta koje su bile izložene MM MTA, postoji statistički značajna razlika između koncentracija od 0.035 g/mL, 0.75 g/mL i 1.5 g/mL te kontrole ($p=0.041$, $p=0.001$ i $p<0.001$), (Tablica 3). Sve tri koncentracije statistički se značajno razlikuju i od svih ostalih mjerenih koncentracija te je dokazan citotoksični učinak pri koncentracijama od 0.035 g/mL koji značajno raste s povećanjem koncentracije (Tablica 3). Kod koncentracije od 0.000875 g/mL, zabilježeno je statistički značajno veći broj živih stanica u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p<0.001$), (Tablica 3).

Za MM MTA+5% SGF, u kulturi fibroblasta, dokazana je statistički značajna razlika između koncentracija od 0.75 g/mL i 1.5 g/mL te kontrole ($p<0.001$) što upućuje na zaključak da je prisutan citotoksični učinak u koncentracijama od 0.75 g/mL i 1.5g/mL (Tablica 3). Za dvije manje koncentracije, 0.000875 g/mL i 0.00175 g/mL, zabilježen je statistički značajno veći broj živih stanica u usporedbi s kontrolom ($p<0.001$), (Tablica 3).

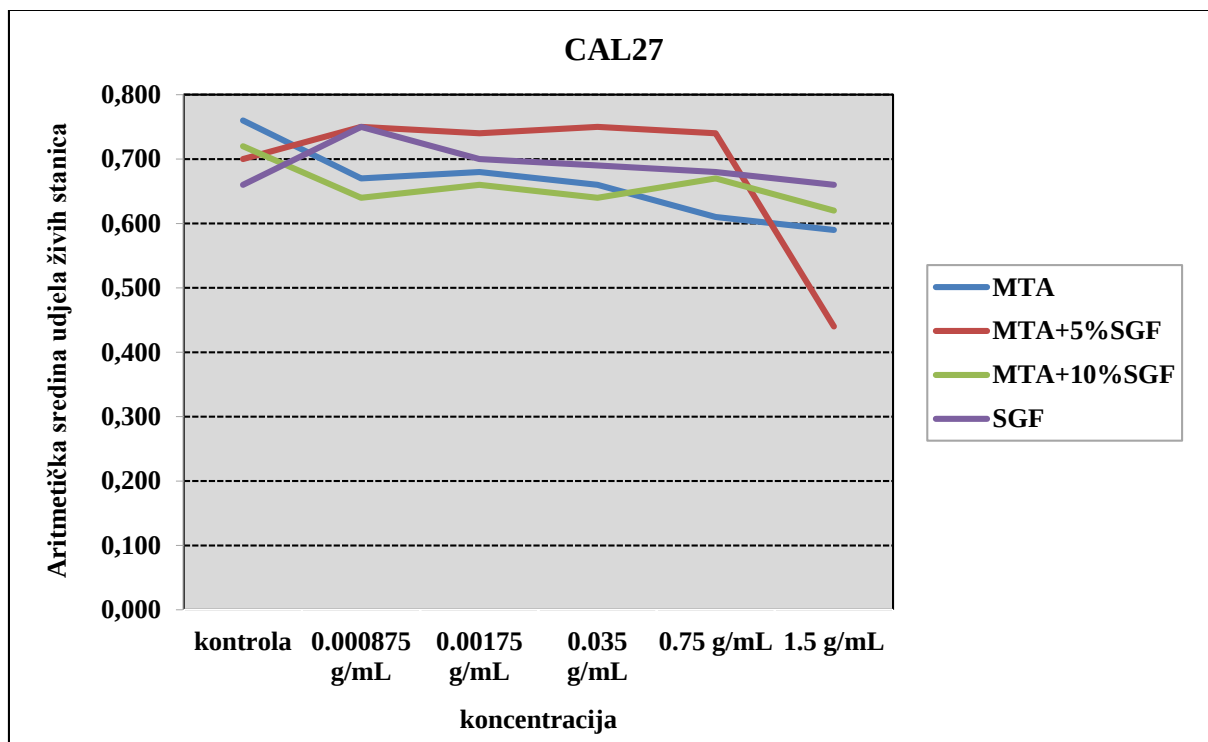
U kulturi stanica fibroblasta koje su bile izložene MM MTA+10% SGF, statistički je značajna razlika između kontrole i koncentracija od 0.75 g/mL i 1.5 g/mL ($p < 0.001$) što znači da su spomenute koncentracije uzrokovale citotoksičnost (Tablica 3). Kod koncentracije od 0.000875 g/mL, statistički je bilo značajno više živih stanica u usporedbi s kontrolom ($p < 0.001$), (Tablica 3).

U kulturi stanica fibroblasta koje su bile izložene samim staklenim vlaknima, nije bilo statistički značajnih razlika u broju preživjelih stanica ovisno o koncentraciji materijala ($p > 0.05$), što upućuje na zaključak da nije pronađena citotoksičnost u testiranim koncentracijama (Tablica 3).

Ako se izračuna linearna ovisnost koncentracije i citotoksičnog učinka u kulturi fibroblasta, pronalazi se značajna linearna povezanost kod svih materijala (R^2 vrijednosti su 0.929, 0.900, 0.932, 0.443 redom za MM MTA i MM MTA+5% SGF, MM MTA+10% SGF i SGF), što upućuje na jako veliku povezanost citotoksičnosti i koncentracije za MM MTA, MM MTA+5% SGF i MM MTA+10%, SGF jer se više od 90% razlika u citotoksičnosti može objasniti linearnim rastom koncentracije, a manja je povezanost koncentracije i citotoksičnosti za sama staklena vlakna, gdje je taj postotak samo 44% (Slika 18).

