Citotoksični i genotoksični učinak suvremenih restaurativnih materijala na stanicama bukalne sluznice

Ugrin, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:126218

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Klara Ugrin

CITOTOKSIČNI I GENOTOKSIČNI UČINAK SUVREMENIH RESTAURATIVNIH MATERIJALA NA STANICAMA BUKALNE SLUZNICE

Diplomski rad

Akademska godina: 2015./2016.

Mentorica: dr. sc. Antonija Tadin, dr. med. dent.

Split, srpanj 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Klara Ugrin

CITOTOKSIČNI I GENOTOKSIČNI UČINAK SUVREMENIH RESTAURATIVNIH MATERIJALA NA STANICAMA BUKALNE SLUZNICE

Diplomski rad

Akademska godina: 2015./2016.

Mentorica: dr. sc. Antonija Tadin, dr. med. dent.

Split, srpanj 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Kompozitni materijal 2
1.2. Biodegradacija kompozitnih materijala 4
1.3. Biokompatibilnost kompozita 6
1.4. Mikronukleus test 8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 11
3. ISPITANICI I METODE 13
3.1. Ispitanici 14
3.2. Uzorkovanje stanica 14
3.3. Mikronukleus test 15
3.4. Statistička obrada podataka 15
4. REZULTATI 16
5. RASPRAVA 22
6. ZAKLJUČCI 26
7. POPIS CITIRANE LITERATURE 28
8. SAŽETAK 34
9. SUMMARY 36
10. ŽIVOTOPIS 38

Hvala mojoj mentorici dr. sc. Antoniji Tadin što je svojim stručnim savjetima i idejama olakšala pripremu i pisanje ovog rada. Zahvaljujem na strpljivosti i vremenu koje ste posvetili nama koji se tek pokušavamo ostvariti u svijetu struke i znanosti. Uzor ste i inspiracija!

Ipak najveće 'Hvala' želim reći cijeloj svojoj obitelji, posebno roditeljima, koji su me oduvijek podržavali i poticali u ostvarenju mojih ciljeva. Bez vaše ljubavi i vjere u mene nikada ne bih bila gdje sam sada i zato vama posvećujem ovaj rad.

1. UVOD

1.1. Kompozitni materijal

Kompozit je materijal sastavljen od dvije ili više supstanci spojenih međuatomskim ili međumolekularnim silama. Tako spojene supstance pokazuju bolje osobine od zbroja njihovih individualnih dijelova (1). Dentalni kompoziti su sastavljeni od četiri glavne sastavnice: organskog matriksa, anorganskog punila, vezujućeg međusredstva inicijatora, i akceleratora (2, 3). Različita dodatna sredstva doprinose mehaničkim i estetskim osobinama smole. Klinička uloga dentalnih kompozita je određena upravo karakterom i udjelom ovih glavnih komponenti, koje omogućavaju različite upotrebe smola, uključujući restauriranje zuba (4).

Organski matriks u smoli je većinom sastavljen od različitih metakrilatnih monomera, kao što su bisfenol A glicerin dimetakrilat (bisGMA), uretan dimetakrilat (UDMA) u kombinaciji sa komonomerima niže viskoznosti kao npr. trietilenglikol dimetakrilat (TEGDMA), etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) ili dietilenglikol dimetakrilat (DEGDMA). Polimerizirani, ovi metakrilatni monomeri su odgovorni za većinu kliničkih problema kao što su polimerizacijska kontrakcija smole koja dovodi do mikropropuštanja materijala i otpuštanje rezidualnog monomera nakon nepotpune polimerizacije smole ili njenog trošenja s vremenom (5).

