

Citotoksični i genotoksični učinak suvremenih estetskih restaurativnih materijala na stanice pulpe i sluznice usne šupljine

Tadin, Antonija

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:252520>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Antonija Tadin

**CITOTOKSIČNI I GENOTOKSIČNI
UČINAK SUVREMENIH ESTETSKIH
RESTAURATIVNIH MATERIJALA NA
STANICE PULPE I SLUZNICE USNE
ŠUPLJINE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



UNIVERSITY OF ZAGREB

SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Antonija Tadin

**CYTOTOXIC AND GENOTOXIC
EFFECTS OF CONTEMPORARY
ESTHETIC RESTORATIVE MATERIALS
ON PULPAL CELLS AND MUCOSAL
CELLS OF ORAL CAVITY**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013.



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Antonija Tadin

**CITOTOKSIČNI I GENOTOKSIČNI
UČINAK SUVREMENIH ESTETSKIH
RESTAURATIVNIH MATERIJALA NA
STANICE PULPE I SLUZNICE USNE
ŠUPLJINE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Nada Galić

Komentor: dr. sc. Davor Želježić

Zagreb, 2013.

Rad je izrađen u Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju Stomatološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu i u Jedinici za mutagenezu, Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu

Voditelj rada: prof. dr. sc. Nada Galić, Zavod za endodonciju i restaurativnu stomatologiju, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

Suvoditelj rada: dr. sc. Davor Želježić, Jedinica za mutagenezu, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, Hrvatska

Lektor hrvatskog jezika: Gordana Milevoj, prof. hrvatskog jezika, Reburići bb, 52220 Labin, Hrvatska

Lektor engleskog jezika: Deana Gaić-Kaličanin, prof. engleskog jezika, Ante Starčevića 9, 21214 Kaštel Kambelovac, Hrvatska

Rad sadrži: 104 stranice

26 tablica

14 slika

1 CD

Želim izraziti iskrenu zahvalnost svojim dragim i strpljivim mentorima, mojim uzorima u poštenju, znanosti i struci, prof. dr. sc. Nadi Galić i dr. sc. Davoru Želježiću, na ukazanom povjerenju, pruženoj podršci i nesebičnom vodstvu. Najbolji ste i bezbroj puta hvala!

Zahvaljujem dr. sc. Marinu Mladiniću na susretljivosti, pomoći i korisnim savjetima tijekom laboratorijskog dijela istraživanja.

Hvala od srca meni dragim ljudima, kolegama i prijateljima, sa Zavoda za endodonciju i restaurativnu stomatologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Studija dentalne medicine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu na stručnim, znanstvenim i životnim savjetima.

Mom najdražem bratu, hvala na velikom strpljenju i volji da me po ne znam koji put uči pojedine kompjuterske programe. Što bi ja bez njega ...

Veliko hvala mojim roditeljima na njihovoj ljubavi, ohrabrenju, neizmjernoj vjeri i nadahnuću, oni su moja najveća snaga. Sve što jesam mogu zahvaliti njima!

Hvala vam ...

Antonija

SAŽETAK

Kompozitni dentalni materijali nakon svoje primjene dolaze u izravan dodir s oralnim tkivima. Zbog ovog bliskog i dugotrajnog kontakta, kompozitne materijale bi trebao karakterizirati visok stupanj biokompatibilnosti. Svrha ovog doktorskog rada bila je utvrditi koliko su kompoziti biokompatibilni i sigurni za kliničko korištenje kroz procjenu njihovog citotoksičnog i/ili genotoksičnog djelovanja. Citotoksično i genotoksično djelovanje istraživalo se na stanicama humane kulture gingive i pulpe, *ex vivo*, ovisno o koncentraciji korištenog materijala primjenom diferencijalnog bojanja akridin-narančastom bojom i etidijevim bromidom te primjenom komet testa. Isti materijali ispitivani su i u *in vivo* uvjetima. Pacijentima su izrađene kompozitne restauracije klase V te se pratio genotoksični učinak materijala na epitelnim stanicama gingive uz rub postavljenog ispuna. Uzorci stanica za ispitivanje uzimani su 0, 7, 30 i 180 dana nakon postavljanja restauracije. Oštećenje DNK analizirano je dvjema metodama, mikronukleus i komet testom. Kompozitni materijali u testiranim koncentracijama pokazali su genotoksični učinak u uvjetima *ex vivo* za oba ispitivana parametra komet testa, dužina i intenzitet repa. Kompozitni materijal Kalore pokazao je veću genotoksičnost u odnosu na Vertise flow. Rezultati *in vivo* dijela istraživanja pokazali su značajno više parametre komet testa unutar razdoblja od 30 i 180 dana. Mikronukleus test za isto vrijeme ekspozicije pokazao je znatno veći broj stanica s mikronukleusom, kariolizom i nuklearnim pupovima. Među testiranim materijalima nije uočena razlika u djelovanju. Na temelju rezultata, možemo zaključiti da upotreba kompozita uzrokuje DNK oštećenje u stanicama pulpe i gingive, međutim uzimajući u obzir visoku učinkovitost mehanizama popravka DNK, rezultate ne bi trebalo smatrati apsolutnim pokazateljima genotoksičnosti.

EXTENDED SUMMARY

Title: Cytotoxic and genotoxic effects of contemporary esthetic restorative materials on pulpal cells and mucosal cells of oral cavity

Objectives: The most important requirement for the materials to be used in medical applications is its biocompatibility. Dental composite materials come into close contact with oral tissues, especially with gingival cells. Due to this close and long-term contact, the materials should exhibit a high degree of biocompatibility. The aim of this doctoral thesis was to certify that the modern composite materials are biocompatible and safe for clinical use and also, was to evaluate their cytotoxic and/or genotoxic effect on human fibroblasts *ex vivo* and gingival cells *in vivo*.

Materials and Methods: *Ex vivo* cytotoxicity and genotoxicity of two contemporary commercial composite materials (Kalore, Vertise flow) on human gingival and pulpal fibroblasts depending on the concentration of the used material (20 mg/ml, 40 mg/ml), were tested using the ethidium bromide/acridin orange viability staining and an alkaline single-cell gel electrophoresis technique (comet assay). Genotoxicity was also assessed in gingival epithelial cells *in vivo*. Class V composite restorations were placed in 30 adult patients using two different composite resins. Cell samples were collected by gentle brushing gingival area along the composite restoration prior to, 7 days, 30 days, and 180 days following the restoration of the tooth. DNA damage was analysed for each cell sample by comet and micronucleus assay.

Results: *Ex vivo* tested dental composites revealed statistically significant increase in the tail length and tail intensity in treated human gingival and pulpal fibroblasts, independent of the applied concentration. Cultures treated with nano-hybrid composite material Kalore (20 mg/ml) have been showed more genotoxic than those treated with self-adhesive flowable composite Vertise flow. *In vivo* results showed significantly higher comet assay parameters (tail length and % DNA in the tail) within 30, and 180 days of treatment. While the micronucleus tests for the same exposure time showed a higher number of cells with micronuclei, karyolysis and nuclearbuds. Results did not reveal the difference between the two composite materials for the same exposure time.

Conclusion: We can conclude based on the results that the use of composite resins causes cellular damage. However, taking into consideration the high efficiency of DNA repair mechanisms, the results should not be considered as an absolute indicator of genotoxicity potential. As dental composite resins remain in close contact with oral tissue over a long period of time, further research on their possible genotoxicity are desirable.

Keywords: comet assay, cytotoxicity test, dental composite, DNA damage, genotoxicity test, gingival epithelial cells, human gingival fibroblasts, human pulpal fibroblasts, micronucleus test

POPIS OZNAKA I KRATICA

Bis-EMA	Bisfenol-A-etilmetakrilat
Bis-GMA	Bisfenol-A-glicidil dimetakrilat
Bis-HPPP	Bis[(hidroksipropoksi)fenil]propan
DEGDMA	Dietilenglikol dimetakrilat
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina
E-BPA	Etoksilirani bisfenol-A
EDTA	Etilen-diamin-tetraoctena kiselina
EGDMA	Etilenglikol dimetakrilat
EMA	Epoksimetakrina kiselina
EN 1441	Europski standard za analizu rizika
FBS	Fetalni serum goveda
GPDM	Glicerolfosfat dimetakrilat
HEMA	Hidroksietilmetakrilat
ISO	Međunarodna organizacija za standarde
LDH	Laktat dihidrogenaza
LED	Diodni polimerizatori koji emitiraju plavo svjetlo
LMP	Niska točka otapanja
MAA	Metakrilna kiselina
MTT	Tetrazolium test
NMP	Normalna točka otapanja
PBS	Otopina fosfatnog pufera

ROS	Reaktivni kisikovi spojevi
SD	Standardna devijacija
SOF	Postupni porast intenziteta osvjetljivanja plavom diodom
UDMA	Uretan dimetakrilat
TEGDMA	Trieten glikol dimetakrilat

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Biokompatibilnost dentalnih materijala.....	2
1.2. Testovi za procjenu biokompatibilnosti dentalnih materijala.....	5
1.2.1. Komet test (metoda elektroforeze pojedinačne stanice u agaroznom gelu).....	7
1.2.2. Mikronukleus test	10
1.3. Kompozitni materijal	13
1.4. Biološka razgradnja kompozitnih materijala	17
1.5. Citotoksičnost i genotoksičnost kompozitnih materijala.....	21
1.6. Svrha istraživanja	25
2. MATERIJALI I METODE	26
2.1. Ispitivanje citotoksičnosti i genotoksičnosti kompozitnih materijala u uvjetima <i>ex vivo</i>	27
2.1.1. Materijali	27
2.1.2. Uspostava primarne kulture pulpe i gingive	28
2.1.3. Priprema kompozitnih materijala	29
2.1.4. Analiza citotoksičnosti primjenom diferencijalnog bojanja akridin narančastom bojom i etidijevim bromidom	30
2.1.5. Alkalni komet test (metoda elektroforeze pojedinačne stanice u agaroznom gelu)	31
2.1.6. Statistička obrada podataka	32
2.2. Ispitivanje genotoksičnosti kompozitnih materijala u uvjetima <i>in vivo</i>	33
2.2.1. Materijali	33
2.2.2. Ispitanici	33
2.2.3. Uzorkovanje stanica	34
2.2.4. Alkalni komet test (metoda elektroforeze pojedinačne stanice u agaroznom gelu)	34
2.2.5. Mikronuklesus test	35

2.2.6.	Statistička obrada podataka	36
3.	REZULTATI.....	37
3.1.	Citotoksični i genotoksični učinak kompozitnih materijala u uvjetima <i>ex vivo</i>	38
3.1.1.	Određivanje tipa stanične smrti.....	38
3.1.2.	Alkalni komet test (metoda elektroforeze pojedinačne stanice u agaroznom gelu)	39
3.2.	Genotoksični učinak kompozitnih materijala u uvjetima <i>in vivo</i>	43
3.2.1.	Alkalni komet test (metoda elektroforeze pojedinačne stanice u agaroznom gelu)	43
3.2.2.	Mikronukleus test	50
3.2.3.	Usporedba tretmana.....	58
3.2.4.	Napredni regresijski modeli i višestruka regresijska analiza	61
4.	RASPRAVA	70
4.1.	Citotoksičan i genotoksičan učinak kompozitnih materijala u uvjetima <i>ex vivo</i>	71
4.2.	Genotoksični učinak kompozitnih materijala u uvjetima <i>in vivo</i>	77
5.	ZAKLJUČAK	83
6.	LITERATURA	85
7.	ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA	101
7.1.	Popis objavljenih radova	103

1. UVOD

1.1. Biokompatibilnost dentalnih materijala

Biomaterijal je tvar koja se koristi duži vremenski period unutar organizma s ciljem liječenja ili zamjene tkiva, organa ili njihove funkcije. Malobrojni su materijali za koje se može reći kako su biološki inertni jer većina sadrži potencijalno štetne ili nadražujuće sastojke (1). Biokompatibilnost se definira kao sposobnost materijala da nakon primjene obavlja određenu funkciju unutar organizma domaćina, a da pri tome ne izaziva negativan odgovor (2, 3). Biokompatibilnost obuhvaća fizička, mehanička i kemijska svojstva materijala, kao i potencijalne citotoksične, genotoksične, mutagene i alergijske učinke (4, 5). Kako bi se potvrdila biokompatibilnost, materijal mora proći kroz brojna *ex vivo* testiranja do kliničkih studija na ljudima. Samo takvom kombinacijom testova može se osigurati pregled interakcija biomaterijala s domaćinom. Testovi kojima se procjenjuje biokompatibilnost materijala podijeljeni su u tri skupine: (a) primarni (testovi citotoksičnosti *ex vivo*), (b) sekundarni (ispituju sistemsku toksičnost na životinjama putem intramuskularne ili potkožne implantacije) i (c) preklinički ("usage" testovi - promatranje reakcije tkiva nakon umetanja materijala, na primjer, u zubima) (1).

Biomaterijali moraju zadovoljiti niz preduvjeta prije nego se puste u upotrebu. Sukladno EN 1441 (Europski standard za analizu rizika, 1996. godina), biokompatibilni materijal ne smije biti štetan (rizičan) za organizam domaćina (6). Karakteristika materijala da uđe u interakciju s biološkim tkivom i pritom stvori stabilnu vezu ključna je za biokompatibilnost. Biokompatibilnost materijala očituje se kroz brojne parametre: (a) citotoksičnost (sistemsku i lokalnu), (b) genotoksičnost, (c) mutagenost, (d) kancerogenost i (d) imunogenost (7).

Toksičnost materijala opisuje se kao sposobnost kemijske tvari da ošteti biološki sustav. Lokalna toksičnost nastaje na mjestu primjene, za razliku od sustavne toksičnosti u kojoj se nepovoljna reakcija pojavljuje u području udaljenom od mjesta primjene. Citotoksičnost se odnosi na oštećenje pojedine stanice, primjerice u kulturama stanica te predstavlja održivost staničnog života (7, 8). Dva su načina stanične smrti, apoptoza (programirana smrt stanice) i nekroza (slučajna stanična smrt), a međusobno se bitno razlikuju u morfologiji, biokemiji i biološkoj važnosti (7, 9). Nekroza stanice nastaje kao posljedica znatnijeg oštećenja stanice izazvanog različitim fizikalno-kemijskim, kemijskim i mehaničkim agensima. Jako oštećena stanica ne može kontrolirati ravnotežu tekućine i iona te ona bubri, a stanične organele gube cjelovitost. Otpuštanje citoplazmičkog sadržaja dovodi do upalnog odgovora okolnog tkiva

(9, 10). U slučajevima kada cjelovitost stanice nije ozbiljnije narušena te je oštećenje slabo, stanica umire u apoptozi nakon čega "tiho" nestane procesom fagocitoze. Apoptotske se stanice mogu prepoznati na osnovi morfoloških (smežuranost, kondenzacija kromatina, stvaranje apoptotskih tijela) i biokemijskih promjena (enzimatska DNK destrukcija) (9, 10). Isti uzrok može dovesti do istodobne pojave nekroze i apoptoze, a koja će prevladati ovisi o dugotrajnosti i jačini štetnog djelovanja (10). Različite metode mogu se koristiti za određivanje tipa stanične smrti: elektronska i fluorescentna mikroskopija, testovi formiranja kolonija, vitalno bojanje i protočna citometrija (9). Fluorescentna mikroskopija koristi se za otkrivanje brojnih morfoloških i biokemijskih apoptotičnih promjena koje se mogu vizualizirati specifičnim fluorokromima poput akridin-narančaste (metakromatski fluorokrom) koja različito boji dvostruku (zeleno fluorescencija) od jednostruke (crvena fluorescencija) DNK. Na osnovu promjena u obojenosti moguće je pratiti promjene u kondenzaciji i denaturaciji kromatina tijekom apoptoze. Stanice u ranoj apoptozi fluoresciraju zeleno i imaju kondenziranu kromatinsku masu na periferiji jezgre, a fragmentirane jezgre i apoptotička tjelešca u kasnoj fazi apoptoze fluoresciraju crveno (10, 11).

Genotoksičnost se opisuje kao štetni učinak na genomski materijal, a može biti izazvana oštećenjem DNK bez direktnog dokaza za mutacije (7). Genotoksično djelovanje nekog materijala inducira promjene u genomu koje narušavaju njegov integritet ili funkciju. Ovisno o intenzitetu učinka, stanica se oporavlja, započinje neoplastični rast ili umire (12). Niske koncentracije tvari ne moraju pokazati učinak koji se može zamijetiti na razini funkcioniranja stanice i organizma, ali kod dugotrajnih izloženosti uslijed djelovanja na genetički materijal, može doći do razvoja neoplazija i smrti čitavog organizma. Prijenos genetske štete na sljedeće generacije stanica može se izbjeći programiranom smrću stanice.

Prijelaz genetske ozljede na sljedeću generaciju zove se mutagenost. Mutagenost i kancerogenost nisu iste (7). Kancerogenost proizlazi iz nekoliko mutacija, što znači kako svi mutageni događaji ne dovode do razvoja tumora. Mutagenost nam služi kao pokazatelj "moguće" kancerogenosti tvari koja je oštetila DNK (7). Mnoštvo različitih metoda, uglavnom *ex vivo* testova (Ames, mikronukleus, HPRT i test na stanicama mišjeg limfoma), koriste se u procjeni mutagenog potencijala materijala. Najčešće se istražuje utjecaj materijala na genom (DNK) stanica bakterija ili sisavaca. Ames je najpoznatiji takav test, a koristi se genetski promijenjenim bakterijama (13).

Imunogenost jest sposobnost tvari da izazovu imunološki odgovor. Alergijska reakcija na određenu tvar može biti pokrenuta ukoliko je organizam prethodno bio senzibiliziran. Doza koja uzrokuje alergiju uglavnom je značajno niža od one koja uzrokuje toksičnu reakciju (7). Imunotoksikološki testovi se koriste se za identifikaciju utjecaja tvari ili materijala na jednu ili više komponenti imunostnog sustava. Komponente mogu biti izazvane specifičnom senzibilizacijom, indukcijom autoimune reakcije ili inhibicije (ili promocije) stanične imune obrane (13).

Biokompatibilnost kompozita bitna je iz više razloga. Kompozitni materijali su u intimnom kontaktu s ljudskim oralnim tkivima kroz dugi vremenski period te ih sam pacijent ne može ukloniti. Biokompatibilnost nije stalna i statična, kompoziti u usnoj šupljini podložni su mehaničkim, kemijskim i termičkim promjenama. Treba napomenuti kako praktičari ne misle puno o biokompatibilnosti kompozitnih materijala, već misle ako je materijal na tržištu da je ujedno i siguran te kako njegovu sigurnost više ne treba preispitivati. Proizvođači su odgovorni za svoje proizvode i moguću potencijalnu štetu koju mogu izazvati, ali su isto tako i doktori dentalne medicine odgovorni za njihovu ispravnu primjenu (13). Smjernice dvaju dokumenta međunarodne organizacije za normizaciju (ISO) iz 2009. godine, ISO 7405 (Procjena biokompatibilnosti medicinskih proizvoda koji se koriste u dentalnoj medicini) i ISO 10993 (Biološka procjena medicinskih proizvoda), koriste se u standardnoj praksi za biološku procjenu dentalnih materijala (13). Ukratko, proizvodi moraju proći četiri razine testiranja. U prvoj fazi ispituje se općenita toksičnost (citotoksičnost), u drugoj fazi lokalni tkivni odgovor (test implantacije na životinjama), a tek nakon toga slijedi pretkliničko korištenje na životinjama (faza III) i kliničko testiranje na malom broju pacijenata (faza IV) (14).

1.2. Testovi za procjenu biokompatibilnosti dentalnih materijala

Biomaterijali su razvijeni s ciljem kako bi liječili, povećali ili zamijenili ljudsko tkivo, organ ili funkciju. Biokompatibilnost je glavni preduvjet za njihovo sigurno korištenje, a kako bi se ona procijenila potrebno je napraviti niz testova ovisno o namjeni, položaju i trajnosti primjene materijala. Biokompatibilnost se mjeri s tri vrste bioloških testova: *ex vivo* testovima, pokusima na životinjama i kliničkim ispitivanjima (7).

Ex vivo testovi biokompatibilnosti provode se izvan živog organizma sa svrhom da simuliraju biološku reakciju na materijal kao kada je on postavljen na ili u tkivo živog organizma (2, 15). Utjecaj materijala određuje se mjerenjem brojnosti, faktora rasta, metaboličke funkcije i drugih staničnih funkcija, stanica tretiranih ispitivanim materijalom (2, 16). Ove testove je lako ponoviti i kontrolirati, oni su brzi, relativno jednostavni i jeftini. Osnovni nedostatak *ex vivo* ispitivanja jest njihova upitna klinička relevantnost. *Ex vivo* istraživanja daju ograničene odgovore zbog nepostojanja bioloških i fizioloških dijelova koje nije moguće ponoviti u laboratorijskim uvjetima (17).

Brojnim postupcima može se procijeniti biokompatibilnost materijala. Za testiranje toksičnosti kompozitnih materijala na oralnu sluznicu mogu se koristiti jednoslojne kulture stanica ili 3D tkivno-projektirani modeli ljudske oralne sluznice, dok se za testiranje toksičnosti materijala na pulpnim stanicama koriste jednoslojne kulture i 3D projektirani komadići zubnog tkiva te test s dentinskom barijerom. Jednoslojne kulture dobiju se inokulacijom specifičnih vrsta stanica te njihovim održavanjem u mediju. Tako se za procjenu citotoksičnosti dentalnih materijala koriste fibroblasti gingive, stanice keratociste, L-929 i 3T3 mišji fibroblasti te brojne druge stanične kulture (2, 18, 19, 20, 21). Među različitim staničnim kulturama dokazana je velika razlika u osjetljivosti. Ljudski fibroblasti osjetljiviji su od mišjih (22), s time da su ljudski fibroblasti parodonta i pulpe osjetljiviji od fibroblasta gingive (23). Rezultati dobiveni iz jednoslojnih staničnih kultura ne mogu se odnositi na normalnu ljudsku oralnu sluznicu i ne mogu se preslikati na pacijente jer epitelne stanice u jednoslojnoj kulturi nemaju istu funkciju i citoplazmatsku propusnost poput onih nađenih u normalnoj ljudskoj sluznici (2). Upravo su se iz tog razloga u istraživanjima počeli koristiti trodimenzionalni modeli koji bolje odražavaju kliničku situaciju i omogućuju više završnih točaka analize odgovora sluznice na restaurativne materijale (24-26).

Aдекватni kontakt između stanica i ispitivanog materijala je vrlo važan u biološkom ocjenjivanju materijala. Kontakt između stanica i materijala može se postići na tri načina: izravnim kontaktom, neizravnim kontaktom i kontaktom preko eluata (27). U testovima koji se baziraju na direktnom kontaktu dolazi do fizičkog dodira između materijala i stanica ili staničnog medija. Materijali topljivi u vodi direktno se otapaju u mediju gdje dolazi do bliskog dodira između stanica kulture i testiranog materijala (27). Kontakt između materijala koji nije topljiv i stanica može se uspostaviti tako da se (a) ispitivani uzorak postavi što bliže tkivu (28), (b) ispitivani uzorak postavi na uspostavljenu jednoslojnu kulturu (19, 22), (c) ispitivani uzorak postavi na dno posude u koju se doda suspenzija stanica (29) ili tako da se (d) stanice kultiviraju izravno na ispitivanom uzorku (29). Kod ispitivanja temeljenih na neizravnom dodiru, ispitivani uzorak odvojen je od stanica fizičkim međuslojem (dentinski izbrusak, sloj agara, sintetički filteri) (2, 30, 31). Kontakt između netopljivih materijala i stanica može biti uspostavljen pomoću emulgatora ili otapanjem komponenti u otapalu. Različiti mediji se mogu koristiti za otapanje: hranidbeni medij za stanične kulture (20, 32), destilirana voda (33, 34), fiziološka otopina (22), uravnotežena slana otopina (35) te aceton i etanol u fiziološkoj otopini (36). Kod testova citotoksičnosti, stanična reakcija može se opisati morfološki ili kvantitativno ovisno o vijabilnosti stanice, proliferaciji i staničnoj funkciji kao što je apoptoza, adhezija, migracija i izlučivanje određene tvari. Morfološka procjena temelji se na patološkoj promjeni u stanici poput jezgrinog proširenja, binukleacije i jezgrinih anomalija. Mrtve stanice odlikuju se jezgrinim raspadom i piknozom. U kliničkoj situaciji, oštećeni dio sluznice usne šupljine ima nižu metaboličku stopu i proliferacijski status nego zdrava sluznica, zbog malog broja živih stanica koje su prisutne u oštećenom tkivu. Postoji veliki broj različitih testova koji se mogu koristiti za mjerenje održivosti i proliferacijskog statusa stanica izloženih testiranom materijalu (MTT test, Almar plavi test, LDH test, itd.) te stanične funkcije (testovi koji mjere medijatore upale, komet test, itd.) (2).

In vivo testovi biokompatibilnosti izvode se unutar živog organizma. U istraživanjima se najčešće koriste životinje kod kojih se testirani materijal usadi u tijelo, a potom se gleda i ocjenjuje biološka reakcija tkiva. Ovim načinom testiranja moguće je ocijeniti mnogobrojne složene interakcije između biološkog sustava i materijala. Može se procijeniti reakcija tkiva u neposrednoj blizini ili na udaljenom mjestu. Kod testova usađivanja, ispitivani se materijal može usaditi u vezivno tkivo, mišić ili kost životinje, dok se za kontrolu mogu koristiti materijali poput silikonske gumice. Nakon određenog vremena gleda se reakcija tkiva na

ispitivani i kontrolni materijal. Reakcija tkiva uključuje upalu, nekrozu, infiltraciju, inkapsulaciju ili neki drugi oblik reakcije tkiva. Istraživanja na životinjama su skupa, vremenski dugo traju, postoje mnoge varijable koje je teško kontrolirati te su upitne etičnosti (2, 7).

Klinički *in vivo* testovi pouzdaniji su jer se provode tako da se ispitivani materijal postavi u tijelo volontera u njegovoj konačnoj primjeni. U kontroliranim kliničkim ispitivanjima, istovremeno se ispituje testirani materijal i kontrola. Rezultati dobiveni ovakvim istraživanjima su od posebnog interesa kliničarima jer se testiranje provodi na ciljanoj skupini (pacijentima). Međutim, kliničke studije imaju i brojna ograničenja. Na primjer, mnoge neželjene reakcije mogu se pojaviti tek nakon kronične izloženost materijalu. Studije obično ne traju dovoljno dugo te se često provode na strogo odabranoj skupini bolesnika. One su skupe, dugotrajne, iznimno ih je teško kontrolirati, a dobiveni rezultati teško se tumače uzimajući u obzir sve moguće varijable (7).

1.2.1. Komet test (metoda elektroforeze pojedinačne stanice u agaroznom gelu)

Komet test (elektroforeza pojedinačne stanice u agaroznom gelu) osjetljiv je i brz postupak za mjerenje kvantitativnog oštećenja i popravka molekule DNK na razini pojedinačne stanice (37). Prvi put je test opisan još 1984. godine, a naziv je dobio prema obliku kometa kojeg su poprimile oštećene fluorescirajuće stanice (38). Komet test se bazira na svojstvu da dijelovi negativno nabijene molekule DNK koji se oslobađaju uslijed oštećenja putuju u električnom polju od jezgre prema anodi. Bivša stanična jezgra koja ne putuje u električnom polju i razvučeni polomljeni ulomci oblikuju „glavu“ i „rep“ kometa. U usporedbi s drugim genotoksičnim testovima, prednosti ove tehnike uključuju: (a) visoku osjetljivost u otkrivanju niske razine oštećenja DNK, (b) sposobnost da otkrije genotoksičnost u nedostatku mitotske aktivnosti, (c) zahtjeva mali broj stanica po uzorku, (d) prilagodljivost, (e) niska cijena, (f) jednostavna primjena i (g) relativno kratko vremensko razdoblje (nekoliko dana) potrebno za dovršetak istraživanja (39).

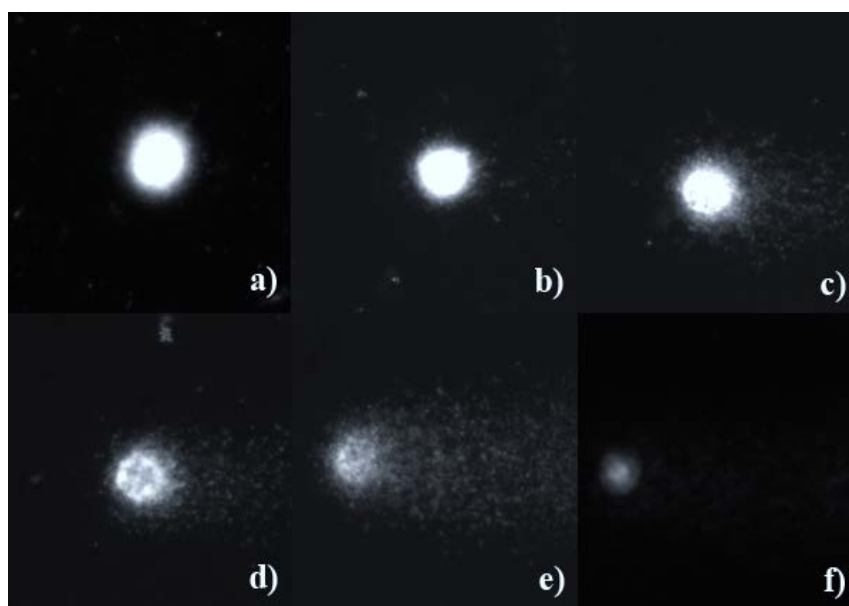
U literaturi se najčešće spominju dvije izvedbe komet testa, neutralna (40) i alkalna (37) verzija. Neutralna izvedba omogućuje specifično otkrivanje dvolančanih lomova u

molekuli DNK, dok alkalna omogućuje specifično otkrivanje jednolančanih lomova, mjesta osjetljivih na lužine (alkilacije baza, adukati na DNK, pirimidinski dimeri, apurinska i apirimidinska mjesta, ukriženo povezivanje komplementarnih lanaca DNK te DNK i proteina) (41).