Tablica 2. Aritmetička sredina, standardna devijacija i interval pouzdanosti za sve skupine ispitanih kalcij-silikatnih materijala i staklenih vlakana na CAL27

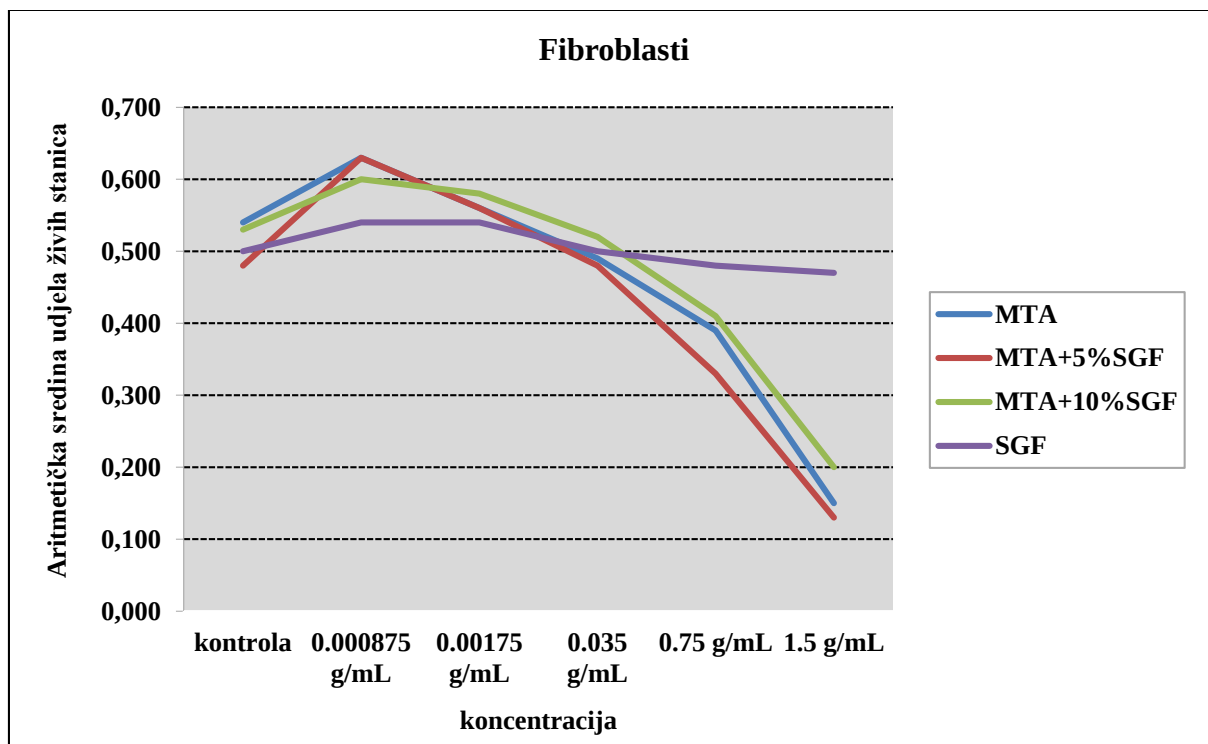
materijal	koncentracija	aritmetička sredina	standardna devijacija	95% interval pouzdanosti	
				donja granica	gornja granica
MM MTA	kontrola	0.757	0.024	0.709	0.805
	0.000875 g/mL	0.667	0.024	0.619	0.715
	0.00175 g/mL	0.678	0.024	0.630	0.726
	0.035 g/mL	0.663	0.024	0.615	0.711
	0.75 g/mL	0.613	0.024	0.565	0.661
	1.5 g/mL	0.585	0.024	0.537	0.633
MM MTA+5% SGF	kontrola	0.701	0.024	0.653	0.749
	0.000875 g/mL	0.748	0.024	0.700	0.796
	0.00175 g/mL	0.742	0.024	0.694	0.790
	0.035 g/mL	0.746	0.024	0.698	0.794
	0.75 g/mL	0.741	0.024	0.693	0.789
	1.5 g/mL	0.438	0.024	0.390	0.486
MM MTA+10% SGF	kontrola	0.720	0.024	0.672	0.768
	0.000875 g/mL	0.640	0.024	0.592	0.688
	0.00175 g/mL	0.655	0.024	0.607	0.703
	0.035 g/mL	0.643	0.024	0.595	0.691
	0.75 g/mL	0.669	0.024	0.621	0.717
	1.5 g/mL	0.619	0.029	0.560	0.678
10% SGF	kontrola	0.655	0.024	0.607	0.703
	0.000875 g/mL	0.752	0.024	0.704	0.800
	0.00175 g/mL	0.703	0.024	0.655	0.751
	0.035 g/mL	0.685	0.024	0.637	0.733
	0.75 g/mL	0.679	0.024	0.631	0.727
	1.5 g/mL	0.664	0.024	0.616	0.712



Slika 17. Grafički prikaz odnosa koncentracije i aritmetičke sredine udjela živih stanica u kulturi CAL27 za svaki ispitani materijal