Anorganska punila čine glavninu volumena kompozitnog materijala. Ona se dodaju kako bi se poboljšala fizička svojstva smole kao što su povećanje čvrstoće i modula elastičnosti, otpornosti na habanje, poboljšanje marginalne adaptacije i radiopaciteta. Primjeri čestica punila su: kvarc, koloidni silicijev dioksid, silikonsko staklo s barijem, stroncij ili cink, cirkonij i litij- aluminij-silikat (1). Veličina čestica se kreće od 0,1 do 100 μm te ovisno o njihovoj različitoj veličini uspostavljena je klasifikacija (6). Kompozitna mikropunila čine čestice veličine od 0,01 μm do 0,04 μm, hibridna kompozitna smola sadrži punila u rasponu od 0,01 μm to 6 μm, dok mikrohibridni kompozit 0,01μm to 3,5 μm s prosječnom veličinom 0,6 μm. Manje čestice punila omogućavaju bolju ispoliranost i izgled površine jer omogućavaju veću zbijenost čestica smole (7).

Kao najčešća svezujuća sredstva koriste se silani, koji olakšavaju kemijsku vezu između hidrofobnih monomera i hidrofilnih čestica punila (6). Silani su organski silikoni koji sadrže vinilne i metoksi skupine. Vinilne skupine mogu reagirati s matricom smole, dok metoksi skupine hidroliziraju tvoreći silanske skupine koje pak reagiraju na površini punila.

Preko ovog mehanizma svezujuće sredstvo se veže samo sa sobom jednako kao i s monomerom i punilom (8). Ta veza smanjuje apsorpciju vode polimeriziranog kompozita te njegovo posljedično raspadanje (9).

Kompozitne smole se polimeriziraju slobodnim polimerizacijskim radikalima. Polimerizacija se odvija tako da se neizreagirani metakrilatni monomer dodaje na kraj molekule. Početak te reakcije može biti toplinski, kemijski ili fotokemijski, s tim da se potonji najčešće koristi. Najčešće korišteni fotokemijski polimerizatori su klorkamforkinon i fenilpropandion. Dok se dodavanjem organskih amina, poput 2-dimetil metakrilat, ubrzava reakcija, za prevenciju prerane polimerizacije dodaje se hidroksitoluen (10). Za vrijeme fotopolimerizacije, smola se izlaže vidljivoj svjetlosti valne duljine 468 nm. Kamforkinon je time aktiviran i prima elektrone amina, otpuštajući slobodne radikale koji tada reagiraju adicijskom reakcijom s nezasićenim duplim vezama na monomerima (10). Nedostatak ovakvog sistema vezivanja je taj što polimerizacija nije ravnomjerna u cijeloj debljini smole, već je reakcija jača i kompletnija u blizini površine materijala nego u njegovoj dubini (11). Čak i na samoj površini smole, polimerizacija je nepotpuna zbog inhibicijskog oksigenirajućeg sloja, u kojem slobodni radikali oksidiraju u stabilne perokside koji jako malo reagiraju s monomerima smole. Iz tih razloga nakon polimerizacije u kompozitu ostane čak 25-60% neizreagiranih metakrilatnih skupina (6). Komponente same smole također utječu na postotak konverzije monomera. Veličina tog postotka ima značajnu ulogu u toksičnosti dentalnog kompozita jer slobodne vinilne grupe mogu hidrolizirati iz smole (12). Iduća bitna pojava prilikom polimerizacije metakrilatnih smola je polimerizacijska kontrakcija koja iznosi 0,8-5,68% volumena (13). Kontrakcija je posljedica konverzije slabijih van der Waalsovih sila i jednostrukih kovalentnih veza u jače vezane van der Waalsove sile i dvostruke kovalentne veze unutar same smole (14). Skupljanje materijala za vrijeme polimerizacije će rezultirati tenzijama i mogućom pukotinom od 5-30 μm između kompozita i zuba (15, 16). Tako nastaje mikropropuštanje, tj. bakterijama, tekućinama, molekulama i ionima je omogućen prolaz pukotinom te posljedično dolazi do nastanka sekundarnog karijesa, upale pulpe i osjetljivosti. Dentinska svezujuća sredstva se odupiru silama polimerizacijske kontrakcije i stvaraju pečat između zuba i ispuna (17, 18).