U ovom doktorskom radu korišten je protokol i metoda po Sinhg-u i suradnicima (37). Pojedinačne stanice najprije se uklope u agarozni gel na brušenim predmetnim stakalcima, potom se stanice liziraju pod alkalnim uvjetima, a zatim se izolirana jezgrina DNK izloži djelovanju električnog polja. Za liziranje stanica primjenjuje se otopina s visokom koncentracijom etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) i deterdženata. EDTA pospješuje destabiliziranje membrane, a deterdženti djeluju na molekule lipida iz stanične membrane, izazivajući razaranje membranskih struktura stanice i oslobađanje ukupne DNK. Nakon liziranja, DNK se denaturira u lužnatom puferu te se preparati postave u kadicu za elektroforezu. Tijekom elektroforeze pod utjecajem električnog polja ulomci DNK nastali jednolančanim lomom izlaze iz klupka genomske DNK te kroz pore agaroznog gela putuju prema anodi. Zbog razlike u brzini kretanja, ulomci se razdvajaju prema veličini (41, 42). Kraći ulomci putuju brže i dalje, dok veći dijelovi oštećene DNK molekule putuju sporije i kraće (43). Oštećenje DNK procjenjuje se na osnovi udjela DNK u "repu" kometa i udjela DNK u "glavi" kometa. Nakon elektroforeze i bojanja preparata s fluorescencijskom bojom (etidij-bromid, propidij-jodid i akridin narančastom, YOYO, SYBR green) pod epifluorescencijskim mikroskopom analizira se 50 do 100 stanica. Za mjerenje kometa i procjenu oštećenja koriste se sustavi za analizu slike u kojima je epifluorescencijski mikroskop povezan s računalom, a pomoću posebnih računalnih programa za svaki pojedinačni komet istovremeno se mjeri više parametara: (a) dužina repa, (b) % DNK u repu i (c) repni moment (41). Dužina repa određena je duljinom DNK migracije i izravno je povezana s veličinom DNK ulomka te stupnjem oštećenja. Teoretski govoreći, jača oštećenja proizvesti će ulomak manje veličine koji će tijekom elektroforeze oputovati na veću udaljenost od jezgre. Dužina se izračunava od sredine glave do kraja repa. Repni intenzitet označava količinu DNK ulomaka koji izravno upućuje na udio genoma koji je pogođen oštećenjem, a linearno je povezan s razinom oštećenja. Postotak DNK u repu smatra se najpouzdanijim parametrom komet testa (44-46). Repni moment izračunava se množenjem dužine i intenziteta te dijeljenjem umnoška sa 100 (43, 47).

Za utvrđivanje genotoksičnosti neke tvari potrebno je izložiti staničnu DNK djelovanju genotoksina, zatim ustanoviti postoji li oštećenje DNK, a nakon toga kvantificirati

to oštećenje. Ukoliko je genetsko oštećenje malo, tijekom elektroforeze molekula DNK se isteže, dok porastom broja oštećenja dijelovi DNK molekule slobodno putuju i tvore rep (41). Naime, odlomljeni fragmenti putuju kroz gel u električnom polju i nakon bojanja pojavljuju se u obliku fluorescirajućeg repa. Preostala genomska DNK ne putuje, a nakon bojanja je vidljiva kao glava kometa. Ukoliko u stanici nisu postojala oštećenja, njezina genomska DNK izgledat će poput fluorescirajućeg kruga (47). Za mikroskopski vidljiv pomak dovoljno je da molekula DNK putuje nekoliko mikrometara (41). Komet testom mogu se prepoznati i stanice u apoptozi koje karakterizira jasna razdvojenost ostatka glave i repa komete, stanice imaju "malu" glavu i "veliki" rep (42). Takve stanice ne bi se smjele uzimati u obzir tijekom analize rezultata komet testa. Oštećene stanice mogu se klasificirati u nekoliko kategorija na temelju duljine migracije i/ili % DNK u repu (Slika 1) (46).



Slika 1. Reprezentativne ilustracije komet testa uzete epifluorescentnim mikroskopom: (a) neoštećena stanica, (b), (c), (d), (e) oštećene stanice i (f) stanica u apoptozi.

U posljednjih dvadesetak godina komet tehnika korištena je u brojnim *ex vivo* i *in vivo* istraživanjima, ali potrebno je upozoriti kako je ograničena na praćenje lomova DNK koji su u najvećoj mjeri popravljivi staničnim mehanizmima popravka. Kako bi se normirali uvjeti rada

i reducirale moguće varijabilnosti važno je istovremeno korištenje drugih metoda poput mikronukleus testa (41).

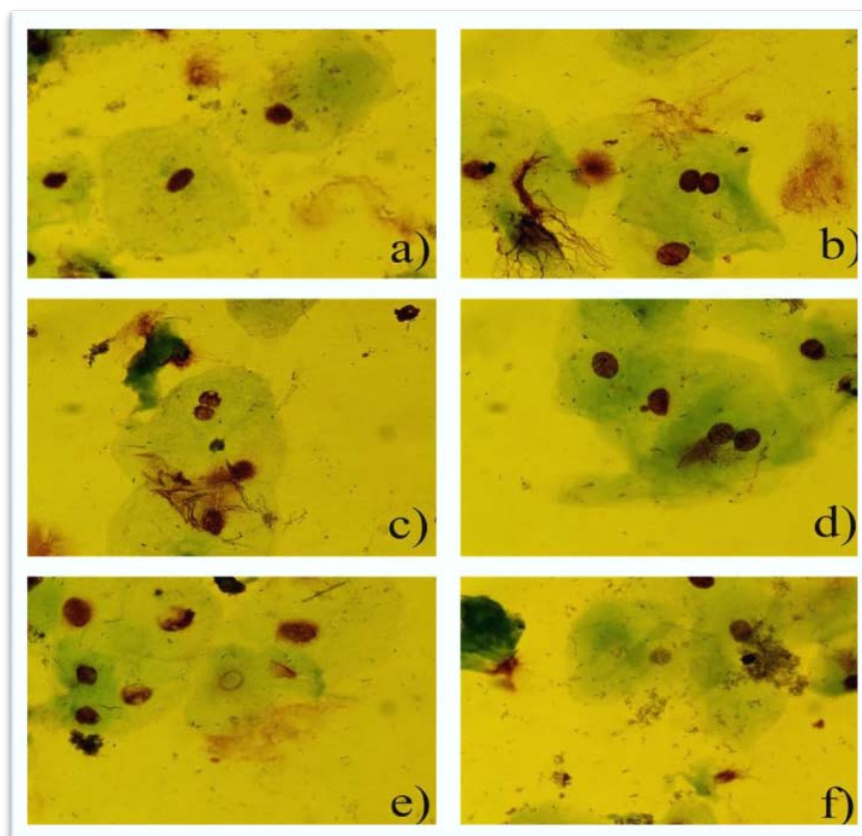
Komet metodom do sada se ispitivala genotoksičnost dentalnih kompozitnih materijala *ex vivo* na humanim limfocitima (48, 49), leukocitima (50), humanim fibroblastima gingive (51), fibroblastima pluća (52), itd. Objavljeno je nekoliko *in vivo* studija koje su se koristile komet testom za ispitivanje genotoksičnog učinka dentalnih kompozitnih materijala na epitelnim stanicama bukalne sluznice (53) i limfocitima (54).

1.2.2. Mikronukleus test

U posljednjih tridesetak godina, mikronukleus test se primjenjuje za procjenu oštećenja kromosoma kod biološkog praćenja ljudske populacije izložene raznovrsnim mutagenim i kancerogenim, kemijskim ili fizičkim agensima. Kromosomski poremećaji dovode do pojave mikronukleusa, malih kromatinskih struktura nalik jezgri smještenih u citoplazmi. Mikronukleusi nastaju kondenzacijom acentričnih kromosomskih ulomaka (kromosomski fragmenti kojima nedostaje centromera) ili cijelih kromosoma koji tijekom stanične diobe u anafazi ne mogu putovati prema ni jednom od dva pola stanice. Test ima potencijal otkriti aktivnosti klastogenih (kromosomski lom) i aneugenih (gubitak kromosoma) genotoksičnih agensa (55-57). Prisutnost mikronukleusa u stanici pokazatelj je postojanja aberacija u genetičkom materijalu stanice. U uvjetima *ex vivo* i *in vivo*, učestalost mikronukleusa može se koristiti kao kvantitativna mjera strukturnih i numeričkih aberacija kromosoma u stanicama pod utjecajem različitih genotoksičnih tvari (41). Primjenom standardnog mikronukleus testa ne mogu se razlikovati mikronukleusi koji potječu od acentričnih ulomaka od mikronukleusa koji potječu od čitavih kromosoma, stoga brojni istraživači kombiniraju klasični mikronukleus test s raznim citološkim tehnikama, primjerice fluorescencijskom *in situ* hibridizacijom sa sondama koje se specifično vežu za centromerna područja kromosoma (41, 58).

Oralne epitelne stanice predstavljaju željenu ciljnu stanicu za utvrđivanje ranih genotoksičnih događaja izazvanih kancerogenim agensima koji ulaze u tijelo udisanjem i gutanjem te za one koji se primjenjuju u terapijske svrhe unutar usne šupljine. Mikronukleus test na epitelnim stanicama usne šupljine jedan je od najmanje invazivnih, kojim se mogu

mjeriti oštećenja DNK kod ljudi. Oralni epitel održava se kontinuiranom obnovom stanica pri čemu nove stanice proizvedene mitozom u bazalnom sloju migriraju prema površini kako bi zamijenile one odbačene. Bazalni sloj sadrži matične stanice u kojima se tijekom stanične diobe genetska oštećenja (lom ili gubitak kromosoma) mogu očitovati u vidu mikronukleusa. Neke od tih stanica mogu prijeći u stanice s kondenziranim kromatinom, fragmentiranom jezgrom (karioreksa), piknozom jezgre ili potpuno izgubiti svoj nuklearni materijal (karioliza ili "duh" stanice). U rijetkim slučajevima, neke stanice mogu biti zaustavljene u binuklaeornoj fazi ili mogu iskazati jezgrine pupove (Slika 2). Više čimbenika utječe na brojnost mikronukleusa u oralnim epitelnim stanicama: (a) vrijeme prikupljanja uzorka, (b) metoda prikupljanja uzorka, (c) metoda fiksacije i bojanja uzorka, (d) veličina i izbor uzorka stanica, (e) način analize preparata i (f) druge anomalije jezgre u normalnim i promijenjenim stanicama. Odljuštene epitelne stanice oralne sluznice mogu se prikupiti metalnim ili drvenim lopaticama ili posebno dizajniranim citološkim četkicama. Nakon fiksacije na predmetnom stakalcu boje se specifičnim bojama za DNK (propidimum jodid, akridin-narančasto, Giemsa). Mikronukleus test na epitelnim stanicama usne šupljine lako je izvediv zbog jednostavne dostupnosti stanica do kojih se dolazi neinvazivnim načinom, a prikupljanje je lako ponovljivo. Najčešće korišteni kriterij za odabir stanica jest onaj po Tolbert-u i suradnicima (59) pri čemu se uzimaju u obzir sljedeći parametri: (a) stanice moraju biti u ravnini s fokusom, (b) stanice moraju biti netaknute citoplazme, (c) stanice se mogu malo ili nimalo preklapati sa susjednim stanicama, (d) preparat smije imati malo ili nimalo nečistoća, (e) jezgra stanica mora biti netaknuta, glatka i ovalna. Kako bi se mikronukleusna tvorba potvrdila, ona mora zadovoljavati sljedeće kriterije: (a) mora biti manja od trećine promjera jezgre, ali dovoljno velika i raspoznatljiva oblika, (b) boja mikronukleusa mora intenzitetom odgovarati jezgri, (c) tekstura mikronukleusa mora biti slična jezgri, (d) mikronukleusna tvorba mora biti na istoj žarišnoj ravnini kao jezgra i (e) mikronukleusna tvorba ne smije se preklapati s jezgrom. Tolbert i suradnici (59) preporučuju dodatnu analizu najmanje 1000 stanica ako je manje od 5 mikronukleusa zabilježeno nakon prebrojavanja 1000 stanica.



Slika 2. Jezgrine anomalije: (a) mikronukleus, (b) binuklearna stanica, (c) most, (d) jezgrin pup, (e) karioliza, (f) karioreksa.

Broj radova koji su u svojoj metodologiji koristili ovaj test uvelike se povećao u zadnjem desetljeću, što se može objasniti relativno jednostavnom tehničkom izvedbom i mogućnošću testiranja velikog broja različitih toksičnih tvari. U dentalnoj medicini se do sada *in vivo* mikronukleus test na epitelnim stanicama usne šupljine koristio u ispitivanju utjecaja sredstava za ispiranje usne šupljine (60, 61), dentalnih cemenata (62), RTG zračenja (63, 64) i ortodontskih naprava (65). Nekoliko studija ovim testom promatrale su i utjecaj kompozitnih materijala na stanice oralne sluznice (53, 66, 67).

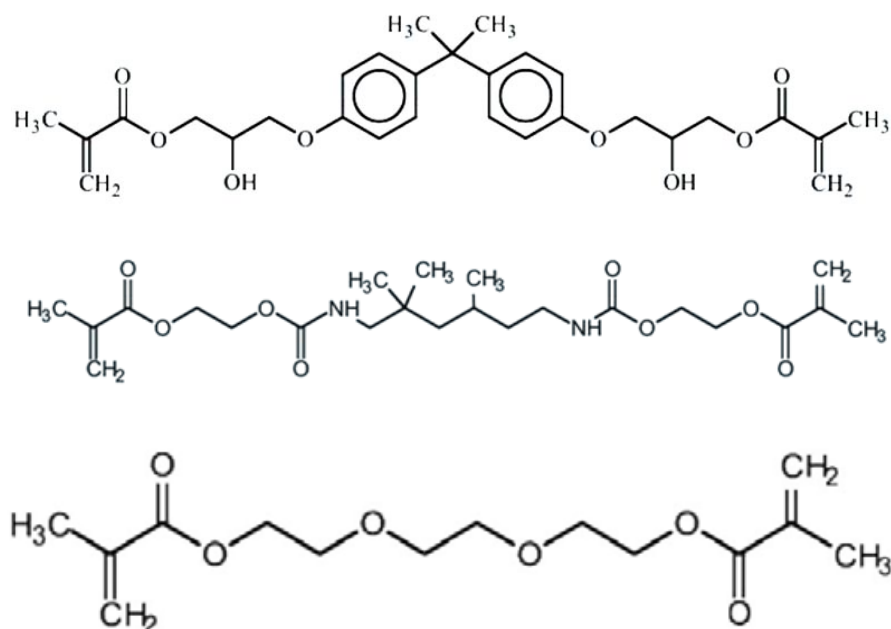
1.3. Kompozitni materijal

Kompozitni materijal umjetno je proizveden od dvije ili više komponenti, međusobno povezanih međuatomskom ili molekularnom vezom sa zajedničkim svojstvima mnogo boljim nego što je to suma njegovih konstitutivnih komponenti (68). Dentalni kompozitni materijal sastoji se od četiri glavne supstance: organskog matriksa, anorganskog punila, vezujućeg međusredstva (69), inicijatora i akceleratora (70). Brojne druge komponente također pridonose mehaničkim i estetskim svojstvima materijala. Klinička primjena kompozitnog materijala ovisi o karakteru i udjelu osnovnih komponenti što pruža mogućnost da se primijeni u različite svrhe (71).

Postotak i tip monomera unutar smolaste organske matrice utječe na polimerizacijsko skupljanje, viskoznost i apsorpciju vode. Organska matrica današnjih kompozitnih materijala primarno se sastoji od monomera bisfenol-A-glicidil-dimetakrilata (Bis-GMA) i uretan dimetakrilata (UDMA) (72), komonomera etilenglikol dimetakrilata (EGDMA), dietilenglikol-dimetakrilata (DEGDMA), trietilen-glikol-dimetakrilata (TEGDMA) (Slika 3) (73). Bis-GMA ima veću molekularnu masu u odnosu na tradicionalne metilmetakrilatne materijale (512,59 naspram 86 Daltona) (74). Zbog značajki u njenoj kemijskoj strukturi poput reaktivne hidroksilne skupine koja čini hidrogene veze, stvara jače, tvrđe smole, manje nestabilne s manjim polimerizacijskim skupljanjem, više viskozne te brže otvrdnjavajuće. TEGDMA je fleksibilni, niskomolekularni monomer koji se dodaje Bis-GMA kako bi se poboljšale radne karakteristike smole, ali istovremeno povećava polimerizacijsko skupljanje (72) i apsorpciju vode (75). UDMA se koristi kao alternativa Bis-GMA jer smanjuje viskoznost i povećava udio punila u materijalu. Vlačna i tlačna čvrstoća te modul elastičnosti materijala koji sadrže UDMA su bolji u odnosu na kompozite temeljene na Bis-GMA (76). Prema tome, specifična kompozicija monomera unutar kompozitnog materijala utječe na ravnotežu njegovih svojstava.

Čestice anorganskog punila dodaju se kako bi poboljšale fizička svojstva kompozitnog materijala. One čine veći težinski i volumni udio kompozitnog materijala, poboljšavaju snagu i modul elastičnosti, otpornost na trošenje, rubnu adaptaciju i osiguravaju radioopaknost materijala. Punilo isto tako može smanjiti nepoželjna svojstva poput apsorpcije vode, polimerizacijske kontrakcije, stvaranja topline pri polimerizaciji i koeficijenta termalne ekspanzije (68, 77, 78). Najčešća punila su kvarc, koloidni silicijev dioksid, borosilikatno

staklo, stroncij ili cink, cirkonij i litij-aluminij, itrijev i iterbijev trifluorid (68), s česticama veličine 0.1 μm do 100 μm (79). Najčešće korištena klasifikacija kompozitnih materijala temelji se na veličini čestica. Mikropunjeni kompoziti sadrže čestice veličine 0.01 μm do 0.04 μm . Hibridni kompoziti sadrže čestice veličine 0.01 μm to 6 μm , a mikrohibridi od 0.01 μm do 3.5 μm s prosječnom veličinom od 0.6 μm . Manje čestice punila poboljšavaju poliranost i površinsku teksturu tako što dopuštaju bolju zbijenost među česticama materijala (80). Danas se u procesu proizvodnje kompozitnih materijala koriste i nanočestice veličine od 0,1 nm do 100 nm. Ove čestice dodaju se mikropunjenim i hibridnim kompozitima kako bi im se poboljšala snaga savitljivosti i površinska tvrdoća (81).



Slika 3. Kemijska struktura kompozitnih monomera: Bis-GMA, UDMA, TEGDMA. Preuzeto iz Reference (13).

Veza između organskih i anorganskih komponenti mora biti jaka i izdržljiva. Smola je hidrofobna dok je staklo temeljeno na siliciju hidrofilno, stoga smola i staklo nemaju prirodni afinitet za međusobnim spajanjem. Vezujuće sredstvo, obično silan, koristi se kako bi se omogućila kemijska veza između monomera i čestica punila (79). Silani su organski silikoni koji sadrže vinilne skupine koje su sposobne reagirati sa smolastim matriksom i metoksi

grupama, koje pri tome hidroliziraju stvarajući silanske skupine koje reagiraju s površinom čestica. Ovim mehanizmom vezujuće sredstvo se svezuje međusobno te za monomer i čestice anorganskog punila. Svezivanje smanjuje apsorpciju vode i hidrolitičku degradaciju kompozita (82).

Inicijatori - akceleratori dopuštaju polimerizaciju kompozita tako da se polimeriziraju radikalnom polimerizacijom u kojoj se neizreagirani metakrilatni monomeri vežu za slobodna radikalska mjesta na molekuli. Ova reakcija može biti izazvana toplinom, kemijski i svjetlosno. Kamforkinon i fenil propandion najčešće su korišteni svjetlosni inicijatori, 2-dimetil metakrilat akcelerator, a hidroksitoluen za prevenciju preuranjene polimerizacije (77).

Kako u usnoj šupljini vladaju promjenjivi uvjeti, kompozitni materijali moraju zadovoljiti tvrdoćom, savojnom, rasteznom i torzijskom čvrstoćom, elastičnošću, trošenjem, toplinskom i električnom provodnosti, polimerizacijskim skupljanjem i toplinskim širenjem. Svojstva kompozitnih materijala blisko su povezana s organskom smolastom matricom te količinom i vrstom punila. Na stupanj polimerizacije utječe vrsta i koncentracija fotoinicijatora te vrsta i veličina čestica punila. Tijekom polimerizacije dolazi do 0,8 - 5,65 % skupljanja kompozitnog materijala (83, 84). Skupljanje nastaje zbog pretvorbe iz manje gusto raspoređenih van der Waalsovih i dvovalentnih sila u usko povezane van der Waalsove i kovalentne sile unutar smolaste matrice (72). Kompoziti apsorbiraju vodu iz okoliša usne šupljine što dovodi do smekšanja smolaste matrice i degradacije materijala. Što je veći udio smole, više se upija vode te je veća ekspanzija materijala. Apsorpcija vode doprinosi smanjenju snage, tvrdoće i otpornost na trošenje (81). Apsorpcija vode započne 15 minuta nakon postavljanja kompozitnog ispuna s maksimumom oko 4 dana, dok je većini kompozita potrebno oko 7 dana da se uspostavi ravnoteža. Topljivost kompozitnog materijala u vodi varira između 0,01 do 0,06 mg/cm². Neadekvatna polimerizacija ima utjecaj na veću apsorpciju vode i topljivost, što se eventualno može klinički manifestirati ranom nestabilnosti kompozitne boje. Klinička istraživanja pokazala su superiornost kompozitnih materijala u restauraciji prednjih zubi gdje je bitna estetika, a okluzalne sile niske. Loša karakteristika kompozita jest gubitak površine koja proizlazi iz kombinacije abrazivnog trošenja žvakanjem i četkanjem te erozivnog trošenja zbog degradacije kompozita u oralnom okolišu. Stupanj trošenja veže se uz veličinu čestica i veličinu prostora među česticama (81, 85).

U ovome radu korištena su dva kompozitna materijala, nano-hibridni i samoadherirajući tekući kompozitni materijal. Nanopunjeni i nano-hibridni kompozitni

materijali javili su se ne tako davno na tržištu dentalnih proizvoda s ciljem da predstave generaciju materijala s dobrom adhezijom i mogućnošću poliranja. Nanopunjeni kompoziti sadrže čestice nano veličine, dok nano-hibridi kombiniraju nano i konvencionalno punilo tako da karakteristikama odgovaraju mikrohibridima (85). Tekuće kompozitne materijale karakterizira niska viskoznost monomera, što ih čini više tekućim nego konvencionalne kompozitne materijale. Postotak anorganskog punila je nizak te su im dodani modifikatori kako bi se olakšao rad. Glavne prednosti tekućih kompozitnih materijala su: (a) visoka mogućnost vlaženja koja osigurava prodor materijala u nepravilnosti zubne površine, (b) sposobnost da formira slojeve minimalne debljine, (c) visoki stupanj elastičnosti, tako da je manja vjerojatnost da će biti izbačen iz visoko stresnog područja (klasa V), (d) radioopaknost i (e) dostupnost u velikom broju boja. Nedostaci su velika kontrakcija prilikom polimerizacije te slabija mehanička svojstva (86). Kompobond je novi kompozitni materijala koji u sebi koristi prednosti samojetkajući dentinskih adheziva i nanopunjenih kompozita. Karakterizira ga mogućnost samostalnog prijanjanja za tvrda zubna tkiva. Prednosti ovih kompozita su jednostavnost rada jer ne traže prethodni tretman tvrdih zubnih tkiva jetkanjem i aplikacijom adhezivnog sustava čime se eliminiraju pogreške, olakšava rad i povećava dugovječnost restauracije (87).

1.4. Biološka razgradnja kompozitnih materijala

Biološka razgradnja definira se kao "postupni raspad materijala koji je posredovao u određenoj biološkoj aktivnosti" (88). Do raspada polimerne matrice kompozitnog materijala dolazi cijepanjem lanaca na oligomere koji se dalje mogu cijepati do monomera. Otpuštanje tvari iz polimerne mreže moguće je tako da se monomer i/ili aditivi otpuste djelovanjem otapala tijekom postavljanja ispuna i njegove polimerizacije ili se topljive komponente otpuste s vremenom zbog raspada ili erozije (73).

Brojni su razlozi otpuštanja nevezanih tvari iz polimeriziranog kompozita, poput kemijskog sastava kompozita, stupnja konverzije monomera u polimer, intenziteta i vrste polimerizacijskog svjetla, ukupne energetske gustoće i vremena polimerizacije, obrade površine ispuna, sastava i vrste otapala te veličine i kemijskog sastava otpuštene tvari (89, 90). Slobodnom radikalskom polimerizacijom dimetakrilatni monomeri stvaraju polimernu mrežu. Za većinu kompozita stupanj konverzije monomera u polimer nakon polimerizacije halogenom ili diodnim polimerizatorom koji emitira plavo svjetlo (LED) varira između 55% do 75% (91). Nedovoljna polimerizacija materijala rezultira trošenjem i većom razgradnjom ispuna na rubovima, smanjenom čvrstoćom veze između zuba i restauracije, smanjenom tvrdoćom i većom citotoksičnošću (92). Nekoliko je istraživačkih skupina u svojim radovima procjenjivalo povezanost stupnja konverzije i topljivosti kompozita te je pronašlo negativnu korelaciju među njima (70, 93). Veliku količinu monomera i/ili produkata razgradnje može otpustiti i neodstranjeni površinski sloj inhibiran kisikom čiji je stupanj konverzije između 25% i 35% (89, 91, 94).

U usnoj šupljini, kompozitni materijali mogu biti razoreni brojnim mehanizmima, uključujući fizičke (trošenje žvakanjem), kemijske (hidroliza, enzimski kataliza, interakcijom s hranom i lijekovima, bakterijska aktivnost) i termičke procese (73, 94).

Kompozitni ispuni u usnoj šupljini podložni su promjenama temperature, sastava i pH slin te mehaničkoj manipulaciji žvakanjem ili oralnim parafunkcijama. Na mehaničko trošenje mogu utjecati brojni faktori poput žvačnog opterećenja, okluzalnog kontakta, vrste hrane, procesa polimerizacije i poliranja (90). Svakodnevno uzimanje hrane i pića mijenja intraoralnu temperaturu. Promjena temperature čini neprijateljsko okruženje za kompozitne materijale koji imaju viši koeficijent termalne ekspanzije u odnosu na tvrda zubna tkiva (30-40 ppm/°C prema 10 ppm/°C). Stalne promjene temperature dovode do površinskog stresa

koji vodi popuštanju i raspadu materijala (95, 96). Dnevni unos hrane i pića također može utjecati na dentalne materijale svojim izravnim učinkom ili sposobnošću da mijenjaju intraoralnu vrijednost pH (95).

U usnoj šupljini može doći do interakcije između oralnih mikroorganizama i polimerne mreže (97). Bakterije nakon što nasele površinu kompozitnog ispuna svojim kiselim metaboličkim produktima razaraju površinu materijala tako da postaje hrapava i porozna (95).

Glavni sastojak sline je voda, a kako je kompozit polaran ona jednostavno ulazi u polimernu mrežu i olakšava difuziju monomera i/ili drugih sastojaka iz materijala u radnu okolinu (95). Potrebno je otprilike oko mjesec do dva mjeseca kako bi se dentalni polimerni materijal u vodenom okruženju zasatio (97). Soderholm i sur. (98) su u svom istraživanju, ispitali fizička svojstva smola temeljenih na Bis-GMA, TEGDMA, UDMA i Bis-EMA (bisfenol-A-etilmetakrilat) i dokazali kako smole temeljene na TEGDMA čine najgušće, visoko fleksibilne polimerne mreže koje upijaju najveću količinu vode i oslobađaju najmanju količinu neizreagiranih monomera. Smole temeljene na monomerima UDMA i Bis-EMA stvaraju kruće mreže u odnosu na TEGDMA smole, koje apsorbiraju manje vode i otpuštaju više neizreagiranog monomera. Bis-GMA stvara najkruće mreže koje apsorbiraju manje vode, ali više od onih temeljenih na UDMA i Bis-EMA. Razgradnja polimera unutar vodenog medija odvija se (a) pasivnom hidrolizom i (b) enzimskom razgradnjom (95). Kompoziti su skloni ne samo ispiranju neizreagiranih metakrilata u vodi, već i hidrolitičkoj razgradnji polimeriziranih. Hidrolitička razgradnja uključuje cijepanje C-O veza između acilne skupine i kisika što rezultira stvaranjem pora kroz koje se razgrađeni produkti otpuštaju (99). Ovaj proces dodatno kataliziraju enzimi, posebice esteraze (100, 101). Esteraze poput acetilkolinesteraze, svinjske jetrene esteraze, kolesterola esteraze, pseudokolinske esteraze i gušteričine lipaze sposobne su katalizirati hidrolizu monomera (80, 102). Esteraze mogu hidrolizirati kompozite temeljene na Bis-GMA i TEGDMA do metakrilne kiseline (MAA), bis[(hidroksipropoksi)fenil]propana (Bis-HPPP), trieten-glikol metakrilata (TEGDMA) i etoksiliranog bisfenola A (E-BPA) (103-106). Ljudska slina sadrži enzime sposobne razgraditi kompozitni materijal što je veoma važno kod njihove primjene *in vivo*. Razina aktivnosti esteraze otkrivene u ljudskoj slini usporediva je s onima koje se koriste u *ex vivo* istraživanjima (kolesterol-esteraza i pseudokolin esteraza) (101, 104, 106). Kada se kompoziti temeljeni na Bis-GMA/TEGDMA pohrane u medij s esterazom, dolazi do većeg smanjenja mase usporedno s onima pohranjenim u samom puferu (105, 107). Enzimi iz ljudske sline

sposobni su razgraditi Bis-GMA i TEGDMA monomere kroz 24 sata (108). Omekšavanje kopolimera Bis-GMA/TEGDMA uzrokuje značajan gubitak otpornosti na trošenje (109). Nakon što se površinski sloj omekša procesom hidrolize, mehaničkim procesima se on lagano uklanja, a površina izlaže ponovnom napadu enzima (110). Istraživanja pokazuju kako dimetakrilati TEGDMA i UDMA, pokazuju veću sklonost hidrolizi u odnosu na dugolančani metakrilat Bis-GMA (111). Kod izloženosti kolesterol-esterazi, uretanom izmijenjeni monomerni sustavi temeljeni na Bis-GMA/TEGDMA pokazuju povećanu kemijsku stabilnosti u odnosu na tradicionalne Bis-GMA/TEGDMA sustave (107). Količina čestica punila također može utjecati na proces razgradnje. Ako se manje i više punjeni kompozitni materijali ostave u kolesterolskoj esterazi, otpuštanje produkata razgradnje (Bis-HPPP i TEGDMA) značajno je više u prvih osam dana kod manje punjenog materijala. Suprotan učinak zabilježen je između 8 i 16 dana, kada je više punjeni kompozitni materijal pokazao značajnu površinsku razgradnju organske matrice (112). Neka druga istraživanja pokazala su kod tretiranja kompozita kolesterol esterazom kako više punjeni pokazuju povećanu stabilnosti tijekom vremena u odnosu na manje punjene. Više punjeni kompoziti ispiru manje neizreagirano monomera (TEGDMA) i međuproizvoda biološke razgradnje (MAA i Bis-HPPP) (113).