Tablica 3. Aritmetička sredina, standardna devijacija i interval pouzdanosti za sve skupine ispitanih kalcij-silikatnih materijala i staklenih vlakana na fibroblastima

materijal	koncentracija	aritmetička sredina	standardna devijacija	95% interval pouzdanosti	
				donja granica	gornja granica
MM MTA	kontrola	0.542	0.011	0.519	0.565
	0.000875 g/mL	0.626	0.011	0.603	0.648
	0.00175 g/mL	0.563	0.011	0.540	0.586
	0.035 g/mL	0.492	0.011	0.469	0.515
	0.75 g/mL	0.387	0.011	0.364	0.409
	1.5 g/mL	0.153	0.011	0.130	0.176
MM MTA+5% SGF	kontrola	0.480	0.011	0.457	0.503
	0.000875 g/mL	0.625	0.011	0.602	0.648
	0.00175 g/mL	0.560	0.011	0.537	0.583
	0.035 g/mL	0.482	0.011	0.459	0.505
	0.75 g/mL	0.332	0.011	0.309	0.355
	1.5 g/mL	0.126	0.011	0.103	0.149
MM MTA+10% SGF	kontrola	0.531	0.011	0.508	0.554
	0.000875 g/mL	0.602	0.011	0.579	0.625
	0.00175 g/mL	0.578	0.011	0.555	0.601
	0.035 g/mL	0.519	0.011	0.496	0.541
	0.75 g/mL	0.413	0.011	0.390	0.436
	1.5 g/mL	0.197	0.011	0.174	0.220
10% SGF	kontrola	0.503	0.011	0.480	0.526
	0.000875 g/mL	0.536	0.013	0.509	0.562
	0.00175 g/mL	0.537	0.011	0.514	0.560
	0.035 g/mL	0.498	0.011	0.475	0.520
	0.75 g/mL	0.476	0.011	0.453	0.499
	1.5 g/mL	0.466	0.011	0.443	0.489



Slika 18. Grafički prikaz odnosa koncentracije i aritmetičke sredine udjela živih stanica u kulturi fibroblasta za svaki ispitani materijal

5. RASPRAVA

Suvremeni moderni pristup dentalnoj medicini čiji je imperativ na minimalno invazivnim zahvatima s ciljevima očuvanja tvrdih zubnih tkiva i očuvanja vitaliteta pulpe bio bi gotovo nemoguć bez uporabe materijala koji ostvaruju biološki učinak potičući aktivnost pulpo-dentinskog kompleksa i shodno tome, biološki odgovor (22). Biološki učinak MTA vidljiv je u njegovoj biokompatibilnosti koju ostvaruje sa stanicama zubne pulpe i parodontnog ligamenta, ovisno o indikaciji primjene materijala (23). Da bi se materijal smatrao biokompatibilnim, njegova interakcija s ljudskim stanicama i tkivima mora rezultirati izostankom lokalne ili sustavne citotoksičnosti, genotoksičnosti ili kancerogenosti (24). Osim biokompatibilnosti, MTA posjeduje biološko svojstvo bioaktivnosti koje podrazumijeva otpuštanje molekula ostvarujući time biomineralizacijski, antimikrobni ili regenerativni učinak (24).

Osim bioloških svojstava, važna osobina materijala su i njegova mehanička svojstva: krhkost, vlačna, tlačna, smična i savojna čvrstoća, elastičnost, otpornost na lom, tvrdoća, savitljivost (25). Modifikacija MM MTA materijala dodatkom 5% i 10% SGF pokazala je statistički značajnu razliku i poboljšanje mikrotvrdoće i kompresivne čvrstoće u odnosu na konvencionalni MM MTA (18). Budući da je većina sila koje se razvijaju u stomatognatom sustavu pretežno tlačne prirode, poboljšanje kompresivne čvrstoće kao jednog od mehaničkih svojstava materijala je poželjno i važno obzirom na to da se loša mehanička svojstva MM MTA povezuju sa smanjenom otpornošću korijena na nastanak frakture (26). Poboljšanje mehaničkih svojstava modificiranjem staklenim vlaknima može pozitivno doprinijeti uspješnosti kliničke primjene no samo ukoliko je međudjelovanje materijala i stanica popraćeno izostankom citotoksičnog učinka. Upravo zbog toga je potrebno provesti ispitivanje bioloških svojstava spomenutih eksperimentalnih materijala. U ovom istraživanju cilj je bio ispitati citotoksičnost MM MTA s dodatkom staklenih vlakana na stanicama karcinoma jezika i fibroblastima u *in vitro* uvjetima.

In vitro istraživanja pružaju mogućnost provođenja eksperimenata u kontroliranim i konstantnim uvjetima. Osim znatno niže cijene i skraćenog vremena potrebnog za dobivanje rezultata, jedna od glavnih prednosti u usporedbi s *in vivo* istraživanjima jest mogućnost ponavljanja pokusa (27). Uz podatke o staničnoj proliferaciji i staničnoj smrti, testovi provedeni na staničnim kulturama pružaju uvid u promjene staničnog metabolizma i permeabilnosti stanične membrane kao direktnog pokazatelja toksičnosti ispitanog materijala (28). Posljedično tome, nužno je ispitati kalcij-silikatne materijale testovima citotoksičnosti u *in vitro* uvjetima kao prvom koraku u prepoznavanju biokompatibilnosti samog materijala (29). Također, testovi

citotoksičnosti provedeni u *in vitro* uvjetima su ključna stavka u predviđanju biološkog odgovora stanica i predviđanja ponašanja stanica u prisutnosti ispitivanih materijala u *in vivo* kliničkim istraživanjima koja nerijetko slijede nakon *in vitro* istraživanja (30).