Adhezivnim sistemima se dobiva spoj između kompozitne smole i zubne strukture te se na taj način kompenzira polimerizacijsko skupljanje kompozita, povećava retencija restauracije i osigurava pečaćenje margina. Veza između adheziva i dentina, koja sprječava mikropropuštanje do pulpe je bitna u prevenciji postoperativne osjetljivosti te ponovnog

propadanja zubnog tkiva, ali i u održanju zdravlja pulpe te dugovječnosti ispuna. Današnji adhezivni sistemi imaju tri koraka, odvojeno ili u kombinaciji. To su kiselina, promotor adhezije ("primer") i bond. Nagrizanje zubne strukture omogućava mikro-mehaničku retenciju koja se postiže na dva načina: jetkajuće-ispirućim ("total-etch") ili samojetkajućim ("self etch") sustavima. U jetkajuće-ispirućem sustavu30-40% fosforna kiselina aplicirana na zubnu strukturu uklanja površinski zaostatni sloj i demineralizira dentin na dubini od 5 μm. "Self etching" sistem ne zahtjeva ispiranje i uklanjanje površinskog zaostatnog sloja. Umjesto toga adheziv ulazi između zaostatnog sloja i s njim čini površinski hibridni sloj, tanki sloj u kojem su monomeri smole pomiješani s dentinskim kolagenim vlaknima (19, 20). Promotor adhezije djeluje kao bifunkcionalna molekula. Hidrofilne grupe na jednom kraju promotora penetriraju i vežu se na vlažni dentin, dok se hidrofobne metakrilatne grupe vežu za adheziv i kompozit. Na taj način se stvara veza između dvije nekompatibilne strukture. Sami bond služi popunjavanju dentinskih tubulusa, pečaćenju dentinske površine i formiranju završnog hidrofobnog sloja na vrhu, koji omogućava daljnje vezanje kompozitnog materijala. Debljina mu varira od 5-40 μm. Slično kompozitnim smolama sadrži bisGMA i razne druge monomere, ali ne sadrži punila (19, 20).

1.2. Biodegradacija kompozitnih materijala

U oralni okoliš se iz kompozitnih smola otpuštaju razne komponente. Iz tog razloga je bitno poznavanje prirode i količine supstanci koje mogu doći u kontakt s oralnom sluznicom. Mogući putovi sistemne adsorpcije otpuštenih kemijskih supstanci mogu biti direktno preko oralne sluznice, difuzija u pulpu preko dentinskih tubula, te plućima i ingestijom u gastrointestinalni trakt (21).

Postoje dva glavna mehanizma otpuštanja supstanci iz polimernih materijala. Prvi je topljenje nevezanih monomera i aditiva koje ispire otapalo nakon postavljanja i drugi je hidroliza komponenti smole tokom vremena degradacijom i erozijom. Generalno, degradacija polimera je definirana kao proces kidanja lanaca tijekom kojeg se polimerni lanci cijepaju u oligomerne i u posebnim slučajevima u monomerne čime nastaju erozije i gubitak materijala. Intruzija vode ili nekog drugog otapala je okidač kemijske degradacije koja rezultira formiranjem oligomera i monomera (22).

Pokazalo se kako se skoro sve veće komponente kompozita otpuštaju tokom stvrdnjavanja (23). Curenje komponenti punjenja uzrokuje pukotine na površini smole i posljedično je oslabljuje te povećava površinu izloženu enzimatskoj degradaciji. Proces biodegradacije većinom ovisi o molekularnoj kemiji. Ustanovljeno je kako je maksimalno otpuštanje nevezanih monomera iz smole u prvih 24 sata nakon polimerizacije, dok su Bis-GMA, HEMA i UDMA detektirane u slini odmah kratko (10 minuta) nakon tretmana. (23-25). Kompozitne komponente se otpuštaju u usnu šupljinu kao posljedica dugoročne i kratkoročne degradacije kompozita (24, 25). Polydorouet sa suradnicima (26) je dokazao kako se TEGDMA, Bis-GMA i UDMA mogu otpuštati iz polimeriziranog kompozita čak i nakon jedne godine. Većina tih istraživanja je provođena *in vitro* uvjetima (26, 27), dok su eksperimenti u kojima je korištena ljudska slina i *in vivo* istraživanja rijetka (23, 28).