Otapala koja se koriste u istraživanjima količine otpuštenih kompozitnih sastojaka mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: (a) voda ili na vodi temeljena otapala, poput staničnih medija, ljudske ili umjetne sline i vodenih pufera te (b) organska otapala, poput etanola i metanola, uključujući i njihove vodene otopine. U većini slučajeva, otpuštanje u organskim otapalima bilo je veće nego u vodi ili vodenim otopinama (74).

Prema različitim studijama, HEMA je monomer koji se najviše otpušta, nakon toga TEGDMA, UDMA i Bis-GMA. HEMA je mala hidrofilna molekula, niske molekularne težine (130,14 Da) koja se više otpušta u organskim otapalima nego u vodi. Bis-GMA ima velike dimenzije, nisku topivost i veliku molekularnu masu (512,59 Da). U organskim otapalima Bis-GMA se otpušta između 0,4% težine i 1,5% tež., dok se TEGDMA (286,32 Da) otpušta između 0,04% tež. i 2,3% tež. Značajno manje Bis-GMA se otpušta u vodenim medijima (0,03-0,07% tež.), ali se zato više otpuštaju hidrofilni monomeri poput TEGDMA (do 0,4% tež.). Gledajući ih sve zajedno, u vodenom mediju otpusti se oko 2% težine od ukupne mase organske matrice (74, 90).

Kompozitni materijali mogu osloboditi ione fluora, stroncija i aluminija. Nađene koncentracije iona F^- i Sr^{2+} su preniske da bi bile citotoksične. Nasuprot tome, pronađene su toksične koncentracije iona Cu^{2+} , Al^{3+} i Fe^{2+} (95).

Količina otpuštenih komponenti iz kompozitnog materijala može biti otkrivena pomoću tekućinske kromatografije visoke razlučivosti (114, 115), spregnutih sustava tekućinske kromatografije i spektrometrije mase (116, 117) i plinske kromatografije i spektrometrije mase (118, 119), ultraljubičastog i infracrvenog zračenja (91).

U većini istraživanja potvrđeno je najveće otpuštanje unutar prvih sati ili dana (120-124). Međutim, dobiveni se rezultati moraju kritički promatrati s obzirom na postojanje (a) pozitivne korelacije između količine otpuštene tvari i volumena otapala te (b) mogućnosti uspostave ravnoteže između koncentracije monomera u otapalu i unutar kompozitnog bloka nakon čega više ne dolazi do otpuštanja novih količina topljivih tvari (74). U nekoliko studija pratilo se dugoročno otpuštanje monomera (116, 125). Polydorou i sur. (116) testirali su otpuštanje monomera u 75% etanolu nakon 24 sata, 7 dana, 28 dana i jedne godine. Učinak skladištenja na otpuštanje monomera razlikovao se, tako je otpuštanje TEGDMA značajno smanjeno nakon 28 dana i 1 godine. Količina otpuštene Bis-GMA bila je ista u sva četiri vremena testiranja, čak i nakon 1 godine.

1.5. Citotoksičnost i genotoksičnost kompozitnih materijala

Kompozitni materijali mogu otpustiti monomere, dodatke i čestice punila za vrijeme i nakon postavljanja ispuna. U kliničkim uvjetima kompoziti nikada nisu u potpunosti polimerizirani (74, 126). Monomeri mogu biti otpušteni iz polimera djelovanjem mehaničkog stresa, žvakanjem i erozijom. Jednako, starenje kompozita dovodi do stvaranja poroznosti u materijalu, a ta mjesta su kasnije podložna apsorpciji vode i kemijsko/enzimatskoj razgradnji (74). Polimeri mogu sadržavati esterske skupine na koje mogu djelovati esteraze iz sline dovodeći do raspada kompozita i otpuštanja produkata. Razgradnja može biti potaknuta i mikroorganizmima, posebno u rubnim pukotinama (127). Otpušteni monomeri i ostali dodatci iz kompozitnog materijala potencijalno su opasni i štetni na lokalnoj i sistemske razini (128-131). Četiri su glavna puta sistemskog unosa kemijskih tvari oslobođenih iz kompozitnih materijala: (a) ingestijom otpuštenih komponenti i apsorpcijom u gastro-interstinalnom sustavu, (b) difuzijom u pulpu kroz dentinske tubule (74, 120, 132), (c) unosom hlapljivih tvari preko pluća (74, 133) i (d) direktno kroz oralnu mukozu (54, 74). Najbliža i najlakša meta monomera i njihovih metabolita jesu stanice pulpe, gingive i oralne mukoze. Genomska DNK molekula glavni je cilj djelovanja otpuštenih komponenti iz kompozita. Toksičnost kemijskih spojeva u interakciji sa živim stanicama ovisi o njihovoj razgradnji i/ili metaboličkoj preobrazbi (127). Posljednja dva desetljeća u brojnim studijama dokazano je alergeno (128, 134), citotoksično (135-139), genotoksično (138-141), mutageno (142, 143) i estrogeno djelovanje (144-147) kompozita i njihovih komponenti. Većina istraživanja promatrala je učinke kompozita na osnovne stanične funkcije kao što su stanična proliferacija, inhibicija enzimske aktivnosti, poremećaj stanične morfologije, cjelovitost membrane, stanični metabolizam i vijabilnost stanica. Važnost utvrđivanja oblika stanične smrti u procjeni toksičnosti dentalnih materijala istaknuta je u više studija (148, 149). Stanice umrle apoptozom uklanjaju se fagocitozom uz minimalni upalni odgovor što je u suprotnosti s upalom i ozljedom tkiva koju uzrokuje nekroza stanice (90).

Citotoksičnost i genotoksičnost kompozita ovisi o kemijskom sastavu smolaste matrice. U literaturi se kao najčešće otpušteni monomer spominje HEMA, nakon toga TEGDMA, UDMA i Bis-GMA (74). Kompoziti mogu otpustiti kemijske spojeve koji djeluju jako (Bis-GMA, UDMA, TEGDMA) ili srednje (HEMA) citotoksično, dok su njihovi proizvodi biorazgradnje (metakrilne kiseline) najmanje citotoksični. Urcan i sur. (150) pokazali su da danas najčešće korišteni kompozitni monomeri Bis-GMA, UDMA, TEGDMA i HEMA mogu

izazvati dvostruke lomove DNK u ljudskim gingivnim fibroblastima, tako da se citotoksičnost monomera smanjuje od Bis-GMA-e do najmanje citotoksične HEMA-e (Bis-GMA>UDMA>TEGDMA>HEMA). Ratanasathien i sur. (151) dobili su iste rezultate MTT testom na fibroblastima miševa. HEMA je molekula niske molekulske težine i visoke hidrofilnosti koja lako može difundirati kroz dentin i tako utjecati na odontoblaste (120). Prema Spagnuolo i sur. (152) oslobađanje HEMA iz polimerizanih adheziva varira od 1,5 mmol/l do 8 mmol/l. U odnosu na druge monomere HEMA je najmanje toksična, a njena citotoksičnost ovisna je o koncentraciji i vremenu. HEMA inducira citotoksičnost koja se povezuje s oksidativnim stresom, pojačanom proizvodnjom ROS (reaktivnih kisikovih spojeva) i oksidacijom unutarstaničnog glutationa (90). U stanicama humanih fibroblasta gingive HEMA izaziva nekrozu (152). U smislu genotoksičnosti, HEMA ima klastogeni učinak te povećava broj mikronukleusa (153), a isto tako povećava i DNK migraciju komet testom u stanicama žlijezda slinovnica i limfocitima (138, 139). Kod dugotrajnog djelovanja HEMA može prekinuti sintezu normalnog kolagena I te značajno omesti normalnu diferencijaciju fibroblasta pulpe u odontoblaste (90). HEMA otpuštena iz kompozitnog materijala može se raspasti do metakrilatne kiseline. Dokazano je citotoksično i genotoksično djelovanje oba spoja na humanim gingivnim fibroblastima. Obje, HEMA i MAA uzrokuju DNK oštećenje koje rezultira značajnom fragmentacijom DNK u alkalnom komet testu. Jednako je dokazano da uzrokuju dvostruke lomove koji ako se ne poprave mogu rezultirati kromosomom preraspodjelom i delecijom, što dovodi do fuzije gena. Osim kromosomske pregradnje, dvostruki lomovi mogu dovesti do inaktivacije tumor-supresorskih gena te aktivacije protoonkogena (127). Kompoziti temeljeni na UDMA apsorbiraju znatno više vode nego oni temeljeni na Bis-GMA. Apsorpcija vodenog otapala može uzrokovati pasivnu i enzimsku hidrolitičku degradaciju polimerne osnove (76). Taj proces ne samo da mijenja mehaničke osobine polimera već potiče oslobađanje nevezanih monomera te njihovu daljnju razgradnju u usnoj šupljini. Pitanje vezano uz biološku sigurnost UDMA je opravdano jer je dosadašnjim istraživanjima dokazano njeno cito/genotoksično djelovanje. UDMA mijenja stanični ciklus u stanicama epidermalnog oralnog karcinoma i fibroblastima ljudske kože (154). Također, umanjuje funkciju stanica pulpe u štakora (155). Dokazano je u više studija kako UDMA izaziva staničnu smrt (76, 156-158). Postoje dvije mogućnosti koje bi mogle izazvati apoptozu u stanicama tretiranim s UDMA-om: (a) UDMA može djelovati kao genotoksični kancerogen koji izaziva DNK oštećenja, a što kulminira indukcijom smrti stanice, dok (b) drugi put slijediti razgradnju UDMA što vodi mitohondrijskom poremećaju stanice (76). Schweikl i sur. (159) Ames testom nisu dokazali mutagenu aktivnost UDMA, ali

jesu njenu sposobnost da stvara mikronukleus (153). Keinsasser i sur. (138, 139) u dvjema studijama pokazali su da UDMA inducira oštećenja DNK komet testom na humanim limfocitima i stanicama žlijezda slinovnica. Na stanicama ovarija kineskog hrčka dokazano je cito/genotoksično djelovanje monomera UDMA i TEGDMA, pojedinačno i u kombinaciji (160). TEGDMA izaziva citotoksičan učinak ovisan o vremenu i koncentraciji na različitim staničnim linijama. Metabolički proizvodi TEGDMA, poput epoksi spoja 2,3-epoksimetakrine kiseline (2,3-EMA) uzrokuju slične citotoksične učinke, što doprinosi citotoksičnosti TEGDMA-e (90). Pri nižim koncentracijama u kulturama tretiranim ovim monomerom prevladava programirana stanična smrt (apoptoza), dok je nekroza izražena kod viših koncentracija (161, 162). Samuelsen i sur. (161) su pokazali da je apoptoza stanica žlijezda slinovnica povezana s oksidacijskim stresom uslijed oslobađanja reaktivnih kisikovih spojeva. Na humanim fibroblastima gingive TEGDMA uzrokuje teške kemijsko-biološke interakcije s posljedičnom inhibicijom rasta stanice (163). TEGDMA ima genotoksičan učinak u subtoksičnim koncentracijama. Inducira oštećenja DNK i stvaranje mikronukleusa *ex vivo* (143, 153), potiče oštećenje DNK u stanicama žlijezda slinovnica i limfocima, što je dokazano komet testom u nekoliko studija (138, 139). Dugotrajna izloženost niskim koncentracijama TEGDMA ne samo da utječe na imunološki odgovor, već i na fiziološke procese unutar stanice. Ona utječe na proces diferencijacije fibroblasta pulpe u odontoblaste te njihov proces mineralizacije (164). Bis-GMA pokazuje citotoksičan učinak ovisan o vremenu i koncentraciji na humanim fibroblastima pulpe i gingive. (90, 137, 158). Izaziva brz i intenzivan pad reduciranog glutationa u fibroblastima gingive s indukcijom apoptoze (137). Bis-GMA može poremetiti normalnu diferencijaciju fibroblasta pulpe (123, 164), te utječe na migraciju ljudskih fibroblasta gingive (165).

Vrsta punila isto može djelovati na toksičnost kompozita. Više punjeni kompoziti uzrokuju manje citotoksičan učinak zbog manjeg sadržaja topljivih komponenti (166). Silva i sur. (31) gledali su citotoksičan učinak kompozita temeljenih na cirkonijevom hidroksilapatitu kombinirajući *ex vivo* i *in vivo* istraživanje te zaključili kako nisu citotoksični i da ne uzrokuju iritacije na koži. Nekoliko studija pratilo je potencijalne negativne biološke učinke kamforkinona te su dokazali kako je citotoksičan na ljudskim stanicama submandibularnog kanala te fibroblastima gingive i pulpe (90).

Studije koje su pratile razliku u cito i genotoksičnom učinku kompozita i njihovih tekućih inačica daju kontradiktorne rezultate. U većini istraživanja dokazana je viša toksičnost tekućih u odnosu na krute kompozitne materijale (13, 156). Međutim, objavljeni su i suprotni

rezultati koji su izvijestili kako se više TEGDMA i Bis-GMA otpušta iz Tetric EvoCeram u odnosu njegovu tekuću inačicu Tetric EvoFlow (117).

Citotoksičnost kompozita također ovisi o vrsti i intenzitetu lampe, vremenu polimerizacije i udaljenosti materijala od izvora svjetlosti. Yap i sur. (167) pokazali su kako je polimerizacija kompozita i njihova citotoksičnost ovisna o korištenju LED fotopolimerizatora. Kompoziti polimerizirani LED lampom pokazali su višu toksičnost od onih polimeriziranih standardnim halogenom fotopolimerizatorom. Isto su potvrdili Ergun i sur. (92), koji su ispitivali toksičnost halogenih, LED i plazma polimerizatora te zaključili kako citotoksičnost raste od najmanje toksičnog halogenog svjetla preko LED do najviše toksičnog plazma fotopolimerizatora. Citotoksičnost materijala raste i s intenzitetom lampe. Kompoziti polimerizirani visokim intenzitetom lampe su znatno toksičniji u odnosu na one polimerizirane postupnim porastom (SOF) i/ili niskim intenzitetom (48). Vrijeme polimerizacije je u negativnoj korelaciji s toksičnošću materijala. Što je kraće vrijeme polimerizacije (15 i 20 sekundi) viša je toksičnost u odnosu na vremenski dužu polimerizaciju (30 i 60 sekundi) (13, 48). Razmak između vrha polimerizacijske lampe i kompozitne površine mora biti što manji, kako raste razmak među njima raste i citotoksičnost kompozitnog materijala (92).

1.6. Svrha istraživanja

Istraživanje je bilo usmjereno na ispitivanje utjecaja suvremenih estetskih restaurativnih materijala na stanice usne šupljine koje mogu biti izložene djelovanju zaostatnih monomera koji se ispiru nakon postavljanja ispuna.

Glavna svrha ovog istraživanja bila je procjena u kojoj su mjeri suvremeni kompozitni materijali biokompatibilni i sigurni za kliničku uporabu primjenom različitih pristupa ispitivanju (humane stanice usne šupljine u uvjetima *ex vivo* i *in vivo*) i različitih citotoksičnih (diferencijalno bojanje) i genotoksičnih (mikornukleus i komet) testova. U uvjetima *ex vivo*, na stanicama primarne kulture gingive/pulpe pratio se citotoksični i genotoksični potencijal ovisno o koncentraciji korištenog materijala. Relevantnost rezultata dobivenih na kulturama stanica dodatno se provjerila istraživanjem u uvjetima *in vivo*. Primjenom testova genotoksičnosti pratio se utjecaj istih materijala na epitelne stanice gingive ovisno o vremenu koje je prošlo od postavljanja ispuna.

Radne hipoteze:

- kompozitni materijali polimeriziran prema uputama proizvođača ne bi trebao pokazati citotoksičan potencijal dok je moguće očekivati ograničenu genotoksičnost,
- genotoksičan učinak kompozitnih materijala najveći je u prvom tjednu nakon postavljanja ispuna kada je ispiranje zaostatnih monomera najintenzivnije,
- tekući kompozitni materijal koji u sastavu sadrži adheziv i jetkajuću otopinu više je citotoksičan i genotoksičan na stanice pulpe i gingive,
- kompozitni materijali imaju više genotoksičan učinak na stanice usne šupljine u uvjetima *ex vivo* nego *in vivo*.

2. MATERIJALI I METODE

Ovo je istraživanje provedeno u dva dijela. Prvi dio istraživanja bio je usmjeren na ispitivanje citotoksičnog i genotoksičnog učinka kompozitnih materijala na humanim fibroblastima, izoliranim iz pulpe i gingive u uvjetima *ex vivo*, ovisno o koncentraciji korištenog materijala (20 mg/ml, 40 mg/ml). Relevantnost rezultata dobivenih ispitivanjima na kulturi stanica dodatno se provjerila istraživanjem u uvjetima *in vivo*. Primjenom testova genotoksičnosti, komet i mikronukleus test, pratio se utjecaj istih materijala na epitelne stanice gingive ovisno o vremenu koje je prošlo od postavljanja ispuna.

2.1. Ispitivanje citotoksičnosti i genotoksičnosti kompozitnih materijala u uvjetima *ex vivo*

2.1.1. Materijali

U istraživanju su se koristila dva kompozitna materijala, nano-hibridni kompozitni materijal Kalore (GC, Tokio, Japan; LOT 0906031; boja A2) i samoadherirajući tekući kompozitni materijal Vertise Flow (Kerr Corporation, Orange, CA, SAD; LOT 3439842; boja A2). Kalore u sebi sadrži modificirani uretan dimetakrilatni monomer DX 511 iz Duponta. Vertise Flow je tekući kompozit koji sadrži adhezivni monomer, glicerolfosfat dimetakrilat (GPDM), koji je sposoban vezati se za zubno tkivo mehaničkim i kemijskim putem. Ovaj kompozitni materijal koristi se kao podloga ili za male restauracije te ne traži prethodnu obradu dentina i cakline jetkanjem i nanošenjem adhezivnog sustava. Vertise Flow u tekućem stanju ima niski pH ~ 1,9, dok je u polimeriziranom materijalu pH između 6,5 i 7. Svojstva materijala i njihov sastav kako je navedeno od strane proizvođača prikazana su u Tablici 1.

Tablica 1. Kompozitni materijali i adhezivni sustav korišteni u istraživanju (sastav prema proizvođaču).

	Proizvođač (lot broj)	Organska smolasta matrica (tež. %)	Punilo (tež. %)
Kalore (nano-hibridni kompozitni materijal)	GC, Tokio, Japan (0906031)	18% UDMA, dimetakrilatni komonomeri, DX-511 monomer	82% stroncijevostaklo (400 nm), lantanoid fluorid (100 nm), stroncijevostaklo (700 nm), fluoroaluminosilikatnostaklo (700 nm), silikon dioksid (16 nm)
Vertise flow (samoadherirajući tekući kompozitni materijal)	Kerr Corporation, Orange, CA, SAD (3439842)	18-40% GPDM adhezivni monomer, inkorporiran Kerrov-ov adhezivni sustav	60-82% barijevo staklo (0.7 μ m), barijevo staklo (1 μ m), silikat (10-40 nm), iterbijum fluorid (40 nm)
G-bond (samojetkajući adhezivni sustav)	GC, Tokio, Japan (CE0086)	95% 4-META, fosforni esterski monomer, UDMA, TEGDMA, stabilizatori, fotoinicijatori	5% silikatno punilo

2.1.2. Uspostava primarne kulture pulpe i gingive

Istraživanje potencijalne citotoksičnosti i genotoksičnosti kompozitnih materijala u uvjetima *ex vivo* provelo se na primarnim kulturama humane pulpe i gingive. Humani gingivni fibroblasti izolirani su iz zdravog gingivnog tkiva dobivenog biopsijom pacijenata koji su podvrgnuti ekstrakciji iz ortodonskih razloga u Zavodu za oralnu kirurgiju, Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Humane pulpne stanice izolirane su iz pulpnog tkiva istih ekstrahiranih zubi tako da bi se nakon vađenja, očistili sterilnim fosfatnim puferom (PBS, Sigma-Aldrich, München, Njemačka), prepilili fisurnim svrdlom, a pulpno tkivo pažljivo uklonilo ekskavatorom. Gingivno i pulpno tkivo uzeto je uz pacijentov pristanak, u aseptičnim uvjetima, nakon čega su se pohranili u 1 ml fosfatnog pufera (Sigma-

Aldrich, München, Njemačka) s dodatkom 40 µl penicilina i streptomicina (Sigma-Aldrich, München, Njemačka) te čuvali na hladnom (+ 4°C) do dolaska u Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

Gingivno i pulpno tkivo se po dolasku u Institut držalo u inkubatoru na 37 °C i atmosferi od 5% CO₂ kroz sat vremena uz povremeno vorteksiranje, u 5 ml RPMI 1640 medija (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) s dodatkom 3 mg/ml kolagenaze (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD). Po inkubaciji tkivo se centrifugiralo 3 minute na 1200 okretaja, a supernatant uklonio do volumena od 1 ml. Resuspendirani talog se kultivirao u 25 cm³ posudama za uzgoj staničnih kultura (Sigma-Aldrich, München, Njemačka) u otopini sastava 4 ml RPMI 1640 medija (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) s dodatkom 1 ml 5% fetalnog seruma goveda (FBS; Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD), 100 U/ml penicilina (Sigma-Aldrich, München, Njemačka), 100 U/ml streptomicina (Sigma-Aldrich, München, Njemačka) i 2.5 µg/ml amfotericina B (Sigma-Aldrich, München, Njemačka), na 37 °C u 5% CO₂ i 95% relativne vlažnosti. Svaki treći dan kulturama je promijenjen hranjivi medij. Nakon što su stanice dosegle ušće posude, kratko su tretirane 0,25% tripsinom (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) i 0,02% etilendiamin-tertaocetnom kiselinom (EDTA; Sigma-Aldrich, München, Njemačka) kako bi se odvojile od posude, nakon čega su dva puta isprane i ponovo kultivirane, tako da se 1 mL suspenzije stanica (~ 1 x 10⁶ stanica) dodao u otopinu za kultivaciju (4 ml RPMI 1640, 1 ml FBS, 100 U/ml penicilina, 100 U/ml streptomicina, 2.5 µg/ml amfotericin B). Kako bi se stanice privikle na laboratorijske uvjete za testiranje materijala korištene su stanice između pete i sedme pasaže.

2.1.3. Priprema kompozitnih materijala

Kompozitni materijali pripremili su se tako da su se u sterilnim uvjetima uzele dvije mase svakog od ispitivanih materijala (0.1 g, 0.2 g; Sartorius BLG10S, Goettingen, Njemačka). Materijali su se mehanički pritislili između dvije prozirne celuloidne trake, tako da se dobije tanki, jednolični sloj od 2 mm i omogući pogodna polimerizacija. Polimerizacija se obavila u skladu s uputama proizvođača, u sterilnim uvjetima, Bluephase C8 (Ivoclar Vivadent, Schaan, Linhenštajn) polimerizacijskom lampom, soft start programom (650 mW/cm², 800 mW/cm²) u trajanju od 40 sekundi. Nakon polimerizacije, materijal je odvojen od celuloidne vrpce i dodan u 5 ml kulture stanica. Kulture su tretirane kroz 14 dana

na temperaturi od 37 °C i zraku koji sadrži 5% CO₂ i 95% relativne vlažnosti. Negativna kontrolna kultura izlagana je čistom mediju RPMI 1640. Svaki treći dan kulturama bi se izmijenio hranjivi medij uz nastavak izlaganja ispitivanim pripravcima. Iste kulture su se koristile za ispitivanje citotoksičnog i genotoksičnog djelovanja kompozitnih materijala u uvjetima *ex vivo*.

2.1.4. Analiza citotoksičnosti primjenom diferencijalnog bojanja akridin narančastom bojom i etidijevim bromidom

Po isteku tretiranja, stanice pulpe i gingive odvojene su od podloge kratkotrajnim tretiranjem 0,25% tripsinom i 0,02% etilendiamin-tertaoctenom kiselinom, nakon čega su centrifugirane kroz vrijeme od 3 minute na 1000 okretaja. Nakon što se otklonio supernatant, talog se resuspendirao u 3 ml čistog RPMI 1640. Postupak centrifugiranja i ispiranja svježim medijem ponovljen je 2 puta. Nakon posljednjeg centrifugiranja talog stanica ponovo je resuspendiran i korišten u ispitivanju.

Citotoksično djelovanje materijala utvrdilo se diferencijalnim bojanjem stanica iz kulture primjenom akridin-narančastog i etidijevog bromida. Vijabilnost se odredila tako da se na predmetno staklo (Tlos, Zagreb, Hrvatska) nanijelo 10 µl suspenzije i obojilo s 50 µl otopine akridin-narančastog (100 mg/ml; Sigma-Aldrich, München, Njemačka) i etidijevog bromida (100 µg/ml; Sigma-Aldrich, München, Njemačka). Preparat se prekrio pokrovnim staklom 24 x 60 mm (Tlos, Zagreb, Hrvatska) i analizirao epifluorescentnim mikroskopom Olympus BX 50 (Olympus, Tokio, Japan) pod povećanjem 600 x. Za svaku kulturu analiziralo se zasebno 2 x 100 fibroblasta pri čemu se na osnovu razlike u obojenju utvrdio broj vitalnih stanica (zeleno fluorescirajuća), stanica u ranoj apoptozi (zeleno fluorescirajuća s vidljivim gustim kondenziranim kromatinom zelene boje), stanica u kasnoj apoptozi (crveno fluorescirajuća s vidljivim kondenziranim kromatinom narančaste boje) i stanica umrlih u nekrozi (crveno fluorescirajuća bez kondenzacija kromatina). Određivanje vijabilnosti ponovilo se za svaku kulturu u duplikatu te prikazalo kao srednja vrijednost i standardna devijacija.

2.1.5. Alkalni komet test (metoda elektroforeze pojedinačne stanice u agaroznom gelu)

U ovom istraživanju korištena je alkalna metoda prema Singhu i sur. (37). Čitav postupak izrade preparata i njihove analize provoden je pod prigušenom žutom rasvjetom. Pripravci potrebni za komet test korišteni su od tvrtke Sigma-Aldrich, München, Njemačka.

U svrhu izrade preparata, na brušena predmetna stakla (Surgipath, SAD) nanescena je 1% otopina agaroze normalne točke otapanja (NMP). Nakon polimerizacije, gel je uklonjen sa stakla, te je na to isto predmetno staklo nanescen sloj 0,6%-tne NMP otopine agaroze i ono je položeno na led. Nakon 10 minuta na sloj gela nanescena je suspenzija tretiranog uzorka kulture stanica u 0,5%-tnoj agarози niske točke otapanja (LMP) te je staklo položeno na led. Nakon polimerizacije gela, na predmetno je staklo nanescen sloj 0,5%-tne LMP agaroze kao treći sloj gela i staklo je ponovno držano na ledu 10 minuta. Dobiveni preparati su uronjeni u ohlađeni (4 °C) pufer za lizu (1% natrijev sarkozinat, 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 i 10% dimetil sulfoksid) pH 10,0 te držani na 4 °C jedan sat. Nakon lize stanica preparati su uronjeni u pufer za denaturaciju (0,3 M NaOH, 1 mM Na₂EDTA), pH 13 i držani na + 4 °C. Elektroforeza je provedena u vodoravnoj kadici za elektroforezu (LifeTechnologies Ltd, Carlsbad, Kalifornija) u puferu za denaturaciju (0,3 M NaOH, 1 mM Na₂EDTA), istosmjernom strujom stalne jakosti 300 mA i napona 1 V/cm u trajanju od 20 minuta. Neutralizacija je provedena ispiranjem u 0,4 M Tris-HCl puferu, pH 7,5 u trajanju od pet minuta. Nakon ispiranja preparati su bojani otopinom etidijevog bromida, koncentracije 20 µg/ml, u trajanju od 10 minuta, isprani 0,4 M Tris-HCl puferom (pH 7,5) i do analize pohranjeni u vlažnoj komorici na + 4 °C.