Ispitivanje citotoksičnosti dentalnih materijala važno je obzirom da postoji poveznica smrti stanica pulpe nakon kontakta s određenim dentalnim materijalima (31). Uz istraživanja koja se bave testiranjem učinkovitosti lijekova protiv raka, današnja istraživanja često koriste stanične linije raka u svrhu procijenjivanja osjetljivosti stanica na razne lijekove (32). Za razliku od zdravih stanica, stanice raka su puno osjetljivije, iskazuju svojstvo neograničene proliferacije zbog gubitka sposobnosti apoptoze i poremećaja staničnog ciklusa što ih čini puno jednostavnijima za rad u *in vitro* uvjetima jer je njihov uzgoj puno lakši od uzgoja zdravih stanica (33). Upravo ta razlika može biti razlog različitih rezultata vijabilnosti kao mjere preživljenja stanica u usporednim istraživanjima istih materijala (34). Od iznimne je važnosti istraživanje citotoksičnog učinka materijala na stanicama fibroblasta obzirom da je riječ o stanicama koje su direktno povezane sa procesima diferencijacije matičnih stanica, revaskularizacije i, zaključno, regeneracije pulpo-dentinskog kompleksa (35). Zbog navedenih razloga je citotoksičnost materijala u ovom istraživanju ispitana na opisanim kulturama stanica.

Nulta hipoteza da nema razlike u citotoksičnosti između komercijalno dostupnog MM MTA, njegovih modifikacija s dodatkom 5% i 10% kratkih staklenih vlakana te samih kratkih staklenih vlakana je odbačena obzirom da su rezultati pokazali statistički značajnu razliku u citotoksičnom učinku konvencionalno dostupnog MM MTA, njegovih modifikacija s dodatkom 5% i 10% SGF i samih staklenih vlakana.

Potencijalna citotoksičnost MTA na stanicama fibroblasta ispitana je *in vitro* s ciljem usporedbe i pronalska materijala s najboljim biološkim odgovorom stanica fibroblasta (36). Tako su Hirschman i sur. (37) u svome istraživanju koje su proveli u *in vitro* uvjetima uspoređujući različite dentalne materijale koji se koriste za direktno prekrivanje pulpe dokazali da postoje statistički slične razine citotoksičnosti ispitanih materijala odnosno da i MTA kao i drugi ispitani materijali utječe na vijabilnost stanica fibroblasta kada ostvare kontakt s njima tako što djeluje citotoksično. U ovome je istraživanju u kulturi stanica karcinoma ili fibroblasta citotoksičnost zabilježena kod MM MTA i njegovih modifikacija s 5% i 10% SGF pri većim koncentracijama materijala (0.035 g/mL, 0.75 g/mL i 1.5 g/mL) što nije neočekivani rezultat obzirom da su Naghavi i sur. (38) u svojem istraživanju koristeći se MTT testom, koji se koristio i u ovome istraživanju, zabilježili citotoksičnost MTA u njegovoj najvećoj testiranoj koncentraciji. Međutim, bitno je za naglasiti da su *in vitro* uvjeti umjetno stvoreni i koliko god

su izuzetno korisni u svrhu istraživanja biokompatibilnosti dentalnih materijala, nisu u potpunosti vjerodostojni uvjetima u usnoj šupljini te najveća koncentracija materijala prikazana u eksperimentima nije nužno ona koncentracija materijala koja se koristi u kliničke svrhe obzirom da je za najveću koncentraciju testnog materijala u eksperimentima uzeta cijela kapsula materijala što u kliničkoj praksi ne mora biti slučaj (39). Stoga svakako treba obratiti pozornost i na eventualno postojanje citotoksičnosti kod uzoraka manje koncentracije ispitanih kalcij-silikatnih cemenata u ovome istraživanju. Uzorci nižih koncentracija (0.00175 g/mL i 0.000875 g/mL) MM MTA i modifikacija MM MTA u ovom istraživanju nisu pokazali citotoksični učinak u kulturama stanica kao što to nije bio slučaj ni u istraživanju kojeg su proveli Margunato i sur. (40) koji u svom istraživanju nisu zabilježili citotoksični učinak MM MTA na matičnim stanicama koštane srži. Rezultati ovog istraživanja su također pokazali da je citotoksični učinak puno izraženiji na stanicama fibroblasta obzirom da se u svakoj ispitanoj eksperimentalnoj skupini osim samih staklenih vlakana (MM MTA, MM MTA+5% SGF i MM MTA+10% SGF) citotoksični učinak zabilježio kod fibroblasta već pri nižim koncentracijama materijala dok je pri toj istoj koncentraciji kod karcinoma izostao. Slične rezultate su objavili istraživanja Huang i sur. (41) pri ispitivanju citotoksičnosti različitih adhezijskih sustava na zdravim stanicama fibroblasta, ali i na stanicama karcinoma te su dokazali da je veću citotoksičnost ispitanih materijala u kulturi fibroblasta. Manja osjetljivost karcinomskih stanica može se objasniti funkcionalnim razlikama između karcinomskih i normalnih staničnih kultura budući da genetske promjene kod karcinomskih stanica mogu utjecati na raznolikost signalnih putova koji su uključeni ne samo u proliferaciju, već i u program stanične smrti (42) i regulaciju metabolizma (43).