Najčešći načini degradacije smola su mehanički, kemijski i termalni procesi (29). Bezbroj faktora može utjecati na mehaničko trošenje kao što su sile žvakanja, okluzijske sile, kontaktna područja, vrsta hrane, postotak polimerizacije, te kvaliteta ispoliranosti (5, 10, 30). U usnoj šupljini kemijska degradacija može biti povezana s nekoliko mehanizama uključujući kemijsku hidrolizu stimuliranu preparatima sline, promjenama pH, enzimatskom degradacijom ili oksidacijom. Posebno je zanimljiva enzimatska razgradnja zbog toga što do nje dolazi bakterijskom aktivnošću, ali i odgovorom upaljenog tkiva. Bakterije proizvode nekoliko hidrolitičkih i proteolitičkih enzima, zajedno sa cijelim nizom metaboličkih nusprodukata, koji također potencijalno utječu na strukturu restaurativnih materijala. Kemijska degradacija može uzrokovati omekšanje površinskog sloja smole što olakšava trošenje materijala prilikom mastikacije. Kada se taj omekšani sloj ukloni, novi slojevi materijala su izloženi daljnjoj kemijskoj degradaciji. Pošto većina istraživanja koristi indirektne metode određivanja kemijskog cijepanja polimerske matrice kompozita, treba naglasiti da takvo mjerenje tvrdoće i trošenja materijala može dati pogrešne rezultate (7).

Svakodnevni unos hrane utječe na temperaturu i pH sline. Konstantne promjene temperature dovode do površinskog stresa i pucanja materijala zbog razlike u koeficijentima ekspanzije smole i zuba (31).

Razni čimbenici utječu na sklonost trošenju, odnosno razgradnji kompozita, kao što su dužina lanca metakrilata, količina čestica punila, vrsta monomera, stupanj konverzije monomera u polimer, intenzitet polimerizacijskog svjetla i obrada ispuna (5, 32-34).

Kompozitne smole su sklone ne samo ispiranju vodom nevezanih metakrilata, nego i hidrolitičkoj degradaciji polimeriziranih metakrilata. Hidrolitička degradacija uključuje cijepanje dvostrukih OC=O veza između acilne skupine i kisika u nezaštićenoj esterskoj vezi. To rezultira stvaranjem pora kroz koje se odvija proces degradacije (35). Ovaj proces ubrzavaju enzimi, pogotovo erastaze, što su pokazale promjene u mikrotvrdoći u nekoliko *in vitro* i *in vivo* istraživanja (32, 36, 37). Ljudska slina sadrži enzime sposobne degradirati komercijalne kompozitne smole što je bitno uzeti u obzir u *in vivo* prezentaciji smole. Kada je smola sastavljena od bisGMA/TEGDMA stavljena u medij s esterima, primijećen je puno veći gubitak mase nego kod inkubacije u samom puferu (34).

Za ispitivanje količine otpuštenih dijelova koriste se dvije osnovne vrste otapala: otapala na bazi vode (slina, vodeni puferi) i organska otapala (etanol i metanol). Dokazano je da u većini slučajeva otpuštanje tvari iz kompozitnih smola više potenciraju organska otapala.

Hidrolizom smole građene od bisGMA i TEGDMA nastaje kao produkt metakrilna kiselina, bis HPPP i TEGMA. Svaki od ovih produkata ima svoju ulogu kao marker biodegradacije (34).