Analiza preparata izvršena je epifluorescentnim mikroskopom Olympus BX 50 (Olympus, Tokio, Japan). CCD (Cohu, San Diego, CA, SAD) kamerom snimane su mikrofografije svakog pojedinog kometa i kvantitativno analizirane pomoću programa za analizu slike Comet assay IV (Perceptive Instruments Ltd., Suffolk, Halstead, UK).

Za svaku pojedinu koncentraciju kompozita analizirano je 100 kometa (dva stakalca po tretmanu), određujući pri tom dužinu repa u µm te intenzitet fluorescencije repa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dužine repa u µm i intenziteta fluorescencije repa. Tijekom analize, rubovi i oštećeni dijelovi gela, superponirani kometi, kometi s ujednačenim intenzitetom i bez zasebne glave su se izbjegavali.

Kao pozitivna kontrola, korišten je vodikov peroksid (1 mmol/dm^3). Nakon slojevanja stanica u gel na stakalcu, primijenilo se $60 \text{ }\mu\text{L}$ vodikovog peroksida (1 mmol/dm^3) kroz 10 minuta na ledu. Nakon toga su stakalca obrađena komet tehnikom kao što je prethodno opisano.

2.1.6. Statistička obrada podataka

Razlike u broju stanica umrlih u apoptozi, nekrozi i vitalnih između kontrolnih kultura i kultura tretiranih kompozitnim materijalima testirane su primjenom Hi-kvadrat testa. U svrhu utvrđivanja statističke značajnosti u rezultatima komet-testa korišten je Kruskal-Wallisov test. Sve analize su izvedene u SPSS 10,0 (SPSS Inc, Chicago, SAD) uz značajnost postavljenu na $p < 0,05$.

2.2. Ispitivanje genotoksičnosti kompozitnih materijala u uvjetima *in vivo*

2.2.1. Materijali

U ovom dijelu istraživanja korišteni su isti kompozitni materijali kao i u prvom dijelu, nano-hibridni kompozitni materijal Kalore i samoadherirajući kompozitni materijal Vertise Flow. U izradi ispuna uz kompozitni materijal Kalore korišten je i odgovarajući adhezivni sustav istog proizvođača (G-bond, GC, Tokio, Japan; LOT CE0086). Sastav materijala, kako je navedeno od strane proizvođača, prikazan je u Tablici 1. Za jetkanje tvrdih zubnih tkiva koristila se 37% ortofosforna kiselina (Total Etch, Ivoclar Vivadent, Schaan, Linhenštajn).

2.2.2. Ispitanici

Drugi dio istraživanja povodio se u Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju, Stomatološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu i Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Stomatološkog fakulteta, a svaki je ispitanik prije potpisivanja informiranog pristanka i suglasnosti u potpunosti bio upoznat sa svrhom rada. U studiju su uključeni samo oni ispitanici koji su imali minimalno jednu nekarijesnu cervikalnu leziju tvrdog zubnog tkiva. Istraživanje je provedeno na 30 pacijenata, 18 muškaraca i 12 žena, starih između 38-59 godina (srednja dob $48,1 \pm 7,47$). Ispitanici su nasumično podijeljeni u dvije brojčano iste skupine (15 svaka; devet muškaraca, šest žena), ovisno o materijalu koji se koristio u restaurativnom zahvatu. U prvoj se skupini kao restaurativni materijal koristio Kalore, nano-hibridni kompozit (GC, Tokio, Japan) i samojetkajući adheziv G-bond (GC, Tokio, Japan), dok se u drugoj skupini koristio Vertise Flow (Kerr Corporation, Orange, CA, SAD), samoadherirajući kompozitni materijal. Nekarijesna cervikalna oštećenja slojevito su restaurirana kompozitnim materijalom prema preporukama proizvođača i polimerizirani Bluephase C8 lampom (650 mW/cm², 800 mW/cm²; Ivoclar Vivadent, Schaan, Linhenštajn) soft-start modom.

Od svakog ispitanika uzeta je detaljna medicinska anamneza. U strukturirani upitnik, predviđen za ovo istraživanje, svi su ispitanici unijeli odgovore na pitanja vezana uz

demografske čimbenike (dob, spol i td.), životne navike (pušenje, konzumacija alkohol i td.), osobne čimbenike (zdravstveno stanje, uporaba lijekova, izloženost zračenju) i prehrambene navike. Pojedinci koji su trošili dvije ili više jedinica alkohola, tri ili više puta tjedno nisu uključeni u studiju, kao i pacijenti s oralnim lezijama, poviješću malignog oboljenja te oni koji su bili izloženi materijalima koji se koriste u ortodonciji i/ili u mobilnoj i fiksnoj protetici.

2.2.3. Uzorkovanje stanica

Uzorci epitelnih stanica skupljeni su kod svakog ispitanika tehnikom četkanja neposredno prije (kontrola), 7, 30 i 180 dana nakon postavljanja ispuna. Sudionike istraživanja smo zamolili da se jedan sat prije uzorkovanja suzdrže od pušenja, jela te konzumacije alkoholnih pića. Prije uzorkovanja, svi su ispitanici tri puta isprali usnu šupljinu vodovodnom vodom kako bi odstranili odljuštene mrtve stanice. Primjenom citološke četkice (Cytobrush Plus, GmbH, Dietramszell-Linden, Njemačka), nježnim četkanjem gingivnog područja uz postavljeni kompozitni materijal, uzet je bris gingivnih stanica, nakon čega su se stanice pohranile u otopinu sastava 5 ml fosfatnog pufera (PBS, pH 7,4), s dodatkom antibiotika penicilina i streptomicina (Sigma-Aldrich, München, Njemačka). Uzorci su čuvani na hladnom (+ 4 °C) te su tijekom 60 minuta od uzorkovanja transportirani u laboratorij Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada gdje su centrifugirani kroz 2 minute na 2000 okretaja i resuspendirani s fosfatnim puferom. Svaka stanična suspenzija podijelila se u dva paralelna alikvota, koji su obrađeni odvojeno. Jedan je bio korišten za procjenu oštećenja DNK koristeći komet test, a drugi je bio analiziran mikronukleus metodom.

2.2.4. Alkalni komet test (metoda elektroforeze pojedinačne stanice u agaroznom gelu)

Pripravci potrebni za komet test kupljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, München, Njemačka). Postupak se provodio prateći protokol opisan prema Singh i sur. (37). Nakon centrifugiranja (2 min/2000 okretaja) i resuspendiranja stanica u otopini slanog fosfatnog pufera (pH 7,4), vijabilnost je utvrđena bojanjem tripanskim modrilom (0,4% w/v; Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD). Iz svakog uzorka gingivnih stanica pripravljena su

dva paralelna preparata tako da se pomiješalo 10 μl ($\sim 10^4$ stanica) s 75 μl agaroze niskog tališta (0,7%) i postavilo na mikroskopsko stakalce prethodno obloženo s 1,0% agarozom niskog tališta. Nakon toga, stakalca su uronjena u otopinu za lizu (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Na-lauroilsarkozinat, 1% Triton X-100 i 10% dimetil sulfoksid, pH 10,0) kroz 72 sata na 4 °C, a potom denaturirana (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH 13,0) u trajanju od 10 minuta. Elektroforeza se provodila 16 minuta na 0,66 V/cm, 300 mA. Nakon elektroforeze, preparati su neutralizirani s Tris-HCl puferom (pH 7,5), tri puta kroz 5 minuta i obojani pomoću etidij-bromida (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) u vremenu od 10 minuta. Postupak izrade i analize proveo se pod prigušenim žutim svjetlom kako bi se preveniralo dodatno oštećenje DNK. Svaka elektroforeza je imala i uključenu pozitivnu kontrolu koja se pripremila tako da se na nasumično izabrano već pripremljeno stakalce s gingivnim stanicama naneo 50 μl (1 mM) H₂O₂ u trajanju od 5 minuta. Nakon tretiranja s H₂O₂, preparat se isprao u PBS i pripremio standardnim alkalnim komet postupkom. Srednja vrijednost dužine repa dobivena analizom pozitivnih kontrolnih stakalaca bila je $21,2 \pm 7,9 \mu\text{m}$, a intenziteta repa $12,2 \pm 14,6 \%$ DNK.

Stakalca su analizirana primjenom Olympus BX 50 (Olympus, Tokio, Japan) epifluorescentnog mikroskopa pod povećanjem 250 x i sustava za analizu Comet Assay IV (Perceptive Instruments Ltd. Suffolk, Halstead, UK). Za svako vrijeme uzorkovanja (0, 7, 30, 180 dana), 100 slučajno odabranih stanica analizirano je (50 stanica za svaki ponovljeni preparat ili dva stakalca po ispitaniku). Pratila su se dva parametra DNK oštećenja, postotak DNK u repu (% DNK) i dužina repa (μm), mjerena od sredine glave kometa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD.

2.2.5. Mikronukleus test

Stanična suspenzija nanescena je na predmetno stakalce zagrijano na 37 °C, a potom fiksirani metanolom (80% v/v) na 4 °C kroz vrijeme od 20 minuta. Stakalca su bojana 5%-tnom otopinom Giemse u trajanju od 10 minuta, isprana destiliranom vodom i osušena na zraku. Analiza se provela svjetlosnim mikroskopom Olympus CX 40 (Olympus, Tokyo, Japan) pod povećanjem 400 x, s tim da je svaki mikronukleus i ostale kromatinske anomalije dodatno provjereni pod povećanjem od 1000 x. Po dva preparata pripravljena su za svakog ispitanika te je analizirano 1000 epitelnih stanica za svako vrijeme uzorkovanja. Učestalost

pojavljivanja kromatinskih abnormalnosti, poput binuklearnih stanica, kariolize, kariorekse, mostova i jezgrinih pupova, procijenjena je i kvalificirana prema Tolbert i sur. (59). Da bi se mikronukleus računao kao takav morao je ispuniti sljedeće uvjete: a) morao se sastojati od jezgrinog materijala, b) morao je biti potpuno odvojen od matične jezgre, c) morao je biti manji od 1/3 promjera glavne jezgre, d) morao je biti glatkog, ovalnog ili okruglog oblika, e) morao je biti u istoj ravnini fokusa i f) morao je biti iste boje, teksture i refrakcije kao i glavna jezgra. Stanice s dvije jezgre smatrane su binuklearnim. Karioreksa (nuklearni raspad), karioliza (otapanje jezgre), jezgrini pupovi (prethodnici mikronukleusa) i nukleoplazmatski mostovi (jezgre međusobno spojene mostom) bilježili su se odvojeno.

2.2.6. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišteni su programski paketi STATISTICA 7.0 (StatSoft, Oklahoma, SAD) i MedCalc. Deskriptivna statistika korištena je za određivanje osnovnih statističkih parametara (srednje vrijednosti, standardne pogreške, standardne devijacije, relativne standardne devijacije, medijani te minimalne i maksimalne vrijednosti). Analizom varijance i Student-Newman-Keuls testom utvrđeno postojanje/nepostojanje statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti za svaki mjereni parametar (mikronukleus, binuklearna stanica, karioliza, karioreksa, pup, most, dužina repa, intenzitet repa) za pojedine parove testiranih skupina. U procjeni doprinosa prediktorskih varijabli (pušenje, dob, spol, farmakoterapija i ostalo) zavisnim varijablama (mjereni parametri) korišten je napredni regresijski model izražen u formi Pareto dijagrama te višestruka regresijska analiza. U svim testovima korištena je statistička značajnost na razini $p < 0,05$.

3. REZULTATI

3.1. Citotoksični i genotoksični učinak kompozitnih materijala u uvjetima *ex vivo*

3.1.1. Određivanje tipa stanične smrti

Ispitivanje citotoksičnosti kompozitnih materijala u polimeriziranom obliku provedeno je na dva tipa staničnih kultura, kulturi ljudskih fibroblasta pulpe i gingive. Za svaki materijal ispitivane su dvije koncentracije uzorka: 20 mg/ml i 40 mg/ml. Tablice 2 i 3 prikazuju citotoksičan utjecaj kompozitnih materijala, ovisno o koncentraciji, na kulture stanica pulpe i gingive nakon 14 dana tretiranja.

Vertise Flow i Kalore u koncentraciji 40 mg/ml značajno smanjuju vijabilnost stanica humanih fibroblasta pulpe u usporedbi prema negativnoj kontroli. Isto tako, Vertise Flow u većoj koncentraciji (40 mg/ml) dovodi do smanjenja vijabilnost u kulturi humanih fibroblasta gingive. Tekući kompozitni materijal Vertise Flow (40 mg/ml) u obje kulture fibroblasta dovodi do značajnog povećanja broja stanica umrlih u ranoj apoptozi.

Tablica 2. Citotoksično testiranje - udio vitalnih stanica te onih umrlih apoptozom i nekrozom za kulturu humanih fibroblasta pulpe.

Kultura humanih fibroblasta pulpe					
Kompozitni materijal	Koncentracija materijala	Vijabilne stanice $\pm$ S.D.	Apoptoza (rana) $\pm$ S.D.	Apoptoza (kasna) $\pm$ S.D.	Nekroza $\pm$ S.D.
Vertise Flow	20 mg/ml	86,5 $\pm$ 0,7	11,0 $\pm$ 1,4	2,5 $\pm$ 0,7	0,0 $\pm$ 0,0
	40 mg/ml**	69,5 $\pm$ 9,1*	25,0 $\pm$ 4,2*	3,0 $\pm$ 0,0	2,5 $\pm$ 0,7
Negativna kontrola	/	90,0 $\pm$ 5,6	8,0 $\pm$ 5,5	1,5 $\pm$ 0,7	0,5 $\pm$ 0,7
Pozitivna kontrola	/	25,5 $\pm$ 2,1	13,0 $\pm$ 1,4	52,5 $\pm$ 0,7	9,0 $\pm$ 1,4
Kalore	20 mg/ml	96,0 $\pm$ 1,4	2,0 $\pm$ 2,8*	0,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 1,4
	40 mg/ml**	92,5 $\pm$ 0,7*	3,5 $\pm$ 2,1*	0,0 $\pm$ 0,0	4,0 $\pm$ 1,4*
Negativna kontrola	/	98,0 $\pm$ 1,41	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 1,41

Pozitivna kontrola	/	25,5 ± 2,1	13 ± 1,4	52,5 ± 0,7	9 ± 1,4
*p<0,05 u odnosu na kontrolu; **p<0,05 sve varijable u odnosu na kontrolu					

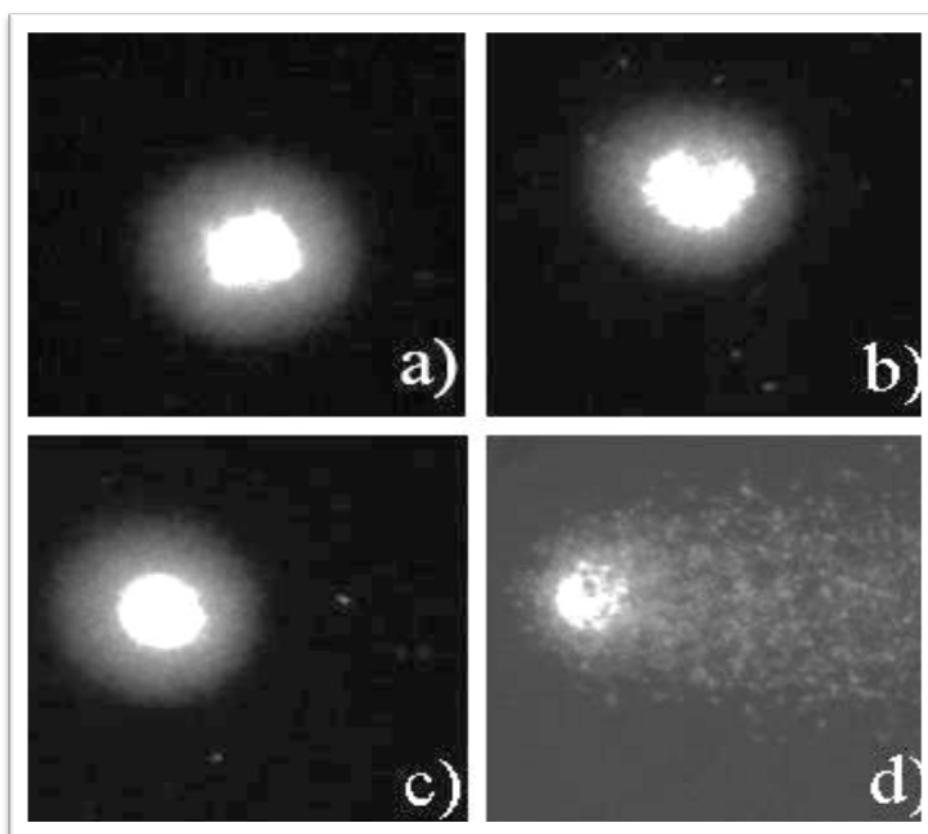
Tablica 3. Citotoksično testiranje - udio vitalnih stanica te onih umrlih apoptozom i nekrozom za kulturu humanih fibroblasta gingive.

Kultura humanih fibroblasta gingive					
Kompozitni materijal	Koncentracija materijala	Vijabilne stanice ± S.D.	Apoptoza (rana) ± S.D.	Apoptoza (kasna) ± S.D.	Nekroza ± S.D.
Vertise Flow	20 mg/ml*	85,5 ± 6,3	11,0 ± 5,6*	3,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0
	40 mg/ml*	77,5 ± 3,5*	16,0 ± 0,0*	4,5 ± 3,5	2,0 ± 0,0*
Negativna kontrola	/	93,0 ± 5,6	4,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pozitivna kontrola	/	21,5 ± 2,1	6,5 ± 0,7	60,0 ± 4,2	12,0 ± 1,4
Kalore	20 mg/ml	94,0 ± 1,4	2,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0	3,5 ± 0,7
	40 mg/ml	90,5 ± 0,7	3,0 ± 1,4	0,0 ± 0,0	6,5 ± 2,1
Negativna kontrola	/	94,0 ± 0,0	1,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0	4,5 ± 0,7
Pozitivna kontrola	/	21,5 ± 2,1	6,5 ± 0,7	60,0 ± 4,2	12,0 ± 1,4
*p<0,05 u odnosu na kontrolu; **p<0,05 sve varijable u odnosu na kontrolu					

3.1.2. Alkalni komet test (metoda elektroforeze pojedinačne stanice u agaroznom gelu)

Primjenom komet testa utvrđena je razina primarnih oštećenja molekule DNK u primarnim kulturama humanih fibroblasta pulpe i gingive tretiranim različitim koncentracijama kompozitnih materijala (Slika 4). Praćena su dva osnovna parametra povećanja migracijske sposobnosti molekule DNK u agaroznom gelu, dužina repa kometa (μm) koja je proporcionalna broju primarnih oštećenja i određuje udaljenost na koju su od

središta "jezgre" migrirali lanci molekule DNK te intenzitet fluorescencije repa koji predstavlja postotak ukupne DNK genoma stanice koja je migrirala iz glave kometa (područje jezgre stanice prije liziranja) u rep kometa i izravno je proporcionalan intenzitetu oštećenja molekule DNK. Za svaku pojedinu koncentraciju materijala primjenom programa za analizu slike pregledano je 100 kometa.



Slika 4. Procjena genotoksičnosti kompozitnih materijala komet testom na kulturi humanih fibroblasta pulpe: a) prikazuje sliku kometa humanog fibroblasta pulpe tretiranog Kalore kompozitnim materijalom u koncentraciji 20 mg/ml, b) prikazuje sliku kometa humanog fibroblasta pulpe tretiranog Kalore kompozitnim materijalom u koncentraciji 40 mg/ml, c) prikazuje sliku kometa negativne kontrole, d) prikazuje sliku kometa pozitivne kontrole.

Kompozitni materijali, u obje koncentracije i kulture, dovode do značajnog povećanja dužine i intenziteta repa (Tablice 4, 5). U kulturi fibroblasta gingive Kalore pokazuje statistički značajno povećanja dužine repa u odnosu na Vertise flow u obje koncentracije, a u kulturi fibroblasta pulpe dovodi do značajnog povećanja dužine repa u nižoj (20 mg/ml), te povećanja intenziteta repa u višoj koncentraciji (40 mg/ml).

Tablica 4. Vrijednosti parametara komet testa za kulturu humanih fibroblasta gingive tretiranu kompozitnim materijalom u različitim koncentracijama kroz 14 dana. Izmjerena oštećenja prikazana su kao srednje vrijednosti i standardna devijacija.

Koncentracija materijala	Parametar kometa	Vertise Flow	Kalore
20 mg/ml	Dužina repa (μm) $\pm$ S.D.	18,8 $\pm$ 3,1 [*]	30,5 $\pm$ 5,8 ^{**#}
	Intenzitet repa (%DNK) $\pm$ S.D.	2,3 $\pm$ 4,0 [*]	2,4 $\pm$ 3,2 [*]
40 mg/ml	Dužina repa (μm) $\pm$ S.D.	19,1 $\pm$ 2,6 ^{**}	31,5 $\pm$ 4,5 ^{**#}
	Intenzitet repa (%DNK) $\pm$ S.D.	2,5 $\pm$ 3,4 ^{**}	1,2 $\pm$ 2,1
Negativna kontrola	Dužina repa (μm) $\pm$ S.D.	17,4 $\pm$ 3,2	24,5 $\pm$ 3,3
	Intenzitet repa (%DNK) $\pm$ S.D.	1,1 $\pm$ 2,7	1,5 $\pm$ 1,8
Pozitivna kontrola	Dužina repa (μm) $\pm$ S.D.	35,8 $\pm$ 4,1	39,3 $\pm$ 6,0
	Intenzitet repa (%DNK) $\pm$ S.D.	42,0 $\pm$ 11,7	51,3 $\pm$ 18,7
[*] p<0,05; ^{**} p<0,01 u odnosu na kontrolu; [#] p<0,01 u odnosu na tretman drugim materijalom			

Tablica 5. Vrijednosti parametara komet testa za kulturu humanih fibroblasta pulpe tretiranu kompozitnim materijalom u različitim koncentracijama kroz 14 dana. Izmjerena oštećenja prikazana su kao srednje vrijednosti i standardna devijacija.

Koncentracija materijala	Parametar kometa	Vertise Flow	Kalore
20 mg/ml	Dužina repa (μm) $\pm$ S.D.	24,1 $\pm$ 5,3	29,0 $\pm$ 4,7 ^{**#}
	Intenzitet repa (%DNK) $\pm$ S.D.	3,4 $\pm$ 5,2 ^{**}	3,0 $\pm$ 3,3 ^{**}
40 mg/ml	Dužina repa (μm) $\pm$ S.D.	27,9 $\pm$ 6,5 ^{**}	27,8 $\pm$ 5,1 ^{**}
	Intenzitet repa (%DNK) $\pm$ S.D.	1,6 $\pm$ 2,4 ^{**}	4,0 $\pm$ 6,9 ^{**#}
Negativna kontrola	Dužina repa (μm) $\pm$ S.D.	23,0 $\pm$ 6,0	25,2 $\pm$ 3,9
	Intenzitet repa (%DNK) $\pm$ S.D.	0,4 $\pm$ 0,7	0,6 $\pm$ 1,0
Pozitivna kontrola	Dužina repa (μm) $\pm$ S.D.	39,1 $\pm$ 8,2	42,7 $\pm$ 10,4
	Intenzitet repa (%DNK) $\pm$ S.D.	41,0 $\pm$ 12,2	49,8 $\pm$ 11,6
[*] p<0,05; ^{**} p<0,01 u odnosu na kontrolu; [#] p<0,01 u odnosu na tretman drugim materijalom			

3.2. Genotoksični učinak kompozitnih materijala u uvjetima *in vivo*

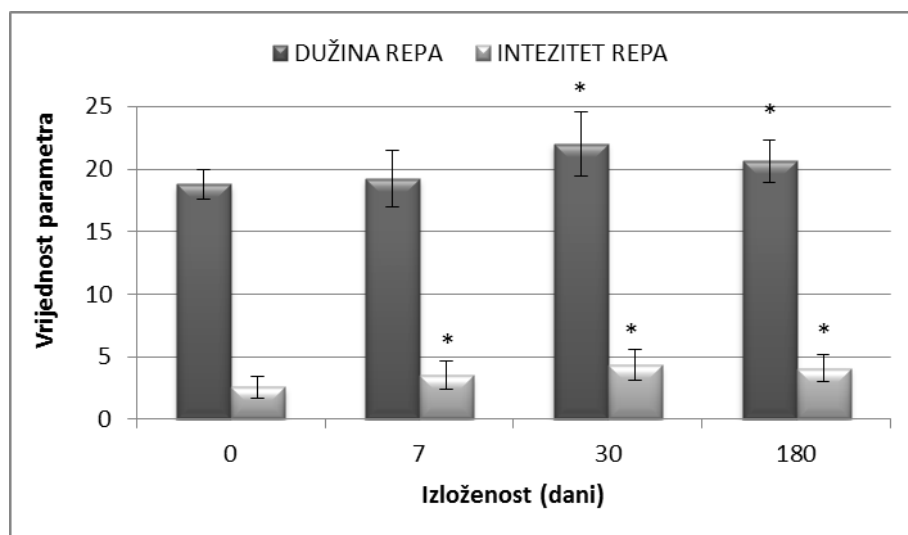
3.2.1. Alkalni komet test (metoda elektroforeze pojedinačne stanice u agaroznom gelu)

Osnovni statistički parametri za vrijednosti parametara komet testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Kalore dani su u Tablici 6 i Slici 5, rezultati analize varijance u Tablici 7, a Newman-Keuls testa u Tablici 8. Kao što je vidljivo iz Tablice 6 i Slike 5 i 6 srednje vrijednosti oba parametra komet testa povećavaju se nakon primjene ispitivanih materijala. Najviša vrijednost oba parametara izmjerena je nakon 30 dana izloženosti dok se nakon šestomjesečne izloženosti neznatno snizuju. Međutim, intenzitet repa je još uvijek gotovo dvostruko viši u odnosu na kontrolu. Statistički značajna razlika za oba parametra između različitih vremena izloženosti (0-180 dana) potvrđena je i analizom varijance (Tablica 7) i Newman-Keuls testom (Tablica 8). Iz Tablice 7 vidljivo je da je dužina repa kometa statistički značajno viša u odnosu na kontrolu nakon 30 i 180 dana izloženosti dok je za intenzitet repa ta razlika značajna za sva tri vremena izloženosti. Vrijednosti dužine repa također su statistički značajno više za 30-dnevnu u odnosu na 7-dnevnu izloženost. Za intenzitet repa nema statistički značajne razlike između tri vremena izloženosti.

Tablica 6. Osnovni statistički parametri za parametre komet testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Kalore. $\bar{X}$ - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija, RSD - relativna standardna devijacija, SP - standardna pogreška, M - medijan.

Vrijeme izloženosti	Statistički parametar	Parametar kometa	
		Dužina repa (μm)	Intenzitet repa
0 dana	$\bar{X}$	18,79	2,60
	SD	1,15	0,87
	RSD	0,06	0,33
	SP	0,30	0,22
	M	18,56	2,44
	Minimum	17,35	1,30

7 dana	Maksimum	21,37	4,14
	$\bar{X}$	19,28	3,53
	SD	2,26	1,14
	RSD	0,12	0,32
	SP	0,58	0,29
	M	18,60	3,02
	Minimum	17,12	2,21
	Maksimum	26,50	5,87
30 dana	$\bar{X}$	22,02	4,35
	SD	2,54	1,27
	RSD	0,12	0,29
	SP	0,66	0,33
	M	20,82	4,27
	Minimum	19,11	2,78
	Maksimum	26,64	6,40
180 dana	$\bar{X}$	20,64	4,05
	SD	1,70	1,08
	RSD	0,08	0,27
	SP	0,44	0,28
	M	20,42	3,97
	Minimum	17,15	2,53
	Maksimum	23,92	6,27



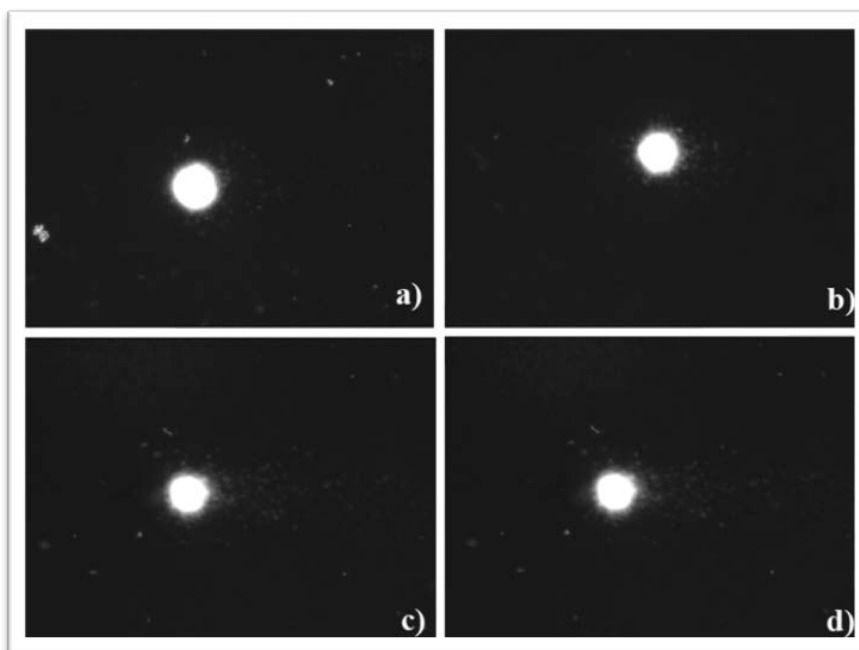
Slika 5. Srednje vrijednosti i standardne devijacije dužine (μm) i intenziteta repa kometa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Kalore. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu.