Povećanje broja stanica u kulturi fibroblasta u usporedbi s kontrolnom skupinom koje je u ovome istraživanju zabilježeno pri nižim koncentracijama materijala može se povezati sa staničnim reakcijama, točnije njihovom adaptacijom na stres uslijed eksperimenata (44). Zabilježeni porast broja stanica u kulturi fibroblasta pri nižim koncentracijama eksperimentalnih kalcij-silikatnih cemenata (0.000875 g/mL i 0.00175 g/mL) može se objasniti kao adaptivni odgovor stanica na stres. Upravo niske koncentracije spoja nerijetko potiču stanični metabolizam, povećanu sintezu proteina, i povećanu proliferaciju s ciljem pripreme, odnosno obrane od stresa (44). Obzirom da su Tomás-Catalá i sur. (45) u svome istraživanju zabilježili povećanu vijabilnost, proliferaciju i vezanje fibroblasta pulpe za ispitani MTA u usporedbi s kontrolom gdje su gore navedeni parametri bili slabije izraženi, ostaje prostor za daljnjim istraživanjem i utvrđivanjem zbog čega dolazi do proliferacije stanica pri izlaganju

nižim koncentracijama ispitanih dentalnih materijala. Väkiparta M. i sur. (46) dokazali su da E-staklena vlakna nemaju citotoksični učinak te da posjeduju zadovoljavajuća biološka svojstva, a takvi su rezultati potvrđeni i u ovom istraživanju, gdje je utvrđeno da sama kratka staklena vlakana ne dovode do citotoksičnog djelovanja ni na stanice fibroblasta, ni na stanice karcinoma jezika.

Iako su *in vitro* istraživanja do sada dala obećavajuće rezultate i značajno doprinijela novim saznanjima o interakciji ljudskog tijela i materijala te time unaprijedile terapijski pristup u dentalnoj medicini, ova metoda istraživanja ima svoj nedostatak ograničenosti na kontrolirane eksperimentalne uvjete. Posljedično, time ne predstavlja stvarne oralne uvjete u kojima će se materijali i njegove modifikacije naći (47). Prema dobivenim rezultatima ovog istraživanja, može se zaključiti da modifikacije MM MTA dodatkom 5% i 10% SGF pokazuju citotoksičnost koja je manja ili slična komercijalno dostupnom MM MTA materijalu. Unatoč informacijama o citotoksičnosti dobivenih *in vitro*, neophodno je provesti istraživanje genotoksičnosti i osjetljivosti u svrhu dobivanja potpunih informacija o biološkom utjecaju dentalnih materijala (48). Potrebna su daljnja istraživanja i ispitivanje vrste smrti stanica (nekroza ili apoptoza) kako bi se dobio bolji uvid u biološka svojstva modificiranih MM MTA materijala.

6. ZAKLJUČCI

Citotoksični učinak MM MTA opažen je u obje kulture stanica pri koncentracijama od 0.75 g/mL i 1.5 g/mL dok je u kulturi fibroblasta citotoksični učinak zabilježen i pri koncentraciji od 0.035 g/mL.

U obje kulture stanice, zabilježen je citotoksični učinak MM MTA+5% SGF pri koncentraciji od 1.5 g/mL dok je u kulturi fibroblasta citotoksični učinak zabilježen i pri koncentraciji od 0.75 g/mL.

Citotoksični učinak MM MTA+10% SGF je izostao u kulturi CAL27 dok je u kulturi fibroblasta zabilježen pri koncentracijama 0.75 g/mL i 1.5g/mL.

Staklena vlakna nisu pokazala citotoksičnost u obje kulture stanica.

Veći citotoksični učinak je opažen za MM MTA i njegove modifikacije dodatakom 5% i 10% SGF u kulturi fibroblasta u usporedbi s kulturom CAL27.

Prema dobivenim rezultatima ovog istraživanja, može se zaključiti da modifikacije MM MTA dodatkom 5% i 10% SGF pokazuju citotoksičnost koja je manja ili slična komercijalno dostupnom MM MTA materijalu.

7. ZAHVALE

Posebnu zahvalnost želim iskazati svojoj mentorici, prof.dr.sc. Anji Barabi. Zahvaljujem Vam se na pruženoj prilici i povjerenju. Hvala Vam na svim savjetima, podršci, vremenu, ljubaznosti i strpljenju koje ste mi pružili tijekom istraživanja i pisanja ovog znanstvenog rada.

Iznimno zahvaljujem prof.dr.sc. Ivani Miletić na pruženoj prilici i iskazanom povjerenju u ovom istraživanju. Hvala Vam na svim riječima podrške, pomoći i svim savjetima koje ste mi dali tokom izrade ovog rada.

Veliko hvala dr.sc. Anamarii Brozović s Instituta Ruđer Bošković. Hvala Vam na prenesenom znanju iz područja molekularne biologije, pomoći i vremenu koje ste uložili u moju edukaciju.

Posebno hvala mojoj majci koja me svojim primjerom naučila vrijednostima discipline, upornosti, truda i skromnosti. Hvala mome ocu koji me uvijek usmjeravao ka učenju novog i nepoznatog. Hvala mojoj sestri koja me uvijek podržavala i vjerovala u mene.

Hvala svim mojim dragim prijateljima koji su me kroz život, a i sada tokom pisanja ovog rada bodrili, vjerovali u mene, moje želje i moj uspjeh.

Hvala svima koji su doprinijeli realizaciji ovog rada.