Na posljetku, dentalne kompozitne smole sadrže polimerne mreže osjetljive na različite higroskopske i hidrolitičke utjecaje, ovisno o njihovoj kemiji i strukturi. Oni nužno ne utječu samo na fizičke i mehaničke osobine skraćujući vijek trajanja, nego mogu biti odgovorne za kratkoročna otpuštanja nevezanih komponenti, kao i dugoročna curenja degradiranih produkata u usnoj šupljini (22, 35, 38, 39).

1.3. Biokompatibilnost kompozita

Po tradicionalnom konceptu, biokompatibilnost se smatrala nedostatkom značajnijih nuspojava na tkivima. Sada se zna da samo nekoliko materijala, ako i oni, ne stvaraju značajnu interakciju s tkivima domaćina. Nova definicija biokompatibilnost definira kao sposobnost restaurativnih materijala da za vrijeme kliničke primjene potiču odgovarajući i povoljan odgovor domaćina (23).

Na biokompatibilnost utječu prvenstveno mehanička, fizička i kemijska svojstva materijala kao i njegova potencijalna citotoksičnost, genotoksičnost, mutagenost te razni alergijski učinci (24, 25).

Testovi za potvrdu biokompatibilnosti slijede ISO standard i odvijaju se u 3 glavne skupine: (a) primarni test (citotoksičnost, sistemna toksičnost, mutagenost), (b) sekundarni testovi (senzibilizacija, test implantacije, iritacija mukoze) i (c) pretklinički testovi (21). Idealna biološka metodologija istraživanja sadrži *in vivo* eksperimente. Unatoč tome što *in vitro* istraživanjima ne uzimamo u obzir biološke i fizičke komponente koje je nemoguće u potpunosti reproducirati, ti rezultati se i dalje koriste kao valjani za određivanje razine štetnosti materijala (40).

Jedna od glavnih odrednica biokompatibilnosti je utjecaj koji materijal može imati na preživljavanje stanica. Toksičnost nekog materijala je mogućnost da kemijski ošteti biološki sustav (41). Termin citotoksičnost se koristi u opisivanju kaskadnih molekularnih događaja koji koreliraju s makromolekularnom sintezom i uzrokuju stanično, funkcionalno i strukturalno oštećenje. Citotoksičnost je proces koji je teško karakterizirati zbog bezbroj načina na koje se može dogoditi stanično oštećenje. Kako bi se razumjela složenost tih procesa treba uzeti u obzir sposobnost staničnih proteina da pomognu ili produže preživljavanje stanice i samu genetsku predispoziciju stanice da aktivira određeni model stanične smrti (23).

Genotoksičnost opisuje oštećenje sekvenci DNK genoma, bez nastanka mutacije. Stanice posjeduju bezbroj mehanizama za oporavak genotoksičnih oštećenja. Prijenos tih genetskih oštećenja budućim generacijama može se izbjeći programiranom staničnom smrću, tj. apoptozom. Ukoliko te genetske pogreške ipak naslijede potomci, taj proces nazivamo mutagenost. Potrebno je razlikovati mutagenosti i kancerogenost. Kancerogenost označava alteracije u DNK čija je posljedica nepravilan rast i dioba, tj. alteracije DNK su uzrokovale stvaranje malignih tumora. Kancerogenost je rezultat nekoliko mutacija, ali ne vode sve mutacije razvoju tumorskih tvorbi. Međutim, mutagenost se može ocijeniti kao pokazatelj potencijalne kancerogenosti tvari koje direktno napadaju DNK (21, 23, 24, 27, 30).

Imunogenost se odnosi na sposobnost supstance da izazove imunološki odgovor. Ukoliko je organizam prethodno bio senzibiliziran pokreće se alergijska reakcija. Koncentracije koje izazivaju reakciju u prethodno senzibiliziranih osoba variraju. Doza koja uzrokuje alergijsku reakciju je općenito značajno manja od one koja uzrokuje toksične reakcije (41).