Tablica 7. Rezultati analize varijance za dužinu i intenziteta repa kometa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Kalore. SS - suma kvadrata, D.F. - stupnjevi slobode, MS - varijanca. * statistički značajno različit u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$).

	Dužina repa			Intenzitet repa		
Izvor varijacije	SS	D.F.	MS	SS	D.F.	MS
Između skupina	94,88	3	31,63	26,43	3	8,81
Unutar skupina	220,218	56	3,93	67,38	56	1,20
Ukupno	315,098	59		93,81	59	
F		8,042			7,323	
p		< 0,001*			< 0,001*	

Tablica 8. Rezultati Student-Newman-Keuls testa za dužinu i intenziteta repa kometa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Kalore. Grupirajuća varijabla - vrijeme izloženosti restaurativnom materijalu: 1 - 0 dana, 2 - 7 dana, 3 - 30 dana, 4 - 180 dana.

Skupina	Dužina repa		Intenzitet repa	
	$\bar{X}$	Statistički značajno različit ($p < 0,05$)	$\bar{X}$	Statistički značajno različit ($p < 0,05$)
(1) 1	18,79	(3)(4)	2,60	(2)(3)(4)
(2) 2	19,28	(3)	3,53	(1)
(3) 3	22,01	(1)(2)	4,35	(1)
(4) 4	20,64	(1)	4,05	(1)



Slika 6. Procjena genotoksičnosti kompozitnog materijala Kalore na gingivnim stanicama pacijenta: a) prikazuje komet sliku gingivnih epitelnih stanica prije postavljanja ispuna (kontrola), b) predstavlja komet sliku gingivnih epitelnih stanica uzetih 7 dana nakon postavljanja ispuna, c) predstavlja komet sliku gingivnih epitelnih stanica uzetih 30 dana nakon postavljanja ispuna, c) predstavlja komet sliku gingivnih epitelnih stanica uzetih 180 dana nakon postavljanja ispuna.

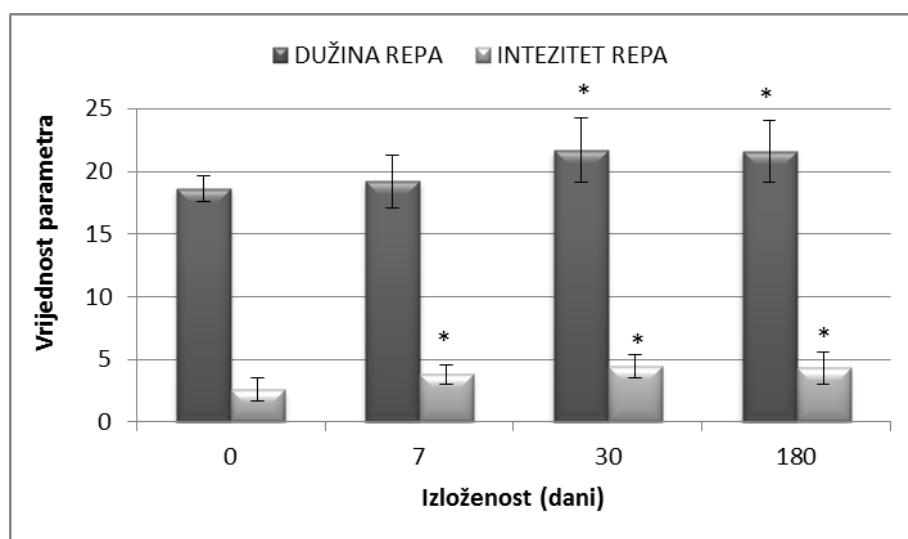
Osnovni statistički parametri za vrijednosti parametara komet testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Vertise Flow dani su u Tablici 9 i Slici 7, rezultati analize varijance u Tablici 10, a Newman-Keuls testa u Tablici 11. Slično kao i u prethodnom istraživanju srednje vrijednosti oba parametra komet testa povećavaju se nakon izloženosti ispitivanom materijalu. Najveće vrijednosti oba parametra izmjerene su nakon 30 dana izloženosti dok se nakon šestomjesečne izloženosti neznatno smanjuju (Slika 7). Statistički značajna razlika za oba parametra između različitih vremena izloženosti potvrđena je i analizom varijance i Newman-Keuls testom. Dužina repa kometa je nakon 30 i 180 dana izloženosti statistički značajno viša u odnosu na kontrolu i 7-dnevnu izloženost (Tablica 11) dok između 30-dnevne i 180-dnevne izloženosti nema statističke značajne razlike. U slučaju

repnog intenziteta statistički značajna razlika je potvrđena između kontrole i sva tri vremena izloženosti dok između tri vremena izloženosti nije potvrđena statistička značajnost razlike.

Tablica 9. Osnovni statistički parametri za parametre komet testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Vertise Flow. $\bar{X}$ - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija, RSD - relativna standardna devijacija, SP - standardna pogreška, M - medijan.

Vrijeme izloženosti	Statistički parametar	Parametar kometa	
		Dužina repa (μm)	Intenzitet repa
0 dana	$\bar{X}$	18,63	2,59
	SD	1,05	0,89
	RSD	0,06	0,34
	SP	0,27	0,23
	M	18,70	2,53
	Minimum	16,64	1,28
	Maksimum	21,57	4,67
7 dana	$\bar{X}$	19,19	3,80
	SD	2,08	0,75
	RSD	0,11	0,20
	SP	0,54	0,19
	M	18,99	3,78
	Minimum	17,08	2,66
	Maksimum	25,10	5,63
30 dana	$\bar{X}$	21,69	4,47
	SD	2,54	0,94
	RSD	0,12	0,21
	SP	0,66	0,24
	M	22,05	4,49
	Minimum	17,65	2,85
	Maksimum	25,52	5,83
180 dana	$\bar{X}$	21,59	4,33
	SD	2,42	1,30

RSD	0,11	0,30
SP	0,62	0,34
M	21,21	4,06
Minimum	17,56	2,97
Maksimum	26,67	7,29



Slika 7. Srednje vrijednosti i standardne devijacije dužine (μm) i intenziteta repa kometa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Vertise Flow. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu vrijednost.

Tablica 10. Rezultati analize varijance za dužinu i intenziteta repa kometa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Vertise Flow. SS - suma kvadrata, D.F. - stupnjevi slobode, MS - varijanca. * statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu vrijednost ($p < 0,05$).

Izvor varijacije	Dužina repa			Intenzitet repa		
	SS	D.F.	MS	SS	D.F.	MS
Između skupina	113,96	3	37,99	32,75	3	10,92
Unutar skupina	248,32	56	4,439	55,07	56	0,98
Ukupno	362,28	59		87,82	59	
F		8,566			11,103	
p		< 0,001*			< 0,001*	

Tablica 11. Rezultati Student-Newman-Keuls testa za dužinu i intenziteta repa kometa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Vertise Flow. Grupirajuća varijabla - vrijeme izloženosti restaurativnom materijalu: 1 - 0 dana, 2 - 7 dana, 3 - 30 dana, 4 - 180 dana.

Skupina	Dužina repa		Intenzitet repa	
	$\bar{X}$	Statistički značajno različit ($p < 0,05$)	$\bar{X}$	Statistički značajno različit ($p < 0,05$)
(1) 1	18,63	(3)(4)	2,59	(2)(3)(4)
(2) 2	19,19	(3)(4)	3,80	(1)
(3) 3	21,68	(1)(2)	4,47	(1)
(4) 4	21,59	(1)(2)	4,33	(1)

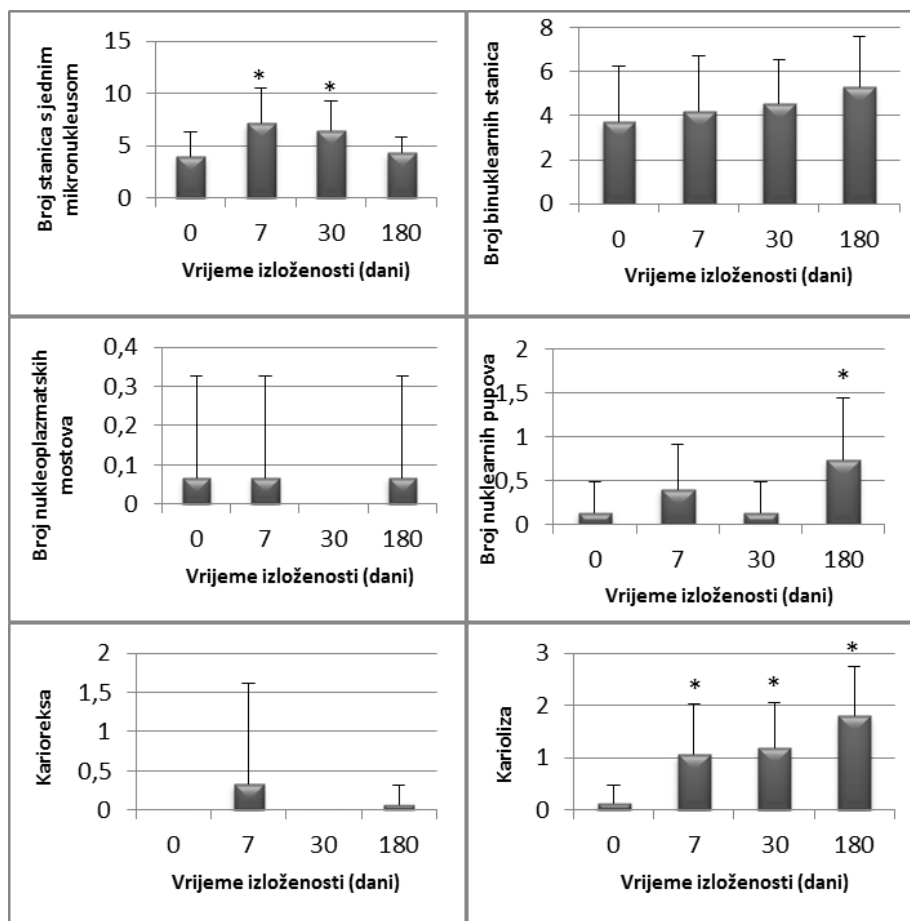
3.2.2. Mikronukleus test

Osnovni statistički parametri za vrijednosti parametara mikronukleus testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Kalore dani su u Tablici 12 i Slici 8, rezultati analize varijance u Tablici 13, a Newman-Keuls testa u Tablici 14. Statistički značajna razlika potvrđena je za parametre jedan mikronukleus, karioliza i nuklearne pupove. Broj stanica s jednim mikronukleusom je najveći nakon sedmodnevne izloženosti dok se nakon 180-dnevne izloženosti vrijednost spušta gotovo na kontrolnu vrijednost dok u slučaju kariolize i broja pupova najviše vrijednosti su upravo utvrđene nakon 180-dnevne izloženosti. Newman-Keuls testom je potvrđeno da je učestalost stanica s jednim mikronukleusom statistički značajno viša nakon 7-dnevne i 30-dnevne izloženosti u odnosu na kontrolu i 180 dnevnu izloženost. Incidencija kariolize je statistički značajno viša za sva tri vremena izloženosti u odnosu na kontrolu, a broj pupova nakon 180-dnevne izloženosti.

Tablica12. Osnovni statistički parametri za parametre mikronukleus testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Kalore. MN - mikronukleus, $\bar{X}$ - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija, RSD - relativna standardna devijacija, SP - standardna pogreška, M - medijan.

Vrijeme izloženosti	Statistički parametar	Parametar mikronukleus testa						
		1MN	2MN	Binuklearna stanica.	Karioliza	Karioreksa	Most	Pup
0 dana	$\bar{X}$	4,00	0,13	3,73	0,13	0,00	0,07	0,13
	SD	2,36	0,35	2,52	0,35	0,00	0,26	0,35
	RSD	0,59	2,64	0,68	2,64	0,00	3,87	2,64
	SP	0,61	0,09	0,65	0,09	0,00	0,07	0,09
	M	3,00	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Minimum	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maksimum	11,00	1,00	8,00	1,00	0,00	1,00	1,00

7 dana	$\bar{X}$	7,13	0,33	4,20	1,07	0,33	0,07	0,40
	SD	3,42	0,90	2,51	0,96	1,29	0,26	0,51
	RSD	0,48	2,70	0,60	0,90	3,87	3,87	1,27
	SP	0,88	0,23	0,65	0,25	0,33	0,07	0,13
	M	7,00	0,00	4,00	1,00	0,00	0,00	0,00
	Minimum	3,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maksimum	17,00	3,00	10,00	3,00	5,00	1,00	1,00
30 dana	$\bar{X}$	6,47	0,20	4,53	1,20	0,00	0,00	0,13
	SD	2,80	0,56	2,03	0,86	0,00	0,00	0,35
	RSD	0,43	2,80	0,45	0,72	0,00	0,00	2,64
	SP	0,72	0,14	0,52	0,22	0,00	0,00	0,09
	M	6,00	0,00	4,00	1,00	0,00	0,00	0,00
	Minimum	3,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maksimum	14,00	2,00	9,00	2,00	0,00	0,00	1,00
180 dana	$\bar{X}$	4,33	0,07	5,33	1,80	0,07	0,07	0,73
	SD	1,45	0,26	2,26	0,94	0,26	0,26	0,70
	RSD	0,33	3,87	0,42	0,52	3,87	3,87	0,96
	SP	0,37	0,07	0,58	0,24	0,07	0,07	0,18
	M	4,00	0,00	5,00	2,00	0,00	0,00	1,00
	Minimum	2,00	0, 00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maksimum	7,00	1,00	11,00	3,00	1,00	1,00	2,00



Slika 8. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara mikronukleus testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Kalore. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu vrijednost.

Tablica 13. Rezultati analize varijance za parametre mikronukleus testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Kalore. SS - suma kvadrata, D.F. - stupnjevi slobode, MS - varijanca. * statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu vrijednost ($p < 0,05$).

	Izvor varijacije	Između skupina	Unutar skupina	Ukupno	F	p
1 Mikronukleus	SS	108,18	380,8	488,98	5,303	0,003*
	D.F.	3	56	59		
	MS	36,06	6,8			
2 Mikronukleusa	SS	0,58	18,4	18,98	0,592	0,623
	D.F.	3	56	59		
	MS	0,19	0,33			
Binuklearna stanica	SS	20,45	306,4	326,85	1,246	0,302
	D.F.	3	56	59		
	MS	6,82	5,47			
Karioliza	SS	21,38	37,47	58,85	10,654	< 0,001*
	D.F.	3	56	59		
	MS	7,13	0,67			
Karioreksa	SS	1,13	24,27	25,4	0,872	0,461
	D.F.	3	56	59		
	MS	0,38	0,43			
Most	SS	0,05	2,8	2,85	0,333	0,801
	D.F.	3	56	59		
	MS	0,017	0,05			
Pup	SS	3,65	14	17,65	4,867	0,004*
	D.F.	3	56	59		
	MS	1,22	0,252			

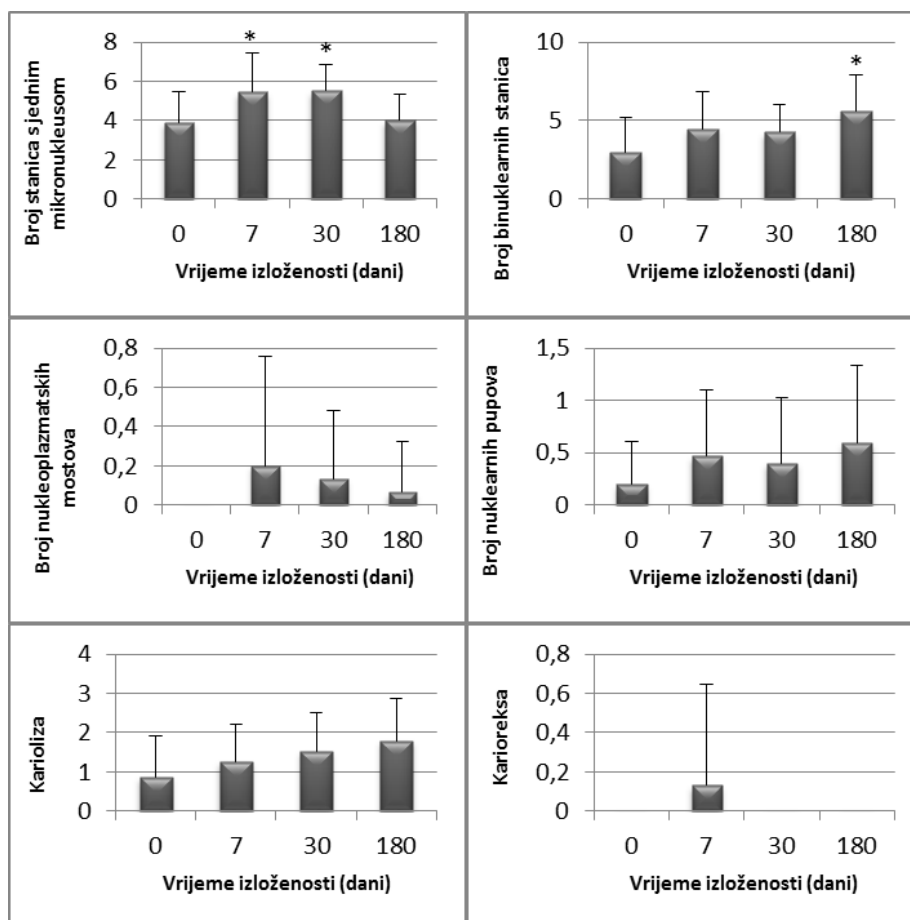
Tablica 14. Rezultati Student-Newman-Keuls testa za parametre mikronukleus testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Kalore. Grupirajuća varijabla - vrijeme izloženosti restaurativnom materijalu: 1 - 0 dana, 2 - 7 dana, 3 - 30 dana, 4 - 180 dana.

Skupina	1mn		Karioliza		Pup	
	$\bar{X}$	Statistički značajno različit ($p<0,05$)	$\bar{X}$	Statistički značajno različit ($p<0,05$)	$\bar{X}$	Statistički značajno različit ($p<0,05$)
(1) 1	4,00	(2)(3)	0,13	(2)(3)(4)	0,13	(4)
(2) 2	7,13	(1)(4)	1,07	(1)(4)	0,40	
(3) 3	6,47	(1)(4)	1,20	(1)(4)	0,13	(4)
(4) 4	4,33	(2)(3)	1,80	(1)(2)(3)	0,73	(1)(3)

Osnovni statistički parametri za vrijednosti parametara mikronukleus testa kod ispitanika prije i nakon postavljanja kompozitnog materijala Vertise Flow dani su u Tablici 15 i Slici 9, rezultati analize varijance u Tablici 16, a Newman-Keuls testa u Tablici 17. Statistički značajna razlika potvrđena je za parametre jedan mikronukleus i broj binuklearnih stanica. Broj stanica s jednim mikronukleusom je najveći nakon 30-dnevne izloženosti dok nakon 180-dnevne izloženosti vrijednost opada gotovo na kontrolnu vrijednost. U slučaju binuklearnih stanica najviše vrijednosti utvrđene su nakon 180-dnevne izloženosti. Newman-Keuls testom potvrđeno je da je učestalost stanica s jednim mikronukleusom statistički značajno viša nakon 7-dnevne i 30-dnevne izloženosti u odnosu na kontrolu i 180 dnevnu izloženost. Broj binuklearnih stanica statistički je značajno viši u odnosu na kontrolu jedino nakon 180-dnevne izloženosti.

Tablica 15. Osnovni statistički parametri za parametre mikronukleus testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Vertise Flow. MN - mikronukleus, X - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija, RSD - relativna standardna devijacija, SP - standardna pogreška, M - medijan. * statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu vrijednost ($p<0,05$).

Vrijeme izloženosti	Statistički parametar	Parametar mikronukleus testa						
		1MN	2MN	Binuklearna stanica	Karioliza	Karioreksa	Most	Pup
0 dana	$\bar{X}$	3,93	0,07	3,00	0,87	0,00	0,00	0,20
	SD	1,53	0,26	2,20	1,06	0,00	0,00	0,41
	RSD	0,39	3,87	0,73	1,22	0,00	0,00	2,07
	SP	0,40	0,07	0,57	0,27	0,00	0,00	0,11
	M	4,00	0,00	3,00	1,00	0,00	0,00	0,00
	Minimum	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maksimum	6,00	1,00	8,00	3,00	0,00	0,00	1,00
7 dana	$\bar{X}$	5,47	0,20	4,47	1,27	0,13	0,20	0,47
	SD	2,00	0,56	2,39	0,96	0,52	0,56	0,64
	RSD	0,37	2,80	0,53	0,76	3,87	2,80	1,37
	SP	0,52	0,14	0,62	0,25	0,13	0,14	0,17
	M	5,00	0,00	4,00	1,00	0,00	0,00	0,00
	Minimum	3,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maksimum	10,00	2,00	8,00	3,00	2,00	2,00	2,00
30 dana	$\bar{X}$	5,53	0,20	4,27	1,53	0,00	0,13	0,40
	SD	1,36	0,41	1,75	0,99	0,00	0,35	0,63
	RSD	0,25	2,07	0,41	0,65	0,00	2,64	1,58
	SP	0,35	0,11	0,45	0,26	0,00	0,09	0,16
	M	6,00	0,00	4,00	1,00	0,00	0,00	0,00
	Minimum	3,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maksimum	7,00	1,00	7,00	3,00	0,00	1,00	2,00
180 dana	$\bar{X}$	4,00	0,00	5,60	1,80	0,00	0,07	0,60
	SD	1,36	0,00	2,29	1,08	0,00	0,26	0,74
	RSD	0,34	0,00	0,41	0,60	0,00	3,87	1,23
	SP	0,35	0,00	0,59	0,28	0,00	0,07	0,19
	M	4,00	0,00	5,00	2,00	0,00	0,00	0,00
	Minimum	2,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maksimum	6,00	0,00	10,00	4,00	0,00	1,00	2,00



Slika 9. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara mikronukleus testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Vertise Flow. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu vrijednost.

Tablica 16. Rezultati analize varijance za parametre mikronukleus testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Vertise Flow. SS - suma kvadrata, D.F. - stupnjevi slobode, MS - varijanca. * statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu vrijednost ($p < 0,05$).

	Izvor varijacije	Između skupina	Unutar skupina	Ukupno	F	p
1 Mikronukleus	SS	35,33	140,4	175,73	4,698	0,005*
	D.F.	3	56	59		
	MS	11,78	2,51			
2 Mikronukleusa	SS	0,45	7,73	8,18	1,086	0,362
	D.F.	3	56	59		
	MS	0,15	0,14			
Binuklearna stanica	SS	51,07	264,27	315,33	3,607	0,019*
	D.F.	3	56	59		
	MS	17,02	4,72			
Karioliza	SS	7,13	58,8	65,93	2,27	0,091
	D.F.	3	56	59		
	MS	2,38	1,05			
Karioreksa	SS	0,2	3,73	3,93	1	0,4
	D.F.	3	56	59		
	MS	0,07	0,07			
Most	SS	0,33	7,07	7,4	0,881	0,457
	D.F.	3	56	59		
	MS	0,11	0,13			
Pup	SS	1,25	21,33	22,58	1,094	0,359
	D.F.	3	56	59		
	MS	0,42	0,38			

Tablica 17. Rezultati Student-Newman-Keuls testa za parametre mikronukleus testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Vertise Flow. Grupirajuća varijabla - vrijeme izloženosti restaurativnom materijalu: 1 - 0 dana, 2 - 7 dana, 3 - 30 dana, 4 - 180 dana.

Skupina	1 Mikronukleus		Broj binuklearnih stanica	
	$\bar{X}$	Statistički značajno različit ($p < 0,05$)	$\bar{X}$	Statistički značajno različit ($p < 0,05$)
(1) 1	3,93	(2)(3)	3,00	(4)
(2) 2	5,47	(1)(4)	4,47	
(3) 3	5,53	(1)(4)	4,27	
(4) 4	4,00	(2)(3)	5,60	(1)

3.2.3. Usporedba tretmana

Analiza varijance grupiranjem prema vremenu izloženosti i vrsti tretmana pokazala je statistički značajnu razliku između testiranih skupina za oba parametra komet testa (Tablica 18). Newman-Keuls testom nije utvrđena statistički značajna razlika (Tablica 19) između dva kompozitna materijala za isto vrijeme izloženosti ni za jedan parametar komet testa.

Tablica 18. Rezultati analize varijance za parametre komet testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Kalore i Vertise Flow. SS - suma kvadrata, D.F. - stupnjevi slobode, MS - varijanca. * statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu vrijednost ($p < 0.05$).

Izvor varijacije	Dužina repa			Intenzitet repa		
	SS	D.F.	MS	SS	D.F.	MS
Između skupina	209,10	7	29,87	59,99	7	8,57
Unutar skupina	468,53	112	4,18	122,44	112	1,09
Ukupno	677,64	119		182,44	119	
F		7,141			7,839	
p		< 0,001*			< 0,001*	

Tablica 19. Rezultati Student-Newman-Keuls testa za parametre komet testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Kalore (K) i Vertise Flow (VF). Grupirajuća varijabla - vrijeme izloženosti restaurativnom materijalu: 1 - 0 dana, 2 - 7 dana, 3 - 30 dana, 4 - 180 dana.

Skupina	Dužina repa		Intenzitet repa	
	$\bar{X}$	Statistički značajno različit ($p < 0,05$)	$\bar{X}$	Statistički značajno različit ($p < 0,05$)
(1) 1-K	18,79	(5)(6)(8)	2,60	(3)(4)(5)(6)(7)(8)
(2) 1-VF	18,64	(5)(6)(8)	2,59	(3)(4)(5)(6)(7)(8)
(3) 2-K	19,28	(5)(6)(8)	3,53	(1)(2)
(4) 2-VF	19,19	(5)(6)(8)	3,80	(1)(2)
(5) 3-K	22,01	(1)(2)(3)(4)	4,35	(1)(2)
(6) 3-VF	21,68	(1)(2)(3)(4)	4,47	(1)(2)
(7) 4-K	20,64		4,05	(1)(2)
(8) 4-VF	21,59	(1)(2)(3)(4)	4,33	(1)(2)

U slučaju mikronukleus testa analizom varijance potvrđena je statistički značajna razlika između skupina (grupiranih po vremenu izloženosti i vrsti tretmana) za parametre jedan mikronukleus, karioliza i broj nuklearnih pupova (Tablica 20). Ni za jedan od ova tri parametra (Tablica 21) nije potvrđena statistički značajna razlika između dva kompozitna materijala za isto vrijeme izloženosti.

Tablica 20. Rezultati analize varijance za parametre mikronukleus testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Kalore (K) i Vertise Flow (VF). SS - suma kvadrata, D.F. - stupnjevi slobode, MS - varijanca. * statistički značajno različit u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$).

	Izvor varijacije	Između skupina	Unutar skupina	Ukupno	F	p
1 Mikronukleus	SS	160,39	521,2	681,59	4,924	< 0,001*
	D.F.	7	112	119		
	MS	22,91	4,65			
2 Mikronukleusa	SS	1,17	26,13	27,3	0,714	0,66
	D.F.	7	112	119		
	MS	0,17	0,23			
Binuklearna stanica	SS	71,93	570,637	642,593	2,017	0,059
	D.F.	7	112	119		
	MS	10,273	5,093			
Karioliza	SS	31,53	96,237	127,79	5,24	< 0,001*
	D.F.	7	112	119		
	MS	4,5	0,89			
Karioreksa	SS	1,47	28	29,47	0,838	0,558
	D.F.	7	112	119		
	MS	0,21	0,25			
Most	SS	0,46	9,867	10,326	0,743	0,636
	D.F.	7	112	119		
	MS	0,07	0,09			
Pup	SS	5,03	35,33	40,37	2,279	0,033*
	D.F.	7	112	119		
	MS	0,72	0,32			

Tablica 21. Rezultati Student-Newman-Keuls testa za parametre mikronukleus testa prije i nakon izloženosti ispitanika kompozitnom materijalu Kalore (K) i Vertise Flow (VF). Grupirajuća varijabla - vrijeme izloženosti restaurativnom materijalu: 1 - 0 dana, 2 - 7 dana, 3 - 30 dana, 4 - 180 dana.