8. LITERATURA

1. Snahe S, Fakhri E, Yavari H, Maleki Dizaj S, Salatin S, Henri K. Portland Cement: An Overview as a Root Repair Material. *Biomed Res Int*. 2022;2022:3314912.
2. Torabinejad M, Parioikh M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part II: other clinical applications and complications. *Int Endod J*. 2018;51(3):284-317.
3. Maru V, Dixit U, Patil RSB, Parekh R. Cytotoxicity and Bioactivity of Mineral Trioxide Aggregate and Bioactive Endodontic Type Cements: A Systematic Review. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2021;14(1):30-9.
4. Sáez MDM, López GL, Atlas D, de la Casa ML. Evaluation of pH and calcium ion diffusion from calcium hydroxide pastes and MTA. *Acta Odontol Latinoam*. 2017;30(1):26-32.
5. Gandolfi MG, Siboni F, Polimeni A, Bossù M, Riccitiello F, Rengo S, et al. In Vitro Screening of the Apatite-Forming Ability, Biointeractivity and Physical Properties of a Tricalcium Silicate Material for Endodontics and Restorative Dentistry. *Dent J*. 2013;1(4):41-60.
6. Camilleri J. Mineral trioxide aggregate: present and future developments. *Endodon Topics*. 2015;32(1):31–46.
7. Pushpalatha C, Dhareshwar V, Sowmya SV, Augustine D, Vinothkumar TS, Renugalakshmi A, et al. Modified Mineral Trioxide Aggregate-A Versatile Dental Material: An Insight on Applications and Newer Advancements. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:941826.
8. Bernardi A, Bortoluzzi EA, Felipe WT, Felipe MC, Wan WS, Teixeira CS. Effects of the addition of nanoparticulate calcium carbonate on setting time, dimensional change, compressive strength, solubility and pH of MTA. *Int Endod J*. 2017;50(1):97-105.
9. Marciano MA, Costa RM, Camilleri J, Mondelli RF, Guimarães BM, Duarte MA. Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. *J Endod*. 2014;40(8):1235-40.

10. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of proroot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod.* 2007;33(10):1231-4.
11. Bolhari B, Meraji N, Rezazadeh Sefideh M, Pedram P. Evaluation of the properties of Mineral Trioxide Aggregate mixed with Zinc Oxide exposed to different environmental conditions. *Bioact Mater.* 2020;5(3):516-21.
12. Eskandarinezhad M, Ghodrati M, Pournaghi Azar F, Jafari F, Samadi Pakchin P, Abdollahi AA, et al. Effect of Incorporating Hydroxyapatite and Zinc Oxide Nanoparticles on the Compressive Strength of White Mineral Trioxide Aggregate. *J Dent (Shiraz).* 2020;21(4):300-6.
13. Kharouf N, Zghal J, Addiego F, Gabelout M, Jmal H, Haikel Y, et al. Tannic acid speeds up the setting of mineral trioxide aggregate cements and improves its surface and bulk properties. *J Colloid Interface Sci.* 2021;589:318-26.
14. Nagas E, Cehreli ZC, Uyanik O, Vallittu PK, Lassila LV. Reinforcing Effect of Glass Fiber-incorporated ProRoot MTA and Biodentine as Intraorifice Barriers. *J Endod.* 2016;42(11):1673-6.
15. Tien N, Lee JJ, Lee AK, Lin YH, Chen JX, Kuo TY, at al. Additive Manufacturing of Caffeic Acid-Inspired Mineral Trioxide Aggregate/Poly-ε-Caprolactone Scaffold for Regulating Vascular Induction and Osteogenic Regeneration of Dental Pulp Stem Cells. *Cells.* 2021;10(11):2911.
16. Żuk-Grajewska E, Saunders WP, Chadwick RG. Fracture resistance of human roots filled with mineral trioxide aggregate mixed with phosphate-buffered saline, with and without calcium hydroxide pre-medication. *Int Endod J.* 2021;54(3):439-53.
17. Lim M, Song M, Hong CU, Cho YB. The biocompatibility and mineralization potential of mineral trioxide aggregate containing calcium fluoride-An in vitro study. *J Dent Sci.* 2021;16(4):1080-6.
18. Filipović J, Ivanišević A, Matijević J, Pilipović A, Zajc I, Miletic I, et al. Evaluation of Microhardness and Compressive Strength of Mineral Trioxide Aggregate Modified by Addition of Short Glass Fibers and Shredded Polyglycolic Acid Sutures. *Materials (Basel).* 2025;18(7):1491.

19. Rosa V, Cavalcanti BN, Nör JE, Tezvergil-Mutluay A, Silikas N, Bottino MC, et al. Guidance for evaluating biomaterials' properties and biological potential for dental pulp tissue engineering and regeneration research. *Dent Mater.* 2025;41(3):248-64.
20. Crawford L, Wyatt M, Bryers J, Ratner B. Biocompatibility Evolves: Phenomenology to Toxicology to Regeneration. *Adv Healthc Mater.* 2021;10(11):e2002153.
21. Katić V, Špalj S. Ispitivanje svojstava materijala za uporabu u dentalnoj medicini. *Med Flum.* 2014;50(3):268-78.
22. Ladino LG, Bernal A, Calderón D, Cortés D. Bioactive Materials in Restorative Dentistry: A Literature Review. *SVOA Dent.* 2021;2:74–81.
23. Jung S, Mielert J, Kleinheinz J, Dammaschke T. Human oral cells' response to different endodontic restorative materials: an in vitro study. *Head Face Med.* 2014;10:55.
24. Esen M, Guven Y, Seyhan MF, Ersev H, Tuna-Ince EB. Evaluation of the genotoxicity, cytotoxicity, and bioactivity of calcium silicate-based cements. *BMC Oral Health.* 2024;24(1):119.
25. De Stefani A, Bruno G, Gracco A. Special Issue on the Advance of the Mechanical Properties of Dental Materials. *Appl Sci.* 2022;12(24):13028.
26. Nagas E, Uyanik O, Altundasar E, Durmaz V, Cehreli ZC, Vallittu PK, et al. Effect of different intraorifice barriers on the fracture resistance of roots obturated with Resilon or gutta-percha. *J Endod.* 2010;36(6):1061-3.
27. Nickien M, Heuwerkerk A, Ito K, van Donkelaar CC. Comparison between in vitro and in vivo cartilage overloading studies based on a systematic literature review. *J Orthop Res.* 2018;36(8):2076–86.
28. Silano V, Paganuzzi-Stammati A, Zucco F. Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures. In: Bourdeau P et al., editors. *Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects*. 1st ed. New York: John Wiley & Sons; 1990. p. 75-97.
29. Ferreira CMA, Sassone LM, Gonçalves AS, de Carvalho JJ, Tomás-Catalá CJ, García-Bernal D, et al. Physicochemical, cytotoxicity and in vivo biocompatibility of a high-plasticity calcium-silicate based material. *Sci Rep.* 2019;9(1):3933.