1.4. Mikronukleus test

Mikronukleus test je metoda procjene genomske nestabilnosti i oštećenja kromosoma kojom se može predvidjeti rizik od karcinoma i drugih degenerativnih bolesti uzrokovanih oštećenjem DNK (42). Mikronukleus (MN) indeks u stanicama glodavaca i/ili ljudi je postao jedan od standardnih završnih točaka i biomarkera korištenih u genetičkoj toksikologiji u *in vivo* i *ex vivo* uvjetima. U ljudi, mikronukleusi mogu lako biti detektirani u eritrocitima, limfocitima i izljuštenim epitelnim stanicama (poput bukalne sluznice) kao *in vivo* mjera oštećenja genoma (43). Za razliku od cirkulirajućih limfocita, stanice mukoze su direktno izložene dentalnim materijalima i njihovim potencijalno štetnim učincima. Također u epitelnim stanicama genotoksični učinak nosi veći rizik zbog broja dioba (42).

Stanice se prikupljaju s unutrašnje strane obraza drvenom, metalnom špatulom ili posebnom citološkom četkicom koja se najčešće koristi i pokazala s kao najefikasnija u prikupljanju stanica. Metoda bi trebala biti ujednačena kod svih ispitanika. Nakon uzimanja brisa stanice se nanose na predmetno stakalce i fiksiraju, te se potom boje jednom od tehnika koje imaju veliki afinitet za DNK. To mogu biti fluorescentne boje poput 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), akridin narančaste i propidium jodida. Ipak se najviše koristi bojanje po Giemsi zbog jednostavnosti i cijene, iako se preporuča izbjegavanje tog bojanja zbog lažno pozitivnih rezultata (44, 45). Tolbert i suradnici (44) su postavili najčešće korištene kriterije za odabir stanica, te preporučili brojanje minimalno 1000 stanica, odnosno dodatnih 1000 ukoliko se ne pronađe 5 mikronukleusa u prvom brojanju. Kriteriji koje stanice trebaju zadovoljiti jesi: (a) intaktna citoplazma stanice; (b) malo ili nikakvo preklapanje sa susjednom stanicom; (c) malo ili nimalo nečistoća; (d) jezgra netaknuta glatka i ovalna. Za identifikaciju mikronukleusa potrebno je zadovoljiti sljedeće: (a) zaobljen, ovalan opseg koji odgovara membrani; (b) manji od trećine dijametra pripadajuće jezgre, ali dovoljno velik da se razlikuje boja i oblik; (c) intenzitetom obojenja mora odgovarati jezgri; (d) iste teksture kao jezgra; (e) na istoj ravnini s fokusom kao jezgra i (f) ne smije se preklapati ili biti spojen s jezgrom (43, 44).

Mikronukleus je lako izvediv na stanicama oralne sluznice zbog dostupnosti, jednostavnosti i neinvazivnosti. Bukalne stanice su prva barijera probavnog i dišnog puta gdje se mogu metabolizirati potencijalni kancerogeni. Kada se još uzme u obzir da 90% karcinoma potječe od epitelnih stanica, razumljivo je zašto je oralni epitel ciljno mjesto detekcije ulaska kancerogenih agensa. Četveroslojni oralni epitel se obnavlja diobom matičnih stanica u

bazalnom sloju koje mogu ispoljiti genetsku pogrešku (kromosomski gubitak ili lom) kao mikronukleus. Te stanice putuju do površine epitela 5 do 14 dana i ljušte se u usnu šupljinu. Neke od njih degeneriraju u stanice s kondenziranim kromatinom, fragmentiranom jezgrom (karioreksa), piknotične jezgre ili dođe do potpunog gubitka jezgrenog materijala (karioliza). Neke stanice ostanu zaustavljene u binuklearnoj fazi ili pronalazimo jezgrine pupove (43). Literatura pokazuje kako pristup baziran ne samo na učestalosti MN-a nego i tih drugih markera oštećenja genomskog materijala (jezgreni pupovi, karioliza, karioreksa), smrti ili degeneraciji stanica, osigurava sveobuhvatnu mjeru citotoksičnosti i genotoksičnosti (45).