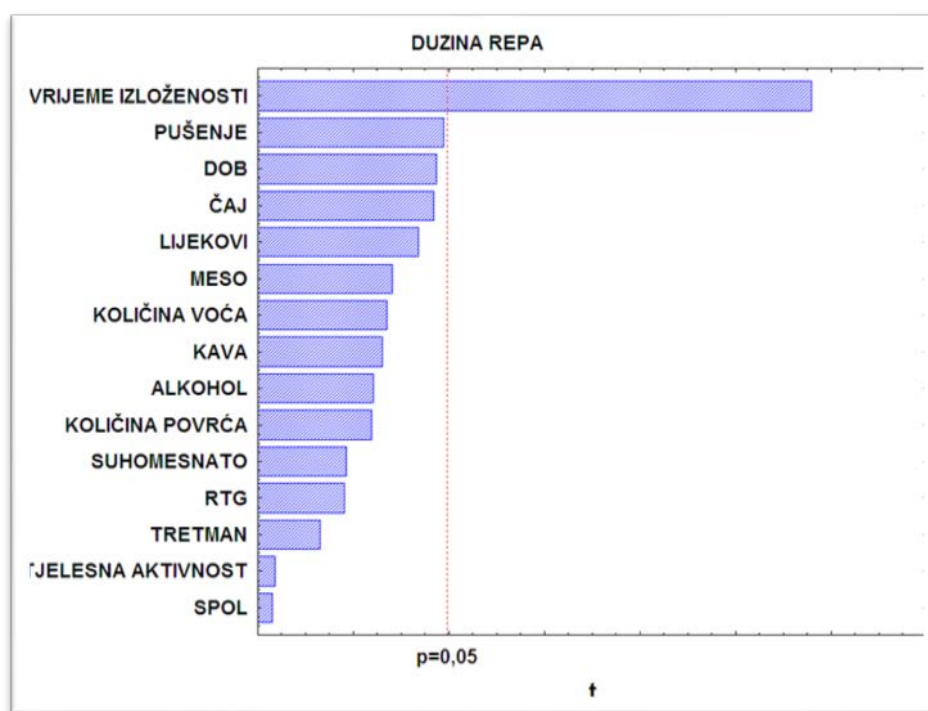
Skupina	Mikronukleus		Karioliza		Pup	
	$\bar{X}$	Statistički značajno različit ($p<0,05$)	$\bar{X}$	Statistički značajno različit ($p<0,05$)	$\bar{X}$	Statistički značajno različit ($p<0,05$)
(1) 1-K	4,00	(3)(5)	0,13	(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)	0,13	(7)
(2) 1-VF	3,93	(3)(5)	0,87	(1)	0,20	(7)
(3) 2-K	7,13	(1)(2)(7)(8)	1,07	(1)	0,40	
(4) 2-VF	5,47		1,27	(1)	0,47	
(5) 3-K	6,47	(1)(2)(7)(8)	1,20	(1)	0,13	(7)
(6) 3-VF	5,53		1,53	(1)	0,40	
(7) 4-K	4,33	(3)(5)	1,80	(1)	0,73	(1)(2)(5)
(8) 4-VF	4,00	(3)(5)	1,80	(1)	0,60	

3.2.4. Napredni regresijski modeli i višestruka regresijska analiza

Ovisnost parametara komet i mikronukleus testa u ukupnoj ispitnoj skupini o svim prediktorskim varijablama utvrđena je generalnim regresijskim modelom i prikazana u obliku Pareto dijagrama. Pareto dijagram ovisnosti dužine repa kometa o prediktorskim varijablama prikazan je na Slici 10. Od testiranih prediktorskih varijabli najveći, statistički značajan utjecaj na dužinu repa ima vrijeme izloženosti kompozitu, a od životnih navika statistički značajan utjecaj ima i pušenje. Rezultati višestruke regresijske (Tablici 22) potvrdili su dobru, statistički značajnu korelaciju [$R=0,58$; $F(15,103)=3,50$; $p=0,000076$] između prediktorskih varijabli i dužine repa. Ova metoda je u potpunosti potvrdila rezultate naprednog regresijskog modela prikazanog u formi Pareto dijagrama. Najveći, statistički značajan doprinos imaju varijable vrijeme izloženosti ($\beta=0,45$; $p=0,000$) i pušenje ($\beta=0,58$; $p=,049$). U slučaju repnog

intenziteta naprednim regresijskim modelom i višestrukom regresijskom analizom (Slika 11, Tablica 23) statistički značajan doprinos utvrđen je za varijable vrijeme izloženosti ($\beta=0,51$; $p=0,000$), količina voća ($\beta=0,99$; $p=0,035$) te alkohol ($\beta=1,05$; $p=0,041$).

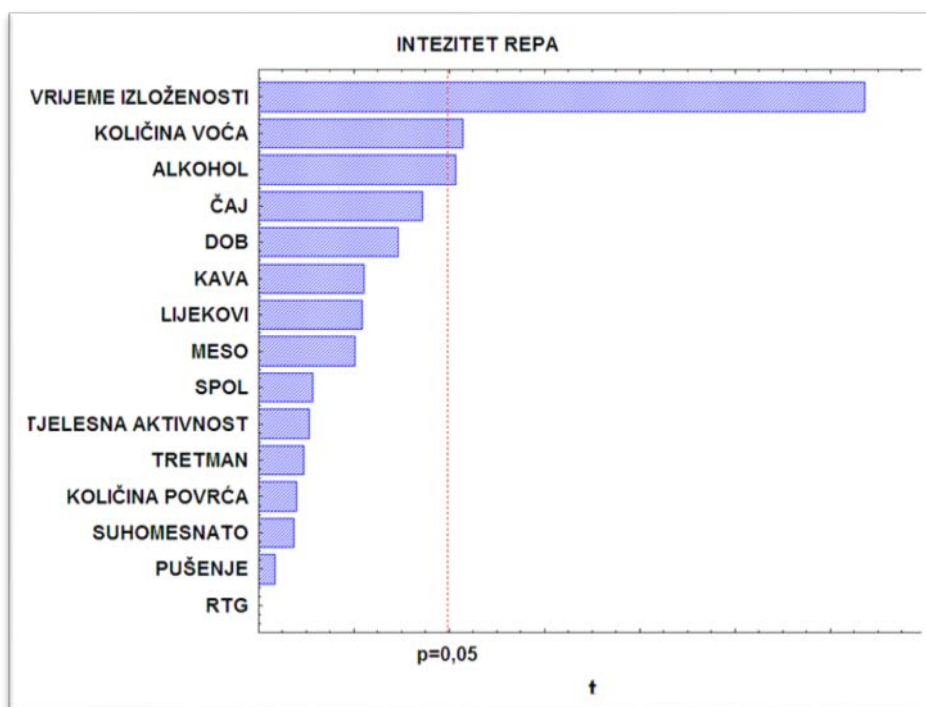
Na incidenciju stanica s mikronukleusom najveći, statistički značajan utjecaj ima vrsta materijala ($\beta=0,24$; $p=0,014$) (Slika 12, Tablica 24). Vrijeme izloženosti ($\beta=0,47$; $p=0,000$) i tretman ($\beta=0,25$; $p=0,004$) imaju statistički značajan učinak na pojavu kariolize kako je to vidljivo iz Pareto dijagrama (Slika 13) dok je višestrukom analizom utvrđeno da osim navedenih varijabli statistički značajan učinak imaju također i dob ispitanika, konzumacija mesa i kave (Tablica 24). Na pojavu binuklearnih stanica objema metodama je potvrđeno da statistički značajan učinak imaju varijable vrijeme izloženosti ($\beta=0,31$; $p=0,000$) i pušenje ($\beta=0,63$; $p=0,043$) (Slika 14, Tablica 26).



Slika 10. Pareto dijagram ovisnosti dužine repa kometa o prediktorskim varijablama.

Tablica 22. Rezultati višestruke regresijske analize ovisnosti dužine repa kometa o prediktorskim varijablama. * statistički značajno, $p < 0,05$.

Prediktorska varijabla	Statistički parametar		
	Beta	t(103)	p
VRIJEME IZLOŽENOSTI	0,45	5,66	0,000000*
TRETMAN	0,06	0,70	0,484414
SPOL	0,11	0,21	0,836802
DOB	0,79	1,91	0,058353
LIJEKOVI	0,22	1,68	0,096633
RTG	0,12	0,89	0,374591
PUŠENJE	0,58	1,99	0,048844*
ALKOHOL	0,62	1,23	0,222081
MESO	1,40	1,45	0,150587
SUHOMESNATO	0,26	0,92	0,357646
KOLIČINA POVRĆA	0,20	1,26	0,212215
KOLIČINA VOĆA	0,64	1,38	0,171247
KAVA	0,74	1,35	0,179872
ČAJ	0,89	1,88	0,062375
TJELESNA AKTIVNOST	0,05	0,25	0,804529
R=0,58; F(15,103)=3,50; p=0,000076*			

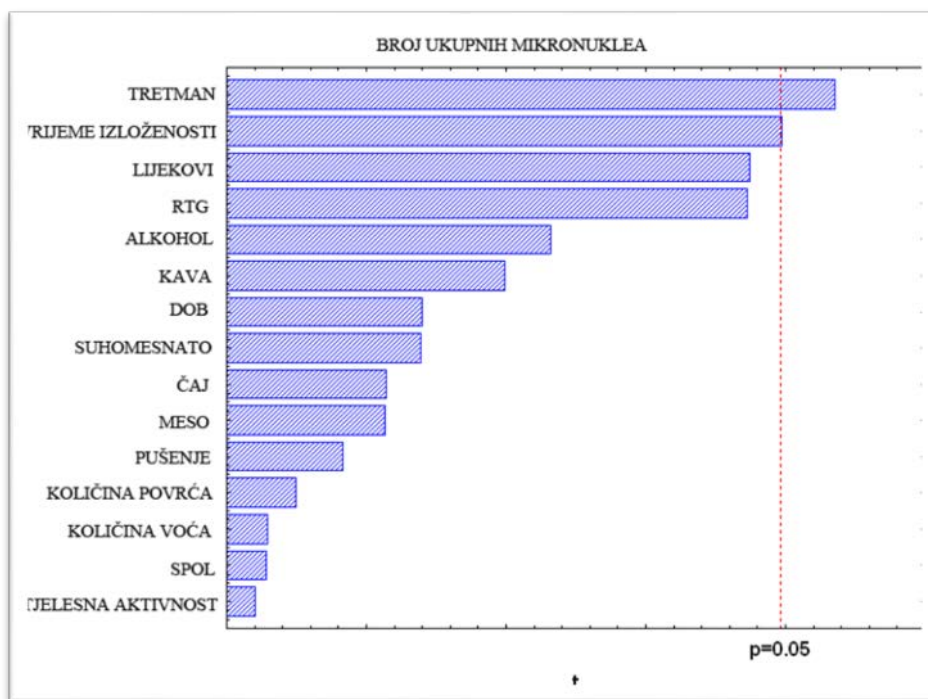


Slika 11. Pareto dijagram ovisnosti intenziteta repa kometa o prediktorskim varijablama.

Tablica 23. Rezultati višestruke regresijske analize ovisnosti intenziteta repa kometa o prediktorskim varijablama. * statistički značajno, $p < 0,05$.

Prediktorska varijabla	Statistički parametar		
	Beta	t(103)	p
VRIJEME IZLOŽENOSTI	0,51	6,36	0,000000*
TRETMAN	0,04	0,47	0,638827
SPOL	0,31	0,57	0,571683
DOB	0,60	1,47	0,145575
LIJEKOVI	0,14	1,09	0,279325
RTG	0,00	0,01	0,996008
PUŠENJE	0,05	0,17	0,864316
ALKOHOL	1,05	2,07	0,040931*
MESO	0,97	1,01	0,312958
SUHOMESNATO	0,10	0,37	0,710990

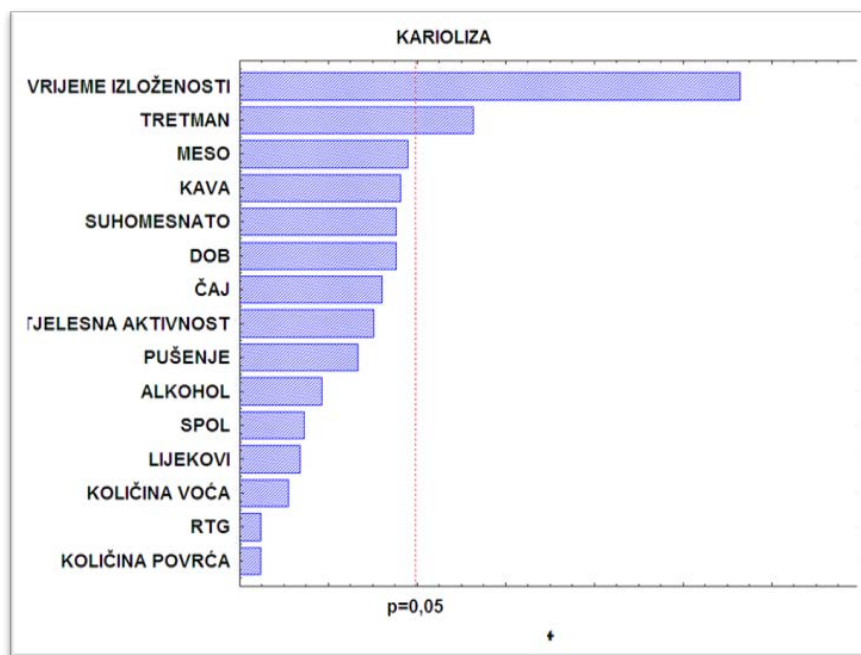
Prediktorska varijabla	Statistički parametar		
	Beta	t(103)	p
KOLIČINA POVRĆA	0,06	0,39	0,694082
KOLIČINA VOĆA	0,99	2,14	0,034917*
KAVA	0,60	1,11	0,269807
ČAJ	0,81	1,72	0,088369
TJELESNA AKTIVNOST	0,10	0,53	0,600551
R=0,59; F(15,103)=3,62; p=0,000048*			



Slika 12. Pareto dijagram ovisnosti pojavnosti stanica s jednim mikronukleusom o prediktorskim varijablama.

Tablica 24. Rezultati višestruke regresijske ovisnosti pojavnosti stanica s mikronukleusom o prediktorskim varijablama. * statistički značajno, $p < 0,05$.

Prediktorska varijabla	Statistički parametar		
	Beta	t(103)	p
VRIJEME IZLOŽENOSTI	0,29	1,99	0,049452*
TRETMAN	0,21	2,18	0,031643*
SPOL	0,09	0,14	0,888840
DOB	0,32	0,70	0,485197
LIJEKOVI	0,27	1,87	0,063824
RTG	0,95	1,86	0,065435
PUŠENJE	0,13	0,42	0,678814
ALKOHOL	0,65	1,16	0,249117
MESO	0,61	0,57	0,571384
SUHOMESNATO	0,22	0,69	0,489577
KOLIČINA POVRĆA	0,04	0,25	0,804716
KOLIČINA VOĆA	0,01	0,15	0,883634
KAVA	0,60	1,00	0,321432
ČAJ	0,30	0,57	0,569914
TJELESNA AKTIVNOST	0,07	0,15	0,917654
R= 0,47; F(15,104)=1,93; p=0,026083*			

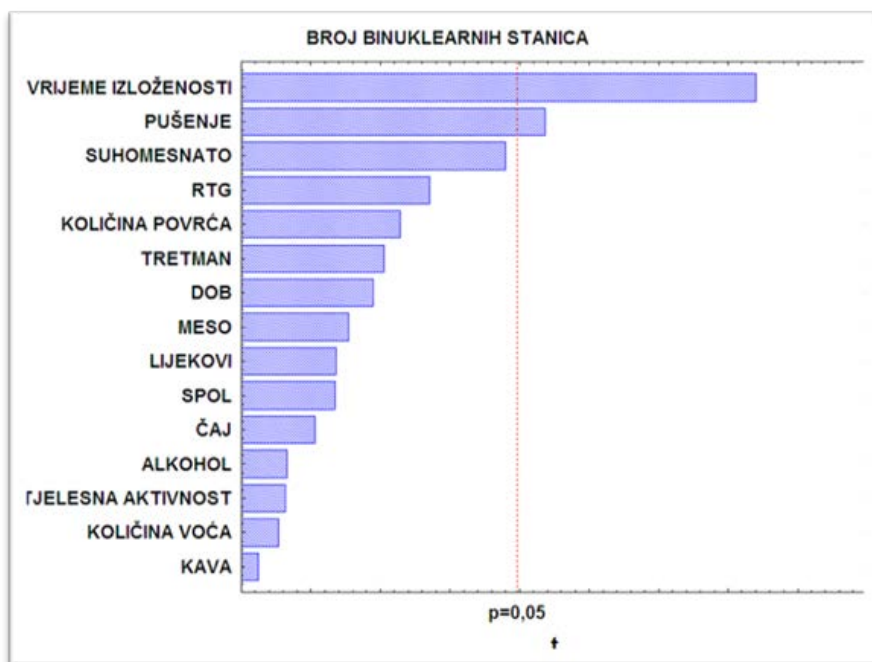


Slika 13. Pareto dijagram ovisnosti pojavnosti kariolize o prediktorskim varijablama.

Tablica 25. Rezultati višestruke regresijske ovisnosti pojavnosti kariolize o prediktorskim varijablama. * statistički značajno, $p < 0,05$.

Prediktorska varijabla	Statistički parametar		
	Beta	t(103)	p
VRIJEME IZLOŽENOSTI	0,47	5,97	0,000000*
TRETMAN	0,25	2,90	0,004515*
SPOL	0,52	0,96	0,339971
DOB	0,84	2,10	0,038150*
LIJEKOVI	0,09	0,68	0,495686
RTG	0,04	0,30	0,764449
PUŠENJE	0,47	1,67	0,098329
ALKOHOL	0,52	1,05	0,295624
MESO	2,02	2,16	0,033306*
SUHOMESNATO	0,50	1,81	0,073064

Prediktorska varijabla	Statistički parametar		
	Beta	t(103)	p
KOLIČINA POVRĆA	0,02	0,15	0,880854
KOLIČINA VOĆA	0,32	0,71	0,477997
KAVA	1,12	2,11	0,036881*
ČAJ	0,89	1,93	0,056069
TJELESNA AKTIVNOST	0,35	1,80	0,074939
R= 0,61; F(15,103)=4,13; p= 0,000007*			



Slika 14. Pareto dijagram ovisnosti pojavnosti binuklearnih stanica o prediktorskim varijablama.

Tablica 26. Rezultati višestruke regresijske ovisnosti pojavnosti binuklearnih stanica o prediktorskim varijablama. * statistički značajno, $p < 0,05$.

Prediktorska varijabla	Statistički parametar		
	Beta	t(103)	p
VRIJEME IZLOŽENOSTI	0,31	3,73	0,000316*
TRETMAN	0,09	0,95	0,343972
SPOL	0,42	0,73	0,468438
DOB	0,36	0,85	0,399289
LIJEKOVI	0,09	0,68	0,499528
RTG	0,18	1,33	0,187186
PUŠENJE	0,63	2,06	0,041465*
ALKOHOL	0,16	0,30	0,767159
MESO	0,70	0,70	0,485541
SUHOMESNATO	0,56	1,89	0,061529
KOLIČINA POVRĆA	0,20	1,22	0,224696
KOLIČINA VOĆA	0,15	0,31	0,760306
KAVA	0,02	0,04	0,967418
ČAJ	0,21	0,43	0,664492
TJELESNA AKTIVNOST	0,08	0,39	0,700161
R= 0,53; F(15,103)=2,70 p=0,001640*			

4. RASPRAVA

4.1. Citotoksičan i genotoksičan učinak kompozitnih materijala u uvjetima *ex vivo*

Upotreba kompozitnih materijala u svrhu zamjene oštećenih i izgubljenih tvrdih zubnih tkiva naširoko je rasprostranjena u restaurativnoj dentalnoj medicini. Unatoč rastućoj popularnosti briga oko moguće intrinzične toksičnosti zbog činjenice da otpuštaju sastojke i dalje je velika. Svi dentalni biomaterijali oslobađaju tvari u oralno i radno okruženje u različitoj mjeri (130). Sastojci se otpuštaju za vrijeme postavljanja i polimerizacije te kasnije kao posljedica degradacije materijala. Ispiranje komponenti iz dentalnih kompozita je pod utjecajem kemijskog sastava materijala, stupanja konverzije, stupanja umreženja polimerne mreže, obrade površine i uvjeta koji vladaju unutar usne šupljine. Degradaciju kompozita u oralnom okolišu uzrokuju termalne promjene, komponente sline, prehrambene navike, žvakanje i oralni mikroorganizmi (95). Između okoline i materijala vlada interakcija u oba smjera, materijal djeluje na biološki okoliš i okoliš djeluje na materijal. Biološka reakcija može biti lokalna ili udaljena od mjesta primjene (sistemska) (130, 168). Lokalno djelovanje se najviše očituje na stanicama pulpe, gingive i oralne mukoze (53, 67, 169). Međusobna interakcija materijala i okolne ne mora uvijek imati vidljive kliničke simptome, ali su zato brojna istraživanja pokazala estrogeno, teratogeno, mutageno, genotoksično i citotoksično djelovanje kompozitnih materijala i njihovih sastojaka (23, 53, 54, 137, 141, 146, 170).

Svrha *ex vivo* dijela istraživanja bila je utvrditi koliko su suvremeni kompozitni materijali (Kalore, Vertise Flow) biokompatibilni i sigurni za kliničko korištenje kroz procjenu njihovog citotoksičnog (diferencijalno bojanje akridin-narančastom bojom i etidijevim bromidom) i/ili genotoksičnog (komet test) učinka ovisno u primijenjenoj koncentraciji (20 mg/ml, 40 mg/ml). Kako su u fiziološkom stanju fibroblasti gingive i pulpe visoko izloženi monomerima/komonomerima nakon puštanja iz kompozitnih materijala u usnoj šupljini (171-173), odlučili smo se koristiti primarne kulture humanih fibroblasta gingive i pulpe. Neizravno prekrivanje ljudske zubne pulpe kompozitnim materijalom uzrokuje morfološke promjene u odontoblastima i upalu tkiva u 22% slučajeva, dok izravno prekrivanje uporabom dentinskih adheziva i kompozitnog materijala dovodi do stvaranja umjerene do jake upale s apscesima (174). Tretiranje stanica s citotoksičnim spojem može dovesti do stanične smrti, apoptoze i nekroze. Apoptoza ili "programirana stanična smrt" je fiziološki proces kojim se uklanjanja ozlijeđena ili nepotrebna stanica na kontrolirani način. Nasuprot tome, nekroza ili

"slučajna stanična smrti" uzrokovana je izrazitim smrtonosnim oštećenjem stanice, koje se javlja u kombinaciji s upalom tkiva i kliničkim simptomima. Tijekom kasne faze apoptoze, stanice mogu nabubriti što naposljetku rezultira lizom stanice. To se događa prije svega u kulturama stanica jer nedostaju fagociti. Kasna faza *ex vivo* apoptoze može se opisati kao "sekundarna nekroza" ili apoptoza nekroze (137).

Istraživanja toksičnosti dentalnih materijala izvode se obično na jednu ili više tvari koje djeluju pojedinačno ili u obliku komercijalnih preparata, kod kojih je točan sadržaj i tehnologija proizvodnje povjerljivi podatak, dobro čuvan od strane proizvođača. Cito/genotoksičnost kompozitnih materijala ovisi o oslobođenim supstancijama [nevezanim slobodnim monomerima i topljivim komponentama oslobođenim zbog degradacije i erozije tijekom vremena (175)], što je u ovisnosti o njihovom sastavu (135). Monomeri (TEGDMA, HEMA, UDMA i Bis-GMA) mogu se otpustiti iz kompozita i adheziva te utjecati na aktivnost stanica pulpe. Količina otpuštenih monomera koja dođe do zubne pulpe ovisi o topljivosti monomera u tkivnoj tekućini ili dentinu, dubini karijesne lezije i preostaloj debljini dentina nakon uklanjanja karijesa (174). Monomeri se dalje mogu metabolirati u reaktivne međuprodukte poput meta kiseline, 2,3-epoksi-2-metil propionske kiseline, metilestera 2,3-epoksi-2-metil propionske kiseline, bisfenol-A-bis-etera koji stimuliraju stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva, a koji potom mogu oštetiti DNK, proteine i staničnu membranu te aktivirati brojne transdukcijske putove koji vode citotoksičnosti, genotoksičnosti i upali tkiva (170). Dok TEGDMA i HEMA potiču promjene unutar staničnog ciklusa i apoptozu putem proizvodnje ROS, Bis-GMA mijenja stanični ciklus mijenjajući ekspresiju gena i funkcije proteinima (174).

Rezultati testa citotoksičnosti u ovom radu pokazuju kako samoadherirajući tekući kompozitni materijal Vertise Flow u većoj koncentraciji (40 mg/ml) u kulturi fibroblasta pulpe dovodi do smanjene stanične vijabilnosti i povećanja broja stanica u ranoj apoptozi. Slične rezultate za Vertise Flow dobili smo i u kulturi fibroblasta gingive, smanjenu staničnu vijabilnost te povećan broj stanica u ranoj apoptozi i nekrozi. Umjerenu citotoksičnost Vertise Flow dokazali su i Bektas i sur. (176) testom difuzije u agaru s manje od 20% liziranih stanica. Vertise Flow se temelji na tradicionalnom metakrilatnom sustavu s dodatkom samojetkajućeg adhezivnog sustava OptiBond All-in-One (Kerr Corporation, Orange, CA, SAD). OptiBond All-in-One u svom sastavu ima dodani kisel monomer, glicerol fosfat dimetakrilat, koji se obično nalazi u sastavu dentinskih adheziva, te HEMA i Bis-GMA.

Bis-GMA izaziva citotoksičnost na V79 stanica, ljudskim limfocitima, stanicama ljudske zubne pulpe, fibroblastima ljudske gingive, stanicama keratinocita, mišjim makrofazima (2, 139, 150, 153, 174, 177, 178). Na mišjim makrofazima u niskoj koncentraciji izaziva ranu apoptozu i nekrozu, dok u visokim koncentracijama izaziva nekrozu i kasnu apoptozu (178). Na humanim fibroblastima pulpe i gingive u nižim koncentracijama izaziva nekrozu, a pri višima apoptozu (137, 174). Bis-GMA inducira apoptozu u stanicama pulpe u koncentraciji većoj od 0,075 mM pri čemu dolazi do oslobađanja prostaglandina i reaktivnih kisikovih spojeva (170). Engelmann i sur. (137) pokazali su kako Bis-GMA u koncentracijama > 0,1 mM uzrokuje ekstremno opadanje razine reduciranog unutarstaničnog glutationa i apoptozu. Citotoksičnost i genotoksičnost Bis-GMA je viša nego momomera UDMA, TEGDMA i HEMA (151). Dokazano je kako HEMA, koja se isto tako nalazi u sastavu adhezivnog sustava dodanog u tehnološkoj proizvodnji kompozita Vertise Flow, uzrokuje citotoksičan učinak u kulturi humanih fibroblasta gingive te da je taj učinak više posljedica produkata razgradnje nego same HEMA (127). Szczepanska i sur. (127) zabilježili su umjereno, ali statistički značajno smanjenje vijabilnosti stanica u kulturi humanih fibroblasta gingive te povećan broj stanica u apoptozi, a sve ovisno o koncentraciji HEMA. Kako ne postoje istraživanja citotoksičnosti Vertise Flow na humanim stanicama *ex vivo*, toksičnost materijala možemo promatrati u okviru toksičnosti pojedinih sastojaka od kojih se materijal sastoji. Dobivene rezultate ovim istraživanjem možemo usporediti s onima što su ih dobili Chang i sur. (175) za više koncentracije Bis-GMA u kulturi fibroblasta pulpe, te Szczepanska i sur. (127) za HEMA u kulturi fibroblasta gingive.

Nano-hibridni kompozitni materijal Kalore u koncentraciji 40 mg/ml u kulturi stanica humanih fibroblasta pulpe dovodi do smanjene staničnosti te povećanja broja stanica u ranoj apoptozi i nekrozi. Kalore u kulturi fibroblasta gingive ne dovodi do značajne stanične smrti, već dobivene vrijednosti odgovaraju onima kod negativne kulture. Iz ovoga možemo zaključiti kako su fibroblasti pulpe više osjetljivi na djelovanje kompozitnih materijala u odnosu na fibroblaste gingive, što je korelaciji sa podacima koje navode Geurtsen i sur. (23). Kalore se temelji na novom DX-511 i UDMA monomeru. Nova Dupontova molekula, DX-511 se temelji na uretan dimetakrilatu. Ovaj monomer sastoji se od duge krute jezgre s fleksibilnim bočnim lancima i manjim brojem dvostrukih veza između atoma ugljika. Molekularna težina monomera je 895 Da, što je dvostruko više od Bis-GMA (512 Da) ili UDMA (471 Da) (179). Toksičnost Kalore može se vezati uz monomer UDMA. UDMA uzrokuje citotoksičnost u nekoliko tipova stanica, stanicama ovarija kineskog hrčka,

stanicama humanih fibroblasta gingive i humanim limfocitima (76, 157, 180, 181). Chang i sur. (181) su na stanicama ovarija kineskog hrčka pokazali kako UDMA dovodi do smanjenja stanične vijabilnosti ovisno o koncentraciji. Kod stanica tretiranih s 0,1 mM i 0,25 mM UDMA zapažene su morfološke promjene, došlo je do proširenja i produljenja staničnog tijela čime se odražava gubitak većine funkcija unutar stanice. UDMA inducira staničnu smrt u koncentraciji 0,25 mM pri čemu su rano apoptotične stanice činile 23% ukupnih stanica, a kasno apoptotične stanice ili stanice u nekrozi oko 45%. Reichl i sur. (158) pokazali su kako UDMA inducira uglavnom nekrozu u stanicama ljudskih fibroblasta gingive, dok je broj stanica u apoptozi bio malen. U istraživanju na humanim limfocitima Poplawski i sur. (76) uočili su sposobnost UDMA da izazva apoptozu, a u obzir uzimaju dvije mogućnosti koje bi mogle dovesti do toga: (a) UDMA može djelovati kao genotoksični agens tako što potiče DNK oštećenja koja narušavaju fiziologiju DNK, a što kasnije kulminira indukcijom apoptoze i (b) razgradnjom UDMA što dovodi do poremećaja redoks potencijala na membrani mitohondrija u stanici.