30. Gheorghiu IM, Iliescu AA, Popescu GAD, Paunica S, Dumitriu AS. Biological Effect of Modern Bioactive Materials Used in Direct and Indirect Capping; In Vitro Study. *J Mind Med Sci.* 2024;11(2):444-51.
31. Escobar-García DM, Escobedo-Márquez N, Méndez-González V, González-Amaro AM, Flores-Reyes H, Pozos-Guillén A. Cytotoxicity, Cell Adhesion, and Apoptotic Gene Expression in Periodontal Ligament Fibroblasts treated with Endodontic Sealers. *P R Health Sci J.* 2019;38(4):237-43.
32. Ertel A, Verghese A, Byers SW, Ochs M, Tozeren A. Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Mol Cancer.* 2006;5(1):55.
33. Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, Blain SW, Holcombe RF, Mahajna J, et al. Sustained Proliferation in Cancer: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Semin Cancer Biol.* 2015;35(Suppl):S25–S54.
34. Barabadi H, Alizadeh A, Ovais M, Ahmadi A, Shinwari ZK, Saravanan M. Efficacy of green nanoparticles against cancerous and normal cell lines: a systematic review and meta-analysis. *IET Nanobiotechnol.* 2018;12(4):377-91.
35. Jeanneau C, Lundy FT, El Karim IA, About I. Potential Therapeutic Strategy of Targeting Pulp Fibroblasts in Dentin-Pulp Regeneration. *J Endod.* 2017;43(9S):S17-S24.
36. Ribeiro DA, Matsumoto MA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DM. In vitro biocompatibility tests of two commercial types of mineral trioxide aggregate. *Braz Oral Res.* 2005;19(3):183-7.
37. Hirschman WR, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *J Endod.* 2012;38(3):385-8.
38. Naghavi N, Ghoddusi J, Sadeghnia HR, Asadpour E, Asgary S. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture cements on L929 mouse fibroblast cells. *Dent Mater J.* 2014;33(1):64-9.
39. Ghallab A. In vitro test systems and their limitations. *EXCLI J.* 2013;12:1024-6.

40. Margunato S, Taşlı PN, Aydın S, Karapınar Kazandağ M, Şahin F. In Vitro Evaluation of ProRoot MTA, Biodentine, and MM-MTA on Human Alveolar Bone Marrow Stem Cells in Terms of Biocompatibility and Mineralization. *J Endod*. 2015;41(10):1646-52.
41. Huang TH, Tsai CY, Chen SL, Kao CT. An evaluation of the cytotoxic effects of orthodontic bonding adhesives upon a primary human oral gingival fibroblast culture and a permanent, human oral cancer-cell line. *J Biomed Mater Res*. 2002;63(6):814-21.
42. Lovschall H, Eiskjaer M, Arenholt-Bindslev D. Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. *Toxicol In Vitro*. 2002;16(1):63-9.
43. Zhu X, Rosenkranz HS. Structural basis of the toxicity of chemicals in cultured human HeLa cells. *Altern Lab Anim*. 2000;28:557-74.
44. Wan Y, Liu J, Mai Y, Hong Y, Jia Z, Tian G, et al. Current advances and future trends of hormesis in disease. *NPJ Aging*. 2024;10(1):26.
45. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, et al. Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeomTA Plus on human dental pulp stem cells. *Int Endod J*. 2017;50(Suppl 2):e63-e72.
46. Väkiparta M, Koskinen MK, Vallittu P, Närhi T, Yli-Urpo A. In vitro cytotoxicity of E-glass fiber weave preimpregnated with novel biopolymer. *J Mater Sci Mater Med*. 2004;15(1):69-72.
47. Pavanello L, Cortês IT, de Carvalho RDP, Picolo MZD, Cavalli V, Silva LTS, et al. Physicochemical and biological properties of dental materials and formulations with silica nanoparticles: A narrative review. *Dent Mater*. 2024;40(11):1729-41.
48. Anderson JM. Future challenges in the in vitro and in vivo evaluation of biomaterial biocompatibility. *Regen Biomater*. 2016;3(2):73-7.