Komet test je korišten za otkrivanje indukcije oštećenja DNK u stanicama fibroblasta nakon 14 dana tretiranja kultura kompozitnim materijalima. Rezultati su pokazali kako su oštećenja DNK inducirana u svim ispitivanim koncentracijama kod testiranih materijala, te da se genotoksični učinak povećava s povećanjem koncentracije (Tablica 4 i 5). Verise Flow je u kulturi stanica pulpe doveo do statistički značajnog povećanja intenziteta repa ($p < 0,01$) za obje testirane koncentracije, dok je u kulturi gingive doveo do značajnog povećanja ($p < 0,05$) intenziteta i dužine repa. Nano-hibridni kompozitni materijal Kalore je u kulturi fibroblasta gingive doveo do značajnog povećanja ($p < 0,01$) dužine repa za obje testirane koncentracije, a u kulturi stanica pulpe do povećanja ($p < 0,01$) oba testirana parametra kometa, intenzitet i dužina repa. Iz ovih rezultata možemo zaključiti kako oba testirana kompozitna materijala izazivaju genotoksično oštećenje na fibroblastima gingive i pulpe s time da je oštećenje veće u stanicama pulpe. Jedna od naših hipoteza bila je kako bi veći genotoksični učinak trebao pokazati tekući samoadherirajući kompozitni materijal Vertise Flow. Međutim ako se usporede dva materijala međusobno, u obje kulture i koncentracije, Kalore je pokazao veće povećanje dužine repa ($p < 0,01$) u odnosu na Verise Flow.

Kompozitni materijali mogu otpustiti velike količine metakrilata i njihovih metabolita u vodenom okruženju nedugo nakon polimerizacije (74). Nakon toga, manje količine tih istih komponenti mogu se otpustiti i tijekom dužeg vremenskog razdoblja (125, 182). Ovi spojevi mogu izazvati cito i genotoksični učinak u stanicama usne šupljine, pojedinačno ili u

kombinaciji. Dakle, kombinacija raznih pojedinih otpuštenih komponenti može generirati dugoročne toksične učinke, čak i u niskim ili netoksičnim koncentracijama, koje mogu uzrokovati kroničnu upalnu reakciju zubne pulpe ili drugih oralnih tkiva (183).

Genotoksičnost kompozitnih materijala može se obrazložiti u odnosu na toksičnost njihovih osnovnih komponenti, metakrilatnih monomera (50, 76, 138, 139, 141, 150). Metabolizam dentalnih metakrilata može dovesti do stvaranja epoksida poput 2,3-epoksimetakrilne kiseline, koja je pronađena kao posrednik u metabolizmu metakrilne kiseline (51, 184). Epoksidi se smatraju vrlo toksičnim (pretežno kancerogenim/mutagenim) agentima koji mogu izazvati dvostruke DNK lomove. Ako takva oštećenja ostanu nepopravljena, mogu uzrokovati smrt stanice ili ako se krivo poprave mogu dovesti do kromosomskih aberacija i genomske nestabilnosti (51).

Bis-GMA, HEMA, TEGDMA i UDMA uzrokuju DNK oštećenje u stanicama humanih limfocita i žlijezda slinovnica (138, 139). Urcan i sur. (150, 172) su testirali cito i genotoksičnost Bis-GMA, HEMA, TEGDMA i UDMA na fibroblastima gingive gama-H2AX testom, te pokazali kako citotoksičan i genotoksičan učinak pada ovim redoslijedom Bis-GMA > UDMA > TEGDMA > HEMA. U nekoliko studija promatrao se genotoksični učinak dimetakrilatnih monomera na stanice fibroblasta gingive komet testom (51, 185, 186). Tako su Blasiak i sur. (186) neutralnim komet testom pokazali kako dentinski adhezivi koju u sastavu imaju 45% HEMA i 55% Bis-GMA, u koncentracijama do 0,2 mM Bis-GMA imaju sposobnost izazvati oštećenje DNK. Oni su gledali i mogućnost popravka DNK oštećenja, te dobili rezultate koji govore kako HEMA/Bis-GMA mogu spriječiti popravak, međutim mehanizam djelovanja koji sprječava popravak nastalog oštećenja nisu razjasnili. Szczepanska i sur. (127) su u svom istraživanju na fibroblastima gingive gledali genotoksični utjecaj HEMA i metakrilne kiseline, te rezultatima dobivenim alkalnim i neutralnim komet testom pokazali kako obje komponente uzrokuju fragmentaciju molekule DNK. Opazili su značajno povećanje intenziteta repa u 1 mM i većim koncentracijama, s time da je efekt koji je izazvala HEMA bio veći u odnosu na metakrilnu kiselinu, među razlika među njima nije bila statistički značajna. Durner i sur. (51) uspoređivali su genotoksičnost monomera TEGDMA, HEMA, Bis-GMA u odnosu na RTG zračenje koje se koristi u dentalnoj radiografiji i terapiji tumora. Bis-GMA, TEGDMA, HEMA i metakrilna kiselina u koncentraciji od 10 mM, koju nije moguće postići u fiziološkim uvjetima, ne izazivaju oštećenja u DNK molekuli. Koncentracija od 0,25 mM Bis-GMA izaziva oštećenja koja

odgovaraju oštećenjima uzrokovanim jednostrukom dozom od 4 Gy koja se koristi u terapiji tumora.

Oba materijala koja smo koristili u ovom istraživanju pokazala su citotoksični i genotoksični potencijal. Vertise Flow je dominantno pokazao citotoksično djelovanje, dok Kalore pokazao viši genotoksični učinak na fibroblastima pulpe i gingive. Citotoksičnost i genotoksičnost se pokazala ovisna o koncentraciji, viša koncentracija izaziva veću toksičnost. Kao što se očekivalo, stanice pulpe bile su osjetljivije na izloženost kompozitnim materijalima u odnosu na fibroblaste gingive. S obzirom na činjenicu da testirani kompozitni materijali ostaju u dugotrajnom kontaktu s živim tkivom, daljnja istraživanja koja ispituju moguće kancerogene učinke kompozitnih materijala su potrebna.

4.2. Genotoksični učinak kompozitnih materijala u uvjetima *in vivo*

Svrha drugog dijela istraživanja bila je procjena citotoksičnog i genotoksičnog učinka kompozitnih materijala na gingivne stanice u neposrednoj blizini dentalne restauracije dvjema različitim metodama, komet i mikronukleus testom. Komet test otkriva primarna, popravljiva oštećenja u kratkom vremenskom razdoblju, dok mikronukleus test otkriva oštećenja na kromosomskoj razini koja se dovode u vezu s rizikom po zdravlje (65, 187). Prospektivno, longitudinalno istraživanje trajalo je šest mjeseci, a dvije skupine pacijenata bile su tretirane dvama različitim kompozitnim materijalima koje smo koristili i u *ex vivo* dijelu istraživanja, Kalore i Vertise Flow.

Usna šupljina početni je dio probavnog i dišnog sustava, a njen sadržaj je više nego kompleksan. Ljudska slina ima više funkcija, a njen sastav je pod utjecajem brojnih unutarnjih i vanjskih parametara. Tekući sadržaj usne šupljine sastoji se od sline koja sadrži brojne biološki aktivne tvari (enzime, proteine, hormone), epitelne stanice, krvne elemente i bakterije. Usna šupljina je isto tako podložna promjenama temperature i pH. Svi ti faktori zajedno pridonose degradaciji dentalnih restaurativnih materijala. Stanice usne šupljine su neprestano izložene topljivim komponentama dentalnih materijala, stoga je njihova biokompatibilnost od primarne važnosti za uspjeh restaurativnog tretmana. *Ex vivo* studije provode se pod strogo kontroliranim uvjetima i ne mogu oponašati situaciju *in vivo*. *In vivo* istraživanja nije moguće standardizirati jer unutar usne šupljine mnogobrojni čimbenici mogu utjecati na ispitivani materijal, tako da kod ovakve vrste ispitivanja svaki pacijent djeluje kao svoja biološka varijacija. Nemogućnost standardiziranja daje istraživanju prednost jer dozvoljava procjenu učinka kompozitnog materijal unutar njegovog prirodnog okoliša. Kako bi prevenirali i uklonili moguće individualne varijacije, pacijente smo redovito kontrolirali i pratili tijekom trajanja istraživanja. Svaki ispitanik služio je kao svoja osobna kontrola, tako da su biološke razlike bile zanemarive u sveukupnoj procjeni.

Komet test temeljen na epitelnim stanicama model je koji koristi stanice koje se daju lako skupiti neinvazivnom tehnikom (188), stoga se smatra uspješnom metodom za testiranje genotoksičnosti na mjestu primarnog kontakta između materijala i živog tkiva. Do sada su brojne *in vivo* studije u svom istraživanju koristile komet test u procjeni toksičnog učinka dentalnih materijala na stanice usne šupljine (8, 53, 189-191), dok se u tek nekoliko njih procjenjivao utjecaj materijala uzimajući u obzir vrijeme proteklo od njegova postavljanja

(65, 191). Topljive komponente kompozitnog materijala pri postavljanju u usnu šupljinu među prvim ciljnim mjestima djelovanja imaju epitelne stanice gingive. U ovom istraživanju uočili smo značajno povećanje dužine i intenziteta repa neovisno o korištenom kompozitnom materijalu. Iako je to povećanje dužine repa značajno, ono je svega 1,2 puta veće u odnosu na kontrolnu vrijednost ($18,9 \pm 1,15 \mu\text{m}$ i $22,02 \pm 2,54 \mu\text{m}$ za kontrolu i 30-dnevnu vrijednost), dok se intenzitet repa povećao za oko 60% ($2,60 \pm 0,87$ i $4,35 \pm 1,27$ za kontrolu i 30-dnevnu vrijednost). Najveće vrijednosti dužine i intenziteta repa izmjerene su nakon 30 dana. Vrijednosti vidljive nakon 180 dana su u laganom opadanju. Temeljem dobivenih rezultata možemo zaključiti kako kompozitni materijali korišteni u ovom radu uzrokuju oštećenje stanica koje postaje značajno nakon 30 dana od postavljanja kompozitnog ispuna. Iako je statistika dokazala značajno povećanje dužine ($20,64 \pm 1,70 \mu\text{m}$) i intenziteta ($4,05 \pm 1,08$) repa nakon 180 dana od postavljanja ispuna, navedene vrijednosti se neznatno razlikuju od kontrolnih vrijednosti uzetih prije postavljanja ispuna te otkrivaju veliku promjenjivost koja dovodi u pitanje biološku relevantnost opaženog povećanja razine primarnih oštećenja DNK. Dakle, vrijednosti dobivene komet testom posljednjeg vremena uzorkovanja ne mogu se smatrati biološki relevantnim pokazateljem genetskog oštećenja s obzirom na izostanak povišene učestalosti mikronukleusa u istim gingivnim staničnim uzorcima. Vrste oštećenja koja registrira komet test podložne su popravku DNK, zbog toga rezultate nesigurne biološke važnosti dobivene komet testom ne bi trebalo uzeti kao apsolutne i posve sigurne indikatore genotoksičnosti i kancerogenog potencijala ispitivanih materijala (54).

Rezultati dobiveni komet testom odgovaraju onima koje su objavili Di Pietro i sur. (54) koji su promatrali učinak dentalnih restaurativnih materijala na humanim limfocitima kod pacijenata s kompozitnim restauracijama u odnosu na one bez restauracija. U tom istraživanju komet testom su dokazali DNK oštećenje dva puta veće u izloženoj skupini u odnosu na kontrolu, kao i to da DNK oštećenje raste s vremenom izloženosti i brojem restauracija u usnoj šupljini. Ovisnost toksičnosti i vremena proteklog od postavljanja ispuna potvrđena je u studiji koju su vodili Ahmed i sur. (169), koji su pokazali kako citotoksičnost u humanim bukalnim i labijalnim stanicama raste s vremenom od postavljanja kompozitnog ispuna, za razliku od amalgamskih ispuna koji su najveću toksičnost pokazali u prvim satima nakon postavljanja.

Mjerenje učestalosti mikronukleusa široko je korišten biomarker u procjeni citogenetskog oštećenja. Mikronukleus sadrži nepopravljivo oštećenje kromosoma poput kromosomskih lomova, acentričnih ulomaka ili cijelih kromosoma zaostalih u anafazi koji se nisu ugradili u

jezgre stanica kćeri (192). Formirani mikronukleus uglavnom bude istisnut iz stanice ostavljajući manjak u genetskom materijalu koji se nalazi unutar mikronukleusa ili se stanica s mikronukleusom eliminira procesom apoptoze. Za razliku od primarnog oštećenja kojeg registrira komet test, prisutnost mikronukleusa pokazuje nepopravljivu genomsku nestabilnosti. Glavne prednosti mikronukleus testa su njegova jednostavnost analize preparata, ograničeni troškovi te ono što je najviše bitno, podudarnost rezultata s rizikom od razvoja neoplazija (55, 59). Do sada su mnogi istraživači u svom radu koristili mikronukleus test kako bi se procijenili genotoksičnost dentalnih materijala, bilo samostalno (60, 66, 67) ili u kombinaciji s komet testom (53, 61, 65). Mikronukleus test na oljuštenim gingivnim epitelnim stanicama omogućava nam da rasvijetlimo citotoksičan i genotoksičan učinak kompozitnih materijala izravno u ciljnom tkivu, epitelu gingive. Značajan porast u broju stanica s mikronukleusom, kariolizom i nuklearnim pupovima potvrđen je u ispitanika koji su tretirani nano-hibridnim kompozitnim materijalom Kalore. Najveći broj stanica s mikronukleusom zabilježen je nakon sedam i trideset dana od postavljanja ispuna, dok se smanjio na kontrolnu vrijednosti nakon 180 dana izlaganja. Najviša vrijednost broja pupova utvrđena je nakon 180 dana izlaganja. U isto vrijeme, u ispitanika tretiranih s Vertise Flow tekućim samoadherirajućim kompozitom, zabilježeno je značajno povećanje broja binuklearnih stanica, dok je u vremenu sedam i trideset dana od početka izlaganja, opaženo i značajno povećanje broja stanica s mikronukleusom. Ovi rezultati su u skladu s onima koje su dobili Bloching i sur. (67), Rezende i sur. (66) i Vitalli i sur. (53). Bloching i sur. (67) proučavali su kliničku primjenu mikronukleus testa s ciljem procjene moguće povezanosti između spomenutog citogenetskog oštećenja i oralnog statusa. Tako su otkrili povećan broj stanica s mikronukleusom u pacijenata s kompozitnim ispunima. Slično tome, dokazao je i Rezende sa sur. (66), koji su otkrili utjecaj restaurativnih dentalnih materijala na cjelovitost genoma u bukalnim stanicama. Primijetili su kako se brojnost binuklearnih stanica povećava kod djece koja su istovremeno tretirana kompozitnim materijalom i cementom, što nisu uočili i za one koji su bili tretirani samo s kompozitnim materijalom. Visalli i sur. (53) pratili su genotoksičan učinak restaurativnih dentalni materijala na bukalnu sluznicu. Njihovi rezultati govore kako je broj mikronukleusnih tvorbi značajno veći u nosioca amalgamskih i kompozitnih ispuna u odnosu na kontrolu koja nije imala ispune u usnoj šupljini. Broj mikronukleusa povećao se za oko 0,26 za svaki restaurirani zub. Pacijenti koji su imali samo amalgamske ispune u usnoj šupljini pokazali su veći broj mikronukleusa u odnosu na one koji su imali samo kompozitne restauracije.

U našem istraživanju uočili smo značajno oštećenje koristeći mikronukleus (učestalost stanica s mikronukleusom) i komet (intenzitet repa) test u vremenu od sedam i trideset dana od postavljanja ispuna. Rezultati su očekivani s obzirom na to da se oštećenje koje vodi formiranju mikronukleusa odvija u bazalnom sloju epitelu, gdje stanice prolaze mitozu. Od trenutka proliferacije u bazalnom sloju te tijekom migracije do površinskog sloja, stanice prolaze progresivnu diferencijaciju sve do trenutka kada se kao spljoštene odljuštene stanice ne otpuste u usnu šupljinu (53). Vrijeme potrebno da se stanica podijeli te prođe kroz cijelo epitelno tkivo je između 10 do 12 dana (193).

Metakrilatni monomeri, HEMA, UDMA i Bis-GMA koji se nalaze u sastavu korištenih kompozitnih materijala, liposolubilne su molekule koje mogu djelovati na staničnu membranu. Ovi mali, hidrofilni i fleksibilni monomeri stvaraju oštećenja u stanici i dovode do stvaranja dvostrukih lomova u DNK molekulama. Dvostruki lomovi DNK mogu dovesti do fragmentacije kromosoma i formiranja mikronukleusne tvorbe (62). Cito i genotoksični učinak monomera može se objasniti posredovanjem u nastanku oksidativnog oštećenja DNK. U mnogim *ex vivo* studijama pokazano je najveće otapanje zaostalih nepolimeriziranih monomera u prvim danima nakon polimerizacije te kako vrijednosti ostaju visoke i u idućih 7 do 28 dana (89, 90, 119, 194). Jedna od malobrojnih *in vivo* studija nije otkrila monomere u slini sedam dana nakon restaurativnog tretmana (194). Uzimajući u obzir kako komet test otkriva primarna oštećenja DNK koja su u većini slučajeva popravljiva, naši rezultati dobiveni nakon 180 dana izlaganja po tretiranju ispitanika ispunom koja lagano opadaju u odnosu na tridesetodnevno izlaganje nemaju značajnu biološku važnost. Kao što je već spomenuto, primarna oštećenja DNK predstavljaju „spremište“ oštećenja iz kojeg se u slučaju da se ne poprave mogu prevesti u mutaciju ili poremećaje u strukturi kromosoma. U kasnijoj fazi diobe stanice, oštećenja rezultiraju stvaranjem mikronukleusa. Dakle, pad broja mikronukleusa na kontrolne vrijednosti nakon 180 dana od postavljanja restauracije pokazuje da su se (1) primarna DNK oštećenja izazvana kompozitnim materijalima učinkovito popravila te (2) da su stanice s mikronukleusom koje u sebi nose nepopravljena oštećenja, a koja su otkrivena u ranijim vremenima uzorkovana učinkovito uklonjene.

Za procjenu citotoksičnog učinka kompozitnih materijala, gledali smo učestalost pojavljivanja kariorekse i kariolize. Karioreksu karakterizira fragmentiranje jezgre te se povezuje uz ranu apoptozu, dok kariolizu obilježava kompletan raspad kromatina zbog djelovanja DNaza (53). Važno je isto tako naglasiti kako citotoksičnost ometa stvaranje mikronukleusa jer zaustavlja stanični ciklus i diobu, a što je preduvjet za ispoljavanje

oštećenja u obliku mikronuklusa (195). Naši rezultati pokazuju kako kompozitni materijali izazivaju staničnu smrti, kako je naznačeno prema statistički značajnim razlikama ($p < 0,05$) između vrijednosti prije i nakon sedam, 30 i 180 dana od izloženosti Kalore kompozitnom materijalu. Isto nije uočeno za Vertise Flow tekući kompozitni materijal. Objašnjenje za to nalazimo u sastavu materijala. Monomer UDMA, koja je glavni sastojak smolaste matrice Kalore-a i G-Bond-a, pokazuje citotoksično djelovanje (138, 158).

Jedna od malobrojnih *in vivo* studija koja je pratila morfološke promjene (broj, oblik, veličina, omjer citoplazme i jezgre) stanica iz usne šupljine (leukociti, neutrofili, epitelne stanice) sadržanih u brisu sline pacijenata s amalgamskim i kompozitnim restauracijama pokazala je značajne razlike u morfologiji stanica zavisno od tipa ispuna. U stanicama iz sline nositelja amalgamskih ispuna zapažene su promjene koje nisu uočene kod onih s kompozitnim restauracijama. Te stanice bile su veće, nepravilna oblika, nejednakog intenziteta u bojanju citoplazme te promijenjenog omjera jezgre i citoplazme. Stanice dobivene iz sline ispitanika s kompozitnim restauracijama bile su ujednačene veličine i ovalnog oblika (196).

Brojni biološki, ekološki i demografskih čimbenici mogu ometati *in vivo* istraživanje. Nedavno su Møller i sur. (38) objedinili neke od bioloških i ekoloških čimbenika te čimbenike vezane uz stila života koji mogu ometati analizu toksičnosti genotoksina. Medicinski postupci (zračenje, kemikalije), nedostatak mikronutrijenata (folna kiselina), čimbenici vezani uz stil života (alkohol, pušenje, droge, vježba, stres, prehrana) te genetski čimbenici mogu utjecati na oštećenje DNK molekule, a time na genotoksičnost. U ovom istraživanju na oštećenja DNK najveći utjecaj imalo je vrijeme proteklo od postavljanja kompozitnog ispuna. Nismo primijetili nikakve razlike između spolova i različitih dobnih skupina. Među čimbenicima vezanim uz stil života, pušenje i konzumacija alkohola imali su najveći utjecaj na oštećenje DNK. U više studija nađena je i negativna korelacija između unosa alkohola i oštećenja DNK, točnije veća otpornost stanica oralne i gastrointestinalne sluznice osoba s intenzivnijom konzumacijom alkohola spram genotoksičnog učinka (53) sugerirajući veću razinu aktivnosti zaštitnih mehanizama i popravka oštećenja uslijed kontinuiranog genotoksičnog opterećenja. Zapažanja koja smo dobili na temelju rezultata multiple regresijske analize, a vezana uz utjecaj pušenja i konzumaciju alkohola na oštećenje DNK i učestalost pojavljivanja stanica s mikronukleusom su u suglasnosti s onima koje su publicirali Lima sa sur. (197). Oni nisu uočili značajan učinak pušenja i alkohola na pojavu mikronukleusa u stanicama sluznice usne

šupljine. Utjecaj količine alkohola unesenog u organizam na učestalost pojave mikronukleusa u bukalnim stanicama čovjeka nisu pronašli našli ni Visalli i sur. (53).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da kompozitni materijali mogu izazvati genotoksični učinak na gingivnim epitelnim stanicama koje se nalaze uz rub kompozitne restauracije. Iako statistička analiza pokazuje značajan porast u razini primarnih DNK oštećenja komet testom i povećanu učestalost pojave mikronukleusa 7 i 30 dana nakon postavljanja kompozitne restauracije, individualni parametri među pacijentima pokazuju visoku varijabilnost unutar istih vremena uzorkovanja. Šest mjeseci nakon postavljanja restauracije broj mikronukleusa vraća se na kontrolne vrijednosti dobivene uzorkovanjem gingivnih stanica prije postavljanja kompozitnog materijala, što ukazuje na nedostati dugoročni učinak na stabilnost genoma. Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti kako je primijećeno povećano DNK oštećenje privremenog karaktera te kako nema biološku relevantnost.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Kompozitni materijali polimerizirani prema uputama proizvođača pokazuju citotoksičan i genotoksičan učinak u stanicama fibroblasta pulpe i gingive.
2. Tekući samoadherirajući kompozitni materijal pokazao je veći citotoksičan učinak u stanicama fibroblasta pulpe i gingive u odnosu na nano-hibridni kompozitni materijal u uvjetima *ex vivo*.
3. Nano-hibridni kompozitni materijal pokazao je veći genotoksični utjecaj u stanicama fibroblasta pulpe i gingive u odnosu na tekući samoadherirajući kompozitni materijal u uvjetima *ex vivo*.
4. Citotoksični i genotoksični učinak kompozitnih materijal povećava se s povećanjem koncentracije testiranog materijala.
5. Stanice pulpe osjetljivije su na citotoksičan i genotoksičan učinak kompozitnih materijala u odnosu na stanice fibroblasta gingive.
6. Genotoksičan učinak kompozitnih materijala *in vivo* ispitivan komet testom najveći je 30 i 180 dana nakon postavljanja ispuna.
7. Genotoksičan učinak kompozitnih materijalom *in vivo* ispitivan mikronukleus testom najveći je 7 i 30 dana od postavljanja ispuna.
8. Pad broja mikronukleusa na kontrolne vrijednosti nakon 180 dana od postavljanja restauracije ukazuje kako su primarna DNK oštećenja izazvana kompozitnim materijalima učinkovito popravljena te kako su stanice s mikronukleusom koje u sebi nose nepopravljena oštećenja učinkovito uklonjene.
9. Genotoksični učinak kompozitnih materijal *in vivo* je prolaznog karaktera te nema veliku biološku važnost.
10. Kompozitni materijal u svojoj namjeni ostaje dugo vremena u bliskom dodiru s oralnim tkivima (gingiva, pulpa, oralna mukoza) u kojem može doći do degradacije materijala i otpuštanja aktivnih supstancija, stoga su istraživanja moguće toksičnosti u uvjetima *in vivo* neophodna.

6. LITERATURA

1. Anusavice KJ. Phillips science of dental materials philadelphia: Saunders, 2003.
2. Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R. Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials*. 2009;2(2):514-48.
3. Williams DF. Definitions in biomaterials. Amsterdam: Elsevier, 1987.
4. Lemmons J, Natiella J. Biomaterials, biocompatibility and peri-implant considerations. *Dental clinics of north america*. 1986;30(1):3-23.
5. Schmalz G. Materials science: biological aspects. *J Dent Res*. 2002;81(10):660-3.
6. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J*. 2003;36(2):75-85.
7. Elshahaw W. Biocompatibility. In advances in ceramics - electric and magnetic ceramics, bioceramics, ceramics and environment [Internet book]. InTech, 2011.
8. Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso ME. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2003;124(6):687-93.
9. Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG. Flow cytometry in the study of cell death. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(3):429-33.
10. Žlender V. Apoptosis-programmed cell death. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2003;54(4):267-74.
11. Dobrucki J, Darzynkiewicz Z. Chromatin condensation and sensitivity of DNA in situ to denaturation during cell cycle and apoptosis - a confocal microscopy study. *Micron*. 2001;32(7):645-52.
12. Rajić V. Biološka svojstva monomera u kompozitnim materijalima. Doktorski rad. Stomatološki fakultet Sveučilšta u Zagrebu, 2013.
13. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. Biocompatibility of dental materials: Springer-Verlang Berlin Heidelberg, 2009.
14. Murray PE, Garcia Godoy C, Garcia Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007;12(3):E258-66.
15. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater*. 1996;12(3):186-93.
16. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent*. 2001;86(2):203-9.
17. Schmalz G. Use of cell-cultures for toxicity testing of dental materials advantages and limitations. *J Dent*. 1994;22:S6-S11.

18. Franz A, Konig F, Anglmayer M, Rausch-Fan X, Gille G, Rausch WD, et al. Cytotoxic effects of packable and nonpackable dental composites. *Dent Mater.* 2003;19(5):382-92.
19. Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P, et al. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater.* 1998;14(6):429-40.
20. Bouillaguet S, Shaw L, Gonzalez L, Wataha JC, Krejci I. Long-term cytotoxicity of resin-based dental restorative materials. *J Oral Rehabil.* 2002;29(1):7-13.
21. Wataha JC, Lockwood PE, Bouillaguet S, Noda M. In vitro biological response to core and flowable dental restorative materials. *Dent Mater.* 2003;19(1):25-31.
22. Hanks CT, Anderson M, Craig RG. Cytotoxic effects of dental cements on two cell culture systems. *J Oral Pathol.* 1981;10(2):101-12.
23. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res.* 1998;41(3):474-80.
24. Moharamzadeh K, Brook IM, Scutt AM, Thornhill MH, Van Noort R. Mucotoxicity of dental composite resins on a tissue-engineered human oral mucosal model. *J Dent.* 2008;36(5):331-6.
25. Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R, Scutt AM, Smith KG, Thornhill MH. Development, optimization and characterization of a full-thickness tissue engineered human oral mucosal model for biological assessment of dental biomaterials. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19(4):1793-801.
26. Schmalz G, Schuster U, Nuetzel K, Schweikl H. An in vitro pulp chamber with three-dimensional cell cultures. *J Endod.* 1999;25(1):24-9.
27. Polyzois GL. In vitro evaluation of dental materials. *Clin Mater.* 1994;16(1):21-60.
28. Sisco RF, Thonard JC, Lower DA, George WA. Responses of epithelial-like cells in tissue culture to implant materials. *J Dent Res.* 1967;46(1):248-52.
29. Leirskar J, Helgeland K. A methodologic study of the effect of dental materials on growth and adhesion of animal cells in vitro. *Scand J Dent Res.* 1972;80(2):120-33.
30. Tyas MJ. A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J Dent Res.* 1977;56(10):1285-90.
31. Silva VV, Lameiras FS, Lobato ZI. Biological reactivity of zirconia-hydroxyapatite composites. *J Biomed Mater Res.* 2002;63(5):583-90.

32. Szep S, Kunkel A, Ronge K, Heidemann D. Cytotoxicity of modern dentin adhesives- in vitro testing on gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res.* 2002;63(1):53-60.
33. Geurtsen W, Spahl W, Muller K, Leyhausen G. Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemicals. *J Biomed Mater Res.* 1999;48(6):772-7.
34. Pelka M, Danzl C, Distler W, Petschelt A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. *J Dent.* 2000;28(5):341-5.
35. Valle GF, Taintor JF, Marsh CL. The effect of varying liquid-to-powder ratio to zinc oxide and eugenol of rat pulpal respiration. *J Endod.* 1980;6(1):400-4.
36. Eick JD, Kostoryz EL, Rozzi SM, Jacobs DW, Oxman JD, Chappelow CC, et al. In vitro biocompatibility of oxirane/polyol dental composites with promising physical properties. *Dent Mater.* 2002;18(5):413-21.
37. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175(1):184-91.
38. Moller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;96(1):1-42.
39. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 1995;339(1):37-59.
40. Olive PL. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat Res.* 1989;117(1):79-92.
41. Brozović G. Genotoksični i citotoksični učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na zdrave i stanice Ehrlich ascites tumora u Swiss albino miševa. Doktorski rad. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2007.
42. Plappert U, Raddatz K, Roth S, Fliedner TM. DNA-damage detection in man after radiation exposure-the comet assay-its possible application for human biomonitoring. *Stem cells.* 1995;13(1):215-22.
43. Baričević M. Citotoksični i genotoksični utjecaj metalnih iona na sluznicu usne šupljine. Doktorski rad. Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2010.
44. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004;26(3):249-61.
45. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res.* 1997;375(2):183-93.
46. 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(3):206-21.