9. SAŽETAK

IN VITRO ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI EKSPERIMENTALNIH KALCIJ - SILIKATNIH CEMENATA

Lucija Pavlović

Svrha ovog istraživanja bila je ispitati *in vitro* citotoksičnost komercijalno dostupnog MM MTA, kao i njegovih modifikacija s dodatkom 5% i 10% kratkih staklenih vlakana (eng. short glass fibers, SGF) i samih kratkih staklenih vlakana na stanicama karcinoma jezika i fibroblastima. U istraživanju je ispitana citotoksičnost tri kapsulirana materijala: 1) komercijalno dostupan MM MTA (MicroMega, Besacon, Francuska); 2) MM MTA+5% SGF; 3) MM MTA+10% SGF te staklenih vlakana koja su dodana u MM MTA: 4) SGF, 10% (0,03 g). Za modificirane materijale, MTA prah bio je uklonjen iz kapsule za 5% i 10% mase, a dodalo se 5% ili 10% SGF dužine 140 μm i promjera 6 μm (Central Glass Co., Tokio, Japan). Uzorci MM MTA te modifikacije MM MTA s dodacima 5% i 10% SGF bili su zamiješani prema uputama proizvođača. U radu su korištene dvije linije stanica, humane tumorske stanice raka jezika CAL27 iz banke stanica i tkiva American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, SAD) i fibroblasti, model normalne humane linije stanica, izolirani iz zdravog donora. U svrhu određivanja djelovanja materijala na preživljenje stanice, korišten je MTT test. Rezultati su pokazali da MM MTA u obje kulture uzrokuje citotoksičnost pri najvišim koncentracijama, 0.035 g/mL, 0.75 g/mL i 1.5 g/mL za fibroblaste, ($p=0.041$, $p=0.001$ i $p<0.001$) te 0.75 g/mL i 1.5 g/mL za CAL27 ($p=0.001$ i $p<0.001$), dok sama staklena vlakna nisu uzrokovala citotoksičnost u ispitivanim koncentracijama niti u jednoj kulturi ($p>0.05$). Modifikacije MM MTA materijala (MM MTA+5% SGF i MM MTA+10% SGF) su u kulturi fibroblasta ostvarile citotoksični učinak pri koncentracijama od 0.75 g/mL i 1.5 g/mL ($p<0.001$) dok je kod CAL27 citotoksični učinak zabilježen samo kod MM MTA+5% SGF i to pri najvišoj ispitanoj koncentraciji od 1.5 g/mL ($p<0.001$).

Staklena vlakna nisu pokazala citotoksičnost u obje kulture stanica. Veći citotoksični učinak je opažen za MM MTA i njegove modifikacije dodatkom 5% i 10% SGF u kulturi fibroblasta u usporedbi s kulturom CAL27. Prema dobivenim rezultatima ovog istraživanja, može se zaključiti da modifikacije MM MTA dodatkom 5% i 10% SGF pokazuju citotoksičnost koja je manja ili slična komercijalno dostupnom MM MTA materijalu.

Ključne riječi: citotoksičnost, mineralni trioksidni agregat, fibroblasti, humane stanice raka jezika CAL27, MTT test

10. SUMMARY

IN VITRO EVALUATION OF THE CYTOTOXICITY OF EXPERIMENTAL CALCIUM-SILICATE CEMENTS

Lucija Pavlović

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* cytotoxicity of commercially available MM MTA, its modifications with the addition of 5% and 10% short glass fibers (SGF) and SGF alone on fibroblast cells and human tongue carcinoma cells. Cytotoxicity of three encapsulated materials was investigated: 1) commercially available MM MTA (MicroMega, Besacon, France); 2) MM MTA+5% SGF; 3) MM MTA+10% SGF and SGF added to MM MTA: 4) SGF, 10% (0.03 g). For the modified materials, MTA powder was removed from the capsule by 5% and 10% by weight, and 5% or 10% of SGF measuring 140 µm in length and 6 µm in diameter (Central Glass Co., Tokyo, Japan) were added. Samples of MM MTA and MM MTA modifications with 5% and 10% SGF were mixed according to the manufacturer's instructions. Two cell lines were used in the study, human tongue cancer tumor cells CAL27 from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA) and fibroblasts, a model of normal human cell line isolated from a healthy donor. In order to assess the effect of the material on cell survival, MTT test was used. The results showed that MM MTA exhibited cytotoxicity in both cultures at the highest concentrations, 0.035 g/mL, 0.75 g/mL and 1.5 g/mL for fibroblasts, ($p=0.041$, $p=0.001$ and $p<0.001$, respectively) and 0.75 g/mL and 1.5 g/mL for CAL27 ($p=0.001$ and $p<0.001$, respectively), while SGF did not show cytotoxicity at any tested concentrations in either cell culture ($p>0.05$). The modified MM MTA materials (MM MTA+5% SGF and MM MTA+10% SGF) induced cytotoxicity in fibroblasts at concentrations of 0.75 g/mL and 1.5 g/mL ($p<0.001$), while in CAL27, cytotoxicity was observed only for MM MTA+5% SGF at the highest tested concentration of 1.5 g/mL ($p<0.001$).

Overall, SGF alone did not demonstrate cytotoxicity in either cell line. MM MTA and its modifications with the addition of 5% and 10% SGF exhibited greater cytotoxicity in fibroblasts compared to CAL27 cells. According to the results obtained, it can be concluded that MM MTA modifications with 5% and 10% SGF have cytotoxicity levels that are lower or similar to those of commercially available MM MTA.

Key words: cytotoxicity, mineral oxide aggregate, fibroblasts, human tongue cancer tumor cells CAL27, MTT test

11. ŽIVOTOPIS

Lucija Pavlović rođena je 15.5.2001. godine u Zagrebu. Nakon završene XI. Opće Gimnazije u Zagrebu, 2020. godine upisuje Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tokom studija sudjeluje na studentskim kongresima, a najveći interes pokazuje u granama endodoncije i oralne kirurgije. Svoje znanje obogaćuje praktičnim radom u privatnoj poliklinici u Zagrebu. Za vrijeme studija objavila je članak u Sondi pod naslovom „Oralnokirurški pristup neravnomjernoj hipertrofiji donje čeljusti“.