47. Tadin A. Procjena genotoksičnosti dentinskih adheziva. Magistarski rad. Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2007.
48. Knezevic A, Zeljezic D, Kopjar N, Tarle Z. Cytotoxicity of composite materials polymerized with LED curing units. *Oper Dent* 2008;33(1):23-30.
49. Knezevic A, Zeljezic D, Kopjar N, Tarle Z. Influence of curing mode intensities on cell culture cytotoxicity/genotoxicity. *Am J Dent*. 2009;22(1):43-8.
50. Tadin A, Marovic D, Galic N, Milevoj A, Medvedec Mikic I, Zeljezic D. Genotoxic biomonitoring of flowable and non-flowable composite resins in peripheral blood leukocytes. *Acta Odontol Scand*. 2012 Oct 22. [Epub ahead of print].
51. Durner J, Debiak M, Burkle A, Hickel R, Reichl FX. Induction of DNA strand breaks by dental composite components compared to X-ray exposure in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol*. 2011;85(2):143-8.
52. Musa M, Ponnuraj KT, Mohamad D, Rahman IA. Genotoxicity evaluation of dental restoration nanocomposite using comet assay and chromosome aberration test. *Nanotechnology*. 2013;24(1):015105.
53. Visalli G, Baluce B, La Maestra S, Micale RT, Cingano L, De Flora S, et al. Genotoxic damage in the oral mucosa cells of subjects carrying restorative dental fillings. *Arch Toxicol*. 2013;87(1):179-87.
54. Di Pietro A, Visalli G, La Maestra S, Micale R, Baluce B, Matarese G, et al. Biomonitoring of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of subjects with dental restorative fillings. *Mutat Res*. 2008;650(2):115-22.
55. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The HUMAN MicroNucleus Project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res*. 1999;428(1-2):271-83.
56. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res*. 1993;285(1):35-44.
57. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect*. 1993;101(3):101-7.
58. Miller B, Potter-Locher F, Seelbach A, Stopper H, Utesch D, Madle S. Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test. *Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung. Mutat Res*. 1998;410(1):81-116.

59. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 1992;271(1):69-77.
60. Erdemir EO, Sengun A, Ulker M. Cytotoxicity of mouthrinses on epithelial cells by micronucleus test. *Eur J Dent.* 2007;1(2):80-5.
61. Carlin V, Matsumoto MA, Saraiva PP, Artioli A, Oshima CT, Ribeiro DA. Cytogenetic damage induced by mouthrinses formulations in vivo and in vitro. *Clin Oral Investig.* 2012;16(3):813-20.
62. Öztürk F, Yüksel S, Toy E, Kurtoğlu EL, Küçük EB. Genotoxic effects of banding procedure with different orthodontic cements on human oral mucosa cells. *Turk J Med Sci.* 2012;42:1157-65.
63. Popova L, Kishkilova D, Hadjidekova VB, Hristova RP, Atanasova P, Hadjidekova VV, et al. Micronucleus test in buccal epithelium cells from patients subjected to panoramic radiography. *Dentomaxillofac Radiol.* 2007;36(3):168-71.
64. Pai A, Sharma RC, Naik RM, Guruprasad Y. Biomonitoring of genotoxic and cytotoxic effects of gingival epithelial cells exposed to digital panoramic radiography. *J Orofac Sci* 2012;4:124-8.
65. Westphalen GH, Menezes LM, Pra D, Garcia GG, Schmitt VM, Henriques JA, et al. In vivo determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. *Genet Mol Res.* 2008;7(4):1259-66.
66. Rezende EF, Mendes-Costa MC, Fonseca JC, Ribeiro AO. Nuclear anomalies in the buccal cells of children under dental treatment. *RSBO.* 2011;8:182-8.
67. Bloching M, Reich W, Schubert J, Grummt T, Sandner A. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. *Oral Oncol.* 2008;44(3):220-6.
68. Dogon IL. Present and future value of dental composite materials and sealants. *Int J Technol Assess Health Care.* 1990;6(3):369-77.
69. Gerzina TM, Hume WR. Effect of dentine on release of TEGDMA from resin composite in vitro. *J Oral Rehabil.* 1994;21(4):463-8.
70. Tanaka K, Taira M, Shintani H, Wakasa K, Yamaki M. Residual monomers (TEGDMA and Bis-GMA) of a set visible-light-cured dental composite resin when immersed in water. *J Oral Rehabil.* 1991;18(4):353-62.
71. Asmussen E, Munksgaard EC. Bonding of restorative resins to dentine: status of dentine adhesives and impact on cavity design and filling techniques. *Int Dent J* 1988;38(2):97-104.

72. Venhoven BA, de Gee AJ, Davidson CL. Polymerization contraction and conversion of light-curing BisGMA-based methacrylate resins. *Biomaterials*. 1993;14(11):871-5.
73. Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *Eur J Oral Sci*. 1998;106:687-95.
74. Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, et al. How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dent Mater*. 2011;27(8):723-47.
75. Kalachandra S, Turner DT. Water sorption of polymethacrylate networks: bis-GMA/TEGDMA copolymers. *J Biomed Mater Res*. 1987;21(3):329-38.
76. Poplawski T, Loba K, Pawlowska E, Szczepanska J, Blasiak J. Genotoxicity of urethane dimethacrylate, a tooth restoration component. *Toxicol In Vitro*. 2010;24(3):854-62.
77. Ruyter IE, Oysaed H. Composites for use in posterior teeth: composition and conversion. *J Biomed Mater Res*. 1987;21(1):11-23.
78. Cook WD, Beech DR, Tyas MJ. Resin-based restorative materials-a review. *Aust Dent J*. 1984;29(5):291-5.
79. Anusavice KJ, de Rijk WG. Performance of dental biomaterials: conference report. *Dent Mater*. 1990;6(1):69-72.
80. Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001;12(2):136-51.
81. Ferracane JL. Current trends in dental composites. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6(4):302-18.
82. Bowen RL. Properties of a silica-reinforced polymer for dental restorations. *JADA*. 1963;66:57-64.
83. Goldman M. Polymerization shrinkage of resin-based restorative materials. *Aust Dent J*. 1983;28(3):156-61.
84. Tarle Z, Meniga A, Ristic M, Sutalo J, Pichler G, Davidson CL. The effect of the photopolymerization method on the quality of composite resin samples. *J Oral Rehabil*. 1998;25(6):436-42.
85. Mirsasaani SS, Manjili MH, Baheiraei N. Dental nanomaterials: In: *Advances in diverse industrial applications of nanocomposites* [Internet book]. InTech, 2011.
86. Hervas-Garcia A, Martinez-Lozano MA, Cabanes-Vila J, Barjau-Escribano A, Fos-Galve P. Composite resins. A review of the materials and clinical indications. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(2):E215-20.

87. Ahmad I. Compobond: Evolution of a new restorative dental material. *Dental Tribune* 2012;1:20-32.
88. Smith R, Oliver C, Williams DF. The enzymatic degradation of polymers in vitro. *J Biomed Mater Res.* 1987;21(8):991-1003.
89. Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil.* 1994;21(4):441-52.
90. Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *Int J Mol Sci.* 2009;10(9):3861-99.
91. Chung K, Greener EH. Degree of conversion of seven visible light-cured posterior composites. *J Oral Rehabil.* 1988;15(6):555-60.
92. Ergun G, Egilmez F, Cekic-Nagas I. The cytotoxicity of resin composites cured with three light curing units at different curing distances. *Med Oral Patol Oral Cir.* 2011;16(2):e252-9.
93. Pearson GJ, Longman CM. Water sorption and solubility of resin-based materials following inadequate polymerization by a visible-light curing system. *J Oral Rehabil.* 1989;16(1):57-61.
94. Oilo G. Biodegradation of dental composites/glass-ionomer cements. *Adv Dent Res.* 1992;6:50-4.
95. Gupta SK, Saxena P, Pant VA, Pant AB. Release and toxicity of dental resin composite. *Toxicology international.* 2012 Sep;19(3):225-34.
96. Drummond JL. Degradation, fatigue, and failure of resin dental composite materials. *J Dent Res.* 2008;87(8):710-9.
97. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater.* 2006;22(3):211-22.
98. Soderholm KJ, Zigan M, Ragan M, Fischlschweiger W, Bergman M. Hydrolytic degradation of dental composites. *J Dent Res.* 1984;63(10):1248-54.
99. Gopferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials.* 1996;17(2):103-14.
100. Santerre JP, Shajii L, Tsang H. Biodegradation of commercial dental composites by cholesterol esterase. *J Dent Res.* 1999;78(8):1459-68.
101. Larsen IB, Munksgaard EC. Effect of human saliva on surface degradation of composite resins. *Scand J Dent Res.* 1991;99(3):254-61.

102. Yourtee DM, Smith RE, Russo KA, Burmaster S, Cannon JM, Eick JD, et al. The stability of methacrylate biomaterials when enzyme challenged: kinetic and systematic evaluations. *J Biomed Mater Res*. 2001;57(4):522-31.
103. Shokati B, Tam LE, Santerre JP, Finer Y. Effect of salivary esterase on the integrity and fracture toughness of the dentin-resin interface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;94(1):230-7.
104. Kermanshahi S, Santerre JP, Cvitkovitch DG, Finer Y. Biodegradation of resin-dentin interfaces increases bacterial microleakage. *J Biomed Mater Res*. 2010;89(9):996-1001.
105. Finer Y, Santerre JP. Salivary esterase activity and its association with the biodegradation of dental composites. *J Dent Res*. 2004;83(1):22-6.
106. Lin BA, Jaffer F, Duff MD, Tang YW, Santerre JP. Identifying enzyme activities within human saliva which are relevant to dental resin composite biodegradation. *Biomaterials*. 2005;26(20):4259-64.
107. Finer Y, Santerre JP. The influence of resin chemistry on a dental composite's biodegradation. *J Biomed Mater Res A*. 2004;69(2):233-46.
108. Jaffer F, Finer Y, Santerre JP. Interactions between resin monomers and commercial composite resins with human saliva derived esterases. *Biomaterials*. 2002;23(7):1707-19.
109. Freund M, Munksgaard EC. Enzymatic degradation of BISGMA/TEGDMA-polymers causing decreased microhardness and greater wear in vitro. *Scand J Dent Res*. 1990;98(4):351-5.
110. Wu W, McKinney JE. Influence of chemicals on wear of dental composites. *J Dent Res*. 1982;61(10):1180-3.
111. Munksgaard EC, Freund M. Enzymatic hydrolysis of (di)methacrylates and their polymers. *Scand J Dent Res*. 1990;98(3):261-7.
112. Shajii L, Santerre JP. Effect of filler content on the profile of released biodegradation products in micro-filled bis-GMA/TEGDMA dental composite resins. *Biomaterials*. 1999;20(20):1897-908.
113. Finer Y, Santerre JP. Influence of silanated filler content on the biodegradation of bisGMA/TEGDMA dental composite resins. *J Biomed Mater Res A*. 2007;81(1):75-84.
114. Manojlovic D, Radisic M, Vasiljevic T, Zivkovic S, Lausevic M, Miletic V. Monomer elution from nanohybrid and ormocer-based composites cured with different light sources. *Dent Mater*. 2011;27(4):371-8.

115. Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. HPLC analysis of components released from dental composites with different resin compositions using different extraction media. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18(1):133-7.
116. Polydorou O, Konig A, Hellwig E, Kummerer K. Long-term release of monomers from modern dental-composite materials. *Eur J Oral Sci*. 2009;117(1):68-75.
117. Polydorou O, Trittler R, Hellwig E, Kummerer K. Elution of monomers from two conventional dental composite materials. *Dent Mater*. 2007;23(12):1535-41.
118. Michelsen VB, Moe G, Skalevik R, Jensen E, Lygre H. Quantification of organic eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;850(1-2):83-91.
119. Michelsen VB, Moe G, Strom MB, Jensen E, Lygre H. Quantitative analysis of TEGDMA and HEMA eluted into saliva from two dental composites by use of GC/MS and tailor-made internal standards. *Dent Mater*. 2008;24(6):724-31.
120. Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent*. 1996;24(1-2):125-8.
121. Ferracane JL, Condon JR. Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater*. 1990;6(4):282-7.
122. Imazato S, Horikawa D, Ogata K, Kinomoto Y, Ebisu S. Responses of MC3T3-E1 cells to three dental resin-based restorative materials. *J Biomed Mater Res A*. 2006;76(4):765-72.
123. Imazato S, Horikawa D, Nishida M, Ebisu S. Effects of monomers eluted from dental resin restoratives on osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;88(2):378-86.
124. Nalcaci A, Ulusoy N, Atakol O. Time-based elution of TEGDMA and BisGMA from resin composite cured with LED, QTH and high-intensity QTH lights. *Oper Dent*. 2006;31(2):197-203.
125. Mazzaoui SA, Burrow MF, Tyas MJ, Rooney FR, Capon RJ. Long-term quantification of the release of monomers from dental resin composites and a resin-modified glass ionomer cement. *J Biomed Mater Res*. 2002;63(3):299-305.
126. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*. 2002;23(8):1819-29.
127. Szczepanska J, Poplawski T, Synowiec E, Pawlowska E, Chojnacki CJ, Chojnacki J, et al. 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), a tooth restoration component, exerts its

genotoxic effects in human gingival fibroblasts through methacrylic acid, an immediate product of its degradation. *Mol Biol Rep.* 2012;39(2):1561-74.

128. Schedle A, Ortengren U, Eidler N, Gabauer M, Hensten A. Do adverse effects of dental materials exist? What are the consequences, and how can they be diagnosed and treated? *Clin Oral Implants Res.* 2007;18:232-56.

129. Stanley HR. Effects of dental restorative materials: local and systemic responses reviewed. *JADA.* 1993;124(10):76-80.

130. Gosavi SS, Gosavi SY, Alla RK. Local and systemic effects of unpolymerised monomers. *Dent Res J (Isfahan).* 2010;7(2):82-7.

131. Stanley HR. Local and systemic responses to dental composites and glass ionomers. *Adv Dent Res.* 1992;6:55-64.

132. Reichl FX, Seiss M, Kleinsasser N, Kehe K, Kunzelmann KH, Thomas P, et al. Distribution and excretion of BisGMA in guinea pigs. *J Dent Res.* 2008;87(4):378-80.

133. Marquardt W, Seiss M, Hickel R, Reichl FX. Volatile methacrylates in dental practices. *J Adhes Dent.* 2009;11(2):101-7.

134. Alanko K, Susitaival P, Jolanki R, Kanerva L. Occupational skin diseases among dental nurses. *Contact dermatitis.* 2004;50(2):77-82.

135. Brackett MG, Bouillaguet S, Lockwood PE, Rotenberg S, Lewis JB, Messer RL, et al. In vitro cytotoxicity of dental composites based on new and traditional polymerization chemistries. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;81(2):397-402

136. Emmmler J, Seiss M, Kreppel H, Reichl FX, Hickel R, Kehe K. Cytotoxicity of the dental composite component TEGDMA and selected metabolic by-products in human pulmonary cells. *Dent Mater.* 2008;24(12):1670-5.

137. Engelmann J, Janke V, Volk J, Leyhausen G, von Neuhoff N, Schlegelberger B, et al. Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. *Biomaterials.* 2004;25(19):4573-80.

138. Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harreus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials.* 2006;27(9):1762-70.

139. Kleinsasser NH, Wallner BC, Harreus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, et al. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent.* 2004;32(3):229-34.

140. Nomura Y, Teshima W, Kawahara T, Tanaka N, Ishibashi H, Okazaki M, et al. Genotoxicity of dental resin polymerization initiators in vitro. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17(1):29-32.
141. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res.* 2006;85(10):870-7.
142. Bakopoulou A, Mourelatos D, Tsiftoglou AS, Mioglou E, Garefis P. Sister-chromatid exchange, chromosomal aberrations and delays in cell-cycle kinetics in human lymphocytes induced by dental composite resin eluates. *Mutat Res.* 2008;649(1-2):79-90.
143. Schweikl H, Schmalz G. Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. *Mutat Res.* 1999;438(1):71-8.
144. Arenholt-Bindslev D, Breinholt V, Preiss A, Schmalz G. Time-related bisphenol-A content and estrogenic activity in saliva samples collected in relation to placement of fissure sealants. *Clin Oral Investig.* 1999;3(3):120-5.
145. Darmani H, Al-Hiyasat AS. The effects of BIS-GMA and TEGDMA on female mouse fertility. *Dent Mater.* 2006;22(4):353-8.
146. Schwengberg S, Bohlen H, Kleinsasser N, Kehe K, Seiss M, Walther UI, et al. In vitro embryotoxicity assessment with dental restorative materials. *J Dent.* 2005;33(1):49-55.
147. Wada H, Tarumi H, Imazato S, Narimatsu M, Ebisu S. In vitro estrogenicity of resin composites. *J Dent Res.* 2004;83(3):222-6.
148. Bakopoulou A, Tsiftoglou A, Galaktidou G, Markala D, Trivai I, Garefis P. Patterns of cell death and cell cycle profiles of cultured WEHI 13 var fibroblasts exposed to eluates of composite resins used for direct and indirect restorations. *Eur J Oral Sci.* 2007;115(5):397-407.
149. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, et al. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dent Mater.* 2006;22(7):630-40.
150. Urcan E, Scherthan H, Styllou M, Haertel U, Hickel R, Reichl FX. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials.* 2010;31(8):2010-4.
151. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res.* 1995;74(9):1602-6.
152. Spagnuolo G, D'Anto V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials.* 2006;27(9):1803-9.

153. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res.* 2001;80(7):1615-20.
154. Nassiri MR, Hanks CT, Cameron MJ, Strawn SE, Craig RG. Application of flow cytometry to determine the cytotoxicity of urethane dimethacrylate in human cells. *J Biomed Mater Res.* 1994;28(2):153-8.
155. Jontell M, Hanks CT, Bratel J, Bergenholtz G. Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J Dent Res.* 1995;74(5):1162-7.
156. Al-Hiyasat AS, Darmani H, Milhem MM. Cytotoxicity evaluation of dental resin composites and their flowable derivatives. *Clin Oral Investig.* 2005;9(1):21-5.
157. Mohsen NM, Craig RG, Hanks CT. Cytotoxicity of urethane dimethacrylate composites before and after aging and leaching. *J Biomed Mater Res.* 1998;39(2):252-60.
158. Reichl FX, Esters M, Simon S, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, et al. Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol.* 2006;80(6):370-7.
159. Schweikl H, Schmalz G, Rackebrandt K. The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutat Res.* 1998;415(1-2):119-30.
160. Wisniewska-Jarosinska M, Poplawski T, Chojnacki CJ, Pawlowska E, Krupa R, Szczepanska J, et al. Independent and combined cytotoxicity and genotoxicity of triethylene glycol dimethacrylate and urethane dimethacrylate. *Mol Biol Rep.* 2011;38(7):4603-11.
161. Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R. Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. *Dent Mater.* 2007;23(1):34-9.
162. Schweikl H, Hiller KA, Eckhardt A, Bolay C, Spagnuolo G, Stempf T, et al. Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials.* 2008;29(10):1377-87.
163. Janke V, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W. TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 2003;82(10):814-8.
164. About I, Camps J, Mitsiadis TA, Bottero MJ, Butler W, Franquin JC. Influence of resinous monomers on the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblasts. *J Biomed Mater Res.* 2002;63(4):418-23.
165. Theilig C, Tegtmeier Y, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of BisGMA and TEGDMA on proliferation, migration, and tenascin expression of human fibroblasts and keratinocytes. *J Biomed Mater Res.* 2000;53(6):632-9.

166. Caughman WF, Caughman GB, Shiflett RA, Rueggeberg F, Schuster GS. Correlation of cytotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. *Biomaterials*. 1991;12(8):737-40.
167. Yap AU, Han VT, Soh MS, Siow KS. Elution of leachable components from composites after LED and halogen light irradiation. *Oper Dent*. 2004;29(4):448-53.
168. Goon AT, Bruze M, Zimerson E, Goh CL, Soo-Quee Koh D, Isaksson M. Screening for acrylate/methacrylate allergy in the baseline series: our experience in Sweden and Singapore. *Contact dermatitis*. 2008;59(5):307-13.
169. Ahmed RH, Aref MI, Hassan RM, Mohammed NR. Cytotoxic effect of composite resin and amalgam filling materials on human labial and buccal epithelium. *Nature and science*. 2010;8(10):48-53.
170. Chang MC, Lin LD, Chuang FH, Chan CP, Wang TM, Lee JJ, et al. Carboxylesterase expression in human dental pulp cells: role in regulation of BisGMA-induced prostanoind production and cytotoxicity. *Acta Biomater*. 2012;8(3):1380-7.
171. Wan Q, Rumpf D, Schricker SR, Mariotti A, Culbertson BM. Influence of hyperbranched multi-methacrylates for dental neat resins on proliferation of human gingival fibroblasts. *Biomacromolecules*. 2001;2(1):217-22.
172. Urcan E, Haertel U, Styllou M, Hickel R, Scherthan H, Reichl FX. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dent Mater*. 2010;26(1):51-8.
173. Durner J, Wellner P, Hickel R, Reichl FX. Synergistic interaction caused to human gingival fibroblasts from dental monomers. *Dent Mater*. 2012;28(8):818-23.
174. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig*. 2008;12(1):1-8.
175. Chang MC, Chen LI, Chan CP, Lee JJ, Wang TM, Yang TT, et al. The role of reactive oxygen species and hemeoxygenase-1 expression in the cytotoxicity, cell cycle alteration and apoptosis of dental pulp cells induced by BisGMA. *Biomaterials*. 2010;31(32):8164-71.
176. Bektas OO, Eren D, Akin GG, Polat ZA. Cytotoxicity evaluation of methacrylate- and silorane-based composite resins. *Cumhuriyet Dent J*. 2012;15(4):327-34.
177. Li YC, Kuan YH, Huang FM, Chang YC. The role of DNA damage and caspase activation in cytotoxicity and genotoxicity of macrophages induced by bisphenol-A-glycidyl dimethacrylate. *Int Endod J*. 2012;45(6):499-507.

178. Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater.* 2004;20(1):12-20.
179. Ferracane JL. Resin composite-state of the art. *Dent Mater.* 2011;27(1):29-38.
180. Chang HH, Chang MC, Lin LD, Lee JJ, Wang TM, Huang CH, et al. The mechanisms of cytotoxicity of urethane dimethacrylate to Chinese hamster ovary cells. *Biomaterials.* 2010;31(27):6917-25.
181. Volk J, Engelmann J, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. *Dent Mater.* 2006;22(6):499-505.
182. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):333-55.
183. Costa CA, Giro EM, do Nascimento AB, Teixeira HM, Hebling J. Short-term evaluation of the pulpo-dentin complex response to a resin-modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities. *Dent Mater.* 2003;19(8):739-46.
184. Durner J, Kreppel H, Zaspel J, Schweikl H, Hickel R, Reichl FX. The toxicokinetics and distribution of 2-hydroxyethyl methacrylate in mice. *Biomaterials.* 2009;30(11):2066-71.
185. Szczepanska J, Pawlowska E, Synowiec E, Czarny P, Rekas M, Blasiak J, et al. Protective effect of chitosan oligosaccharide lactate against DNA double-strand breaks induced by a model methacrylate dental adhesive. *Med Sci Monit.* 2011;17(8):201-8.
186. Blasiak J, Synowiec E, Tarnawska J, Czarny P, Poplawski T, Reiter RJ. Dental methacrylates may exert genotoxic effects via the oxidative induction of DNA double strand breaks and the inhibition of their repair. *Mol Biol Rep.* 2012;39(7):7487-96.
187. Vrzoc M, Petras ML. Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens. *Mutat Res.* 1997;381(1):31-40.
188. Szeto YT, Benzie IF, Collins AR, Choi SW, Cheng CY, Yow CM, et al. A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. *Mutat Res.* 2005;578(1-2):371-81.
189. Eren K, Ozmeric N, Sardas S. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. *Clin Oral Investig.* 2002;6(3):150-4.

190. Baricevic M, Ratkaj I, Mladinic M, Zeljezic D, Kraljevic SP, Loncar B, et al. In vivo assessment of DNA damage induced in oral mucosa cells by fixed and removable metal prosthodontic appliances. *Clin Oral Investig*. 2012;16(1):325-31.
191. Hafez HS, Selim EM, Kamel Eid FH, Tawfik WA, Al-Ashkar EA, Mostafa YA. Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: a longitudinal in-vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;140(3):298-308.
192. Belien JA, Copper MP, Braakhuis BJ, Snow GB, Baak JP. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis*. 1995;16(10):2395-400.
193. Laskaris G, Scully C, Tatakis DN. Periodontal manifestations of local and systemic diseases: colour atlas and text Springer-Verlag Berlin/Heidelberg, 2002.
194. Michelsen VB, Kopperud HB, Lygre GB, Bjorkman L, Jensen E, Kleven IS, et al. Detection and quantification of monomers in unstimulated whole saliva after treatment with resin-based composite fillings in vivo. *Eur J Oral Sci*. 2012;120(1):89-95.
195. Martins RA, Gomes GA, Aguiar O, Jr., Ribeiro DA. Biomonitoring of oral epithelial cells in petrol station attendants: comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue. *Environ Int*. 2009;35(7):1062-5.
196. Kasacka I, Lapinska J. Salivary cells in patients with dental amalgam and composite resin material restorations – a morphological investigation. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2010;19(6):1223-7.
197. Lima CF, Oliveira LU, Cabral LA, Brandao AA, Salgado MA, Almeida JD. Cytogenetic damage of oral mucosa by consumption of alcohol, tobacco and illicit drugs. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(6):441-6.

7. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA

Antonija Tadin rođena je 1978. godine u Splitu. Stomatološki fakultet u Zagrebu upisala je 1997. godine na kojem je diplomirala 2003. Sveučilišni poslijediplomski magistarski studij na Stomatološkom fakultetu upisala je 2004. godine, a magistarski rad iz restaurativne dentalne medicine s temom "Procjena genotoksičnosti dentinskih adheziva" obranila je 2007. godine.

Između 2005. i 2009. godine radila je u Stomatološkoj poliklinici Split pri Zavodu za dječju i preventivnu stomatologiju i Zavodu za oralnu kirurgiju. Od svibnja 2009. godine zaposlenik je Studija za dentalnu medicinu, Medicinskog fakulteta u Splitu na radnom mjestu asistenta pri Katedri za endodonciju i restaurativnu dentalnu medicinu. Iste godine upisala je poslijediplomski doktorski studij Stomatološkog fakulteta u Zagrebu te započela s obavljanjem specijalističkog staža u Klinici za stomatologiju, KBC Zagreb. U studenom 2012. godine položila je specijalistički ispit i stekla naziv Specijalist endodoncije i restaurativne stomatologije.

Sudjelovala je u dva stručna projekta odobrena od Ministarstva zdravlja, "Prevenција karijesa kod djece s poteškoćama u razvoju" i "Prevenција karijesa te promicanje oralnog zdravlja kod djece i mladeži s teškoćama u intelektualnom razvoju". Članica je domaćih strukovnih organizacija.

7.1. Popis objavljenih radova

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

1. Tadin A, Galic N, Mladinić M, Marovic D, Kovacic I, Zeljezic D. Genotoxicity in Gingival Cells of Patients Undergoing Tooth Restoration with Two Different Dental Composite Materials. Clin Oral Investig. 2013 Feb 5. [Epub ahead of print].
2. Tadin A, Marovic D, Galic N, Milevoj A, Medvedec Mikic I, Zeljezic D. Genotoxic biomonitoring of flowable and non-flowable composite resins in peripheral blood leukocytes. Acta Odontol Scand. 2012 Oct 22. [Epub ahead of print].
3. Kovačić I, Tadin A, Petričević N, Mikelić B, Vidović N, Palac A, Filipović-Zore I, Čelebić A. Changes of the Dental Service Delivered to Patients with Intellectual Disability under General Anaesthesia in Dental Polyclinic Split, Croatia, duringt he Years 1985–2009. Coll Antropol. 2012;36(3):785-9.
4. Kovačić I, Čelebić A, Knezović Zlatarić D, Petričević N, Buković D, Bitanga P, Mikelić B, Tadin A, Mehulić K. Decreasing of Residual Alveolar Ridge Height in Complete Denture Wearers. A Five Year Follow up Study. Coll Antropol. 2010;34(3):1051-6.

Znanstveni radovi u drugim časopisima:

1. Tadin A, Galic N, Zeljezic D, Mikelic Vitasovic B, Marovic D, Kovacic I. Ex vivo evaluation of genotoxic effects of four dental adhesives on human leukocytes. J Dent Sci. 2013;8(1):37-43.

Ostali radovi u drugim časopisima:

1. Jerković D, Tadin A. Prevencija i terapija komplikacija nastalih tijekom ispiranja korijenskog kanala zuba. DentiSt. 2012;1(2):12-6.
2. Sović J, Tadin A, Katunarić M. Nekarijesna oštećenja tvrdih zubnih tkiva. Sonda. 2012;13(23):66-79.
3. Šimunac T, Tadin A. Ubodni incidenti - svakodnevna opasnost za zdravstvene radnike. DentiSt. 2012;1(2):63-7.

4. Tadin A. Proceduralne pogreške nastale prilikom instrumentacije korijenskog kanala. DentiSt. 2012;1(1):40-4.
5. Tadin A, Gavić L. Revaskularizacija mladih trajnih zubi s nezavršenim rastom korijena i periapikalnim procesom. DentiSt. 2012;1(1):16-8.
6. Sović J, Tadin A, Katunarić M. Resorpcija korijena zuba. Sonda. 2011;12(22):89-92.
7. Tadin A, Cigić L, Katunarić M. Uspješna i bezbolna karijera doktora dentalne medicine. Sonda. 2011;12(2):69-71.

Magistarski radovi:

1. Tadin A. Procjena genotoksičnosti dentinskih adheziva. Magistarski rad. Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2007.