Mikronukleusi potječu od kromosomskih fragmenata ili cijelih kromosoma koji zaostaju enkapsulirani u anafazi diobe (43). Pod svjetlosnim mikroskopom može izgledati kao dodatna manja jezgra. Nastaje na četiri osnovna principa: nestanak acentričnih kromosomskih fragmenata, oštećenjem kromosoma, oštećenjem diobenog vretena ili njegovom smanjenom funkcionalnosti te nastanak hijazme u paracentričnoj regiji. Testom se otkrivaju klastogeni (lom kromosoma) i aneugeni (gubitak kromosoma) oblici nastanka (43). Standardni mikronukleus test ne razlikuje mikronukleuse s obzirom potječu li od acentričnih ulomaka ili od čitavih kromosoma, stoga se kao dodatna potvrda koriste specifičnije citološke tehnike (florescencijska *in situ* hibridizacija) (45).

Drugi pokazatelj oštećenja je binuklearna stanica koja je vjerojatno povezana s neuspjehom citokineze, bilo zbog nedostatka u formiranju mikrofilamenata ili staničnog ciklusa. Kriterije koje mora zadovoljiti binuklearna stanica su sljedeći: (a) postojanje dviju jezgara u jednoj stanici, (b) obje jezgre slične veličine i intenziteta i (c) jezgre se dodiruju ili su u neposrednoj blizini (45).

Jezgrin pupoljak predstavlja umnažanje DNK. Najvjerojatnije nastaje eliminacijom umnoženog DNK, popravkom DNK ili moguće viškom kromosoma iz aneuploidne stanice. Stanice s pupoljkom imaju sljedeće karakteristike: (a) na glavnoj jezgri se pojavljuje oštro suženje koje formira pupoljak jezgrinog materijala, (b) pupoljak je iste teksture, žarišne udaljenosti i intenziteta obojenja kao jezgra. (c) pupoljak je povezan s glavnom jezgrom uskom ili širokom nukleoplazmatskom vezom i (d) pupoljak čini 1/3 do 1/6 veličine glavne jezgre, ali rijetko može biti veći i gotovo iste veličine kao jezgra (45).

Karioliza predstavlja naprednu fazu nekroze i apoptoze. Da bi se stanica smatrala kariolitičkom treba zadovoljiti određene uvjete: (a) treba biti ravna, oblika citoplazmatskog područja koje je veličine terminalno diferencirane stanice i (b) stanica s raspadom jezgre

nakon koje ostaje slika stanice duha. Karioreksa je tipična kasna faza apoptoze. Takve stanice su: (a) stanica s dezintegriranom jezgrom i (b) jezgru sačinjava kromatin gušće agregiran nego kod stanica s kondeziranim kromatinom.

Piknotične stanice su stanice u postupku stanične smrti. Frekvencija pojavnosti piknoza je u korelaciji s učestalošću kondenziranog kromatina i karioreksi. Piknotične stanice imaju: (a) malu smanjenu jezgru čiji je dijametar oko 1/3 normalne jezgre i (b) jezgra je ravnomjerno i snažno obojena (45).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Unatoč činjenici da su kompozitni materijali danas najčešće korišteni materijali u restaurativnoj dentalnoj medicini, još uvijek postoji velika zabrinutost zbog moguće toksičnosti. Dentalni kompoziti su vrsta biomaterijala i potvrda biokompatibilnost jest glavni preduvjet za njihovu sigurnu kliničku uporabu.

Istraživanje je bilo usmjereno na ispitivanje utjecaja kompozitnih 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 mikornukleus testa. U uvjetima *in vivo* pratio se citotoksični i genotoksični potencijal kompozitnih materijala ovisno broju restauriranih ploha zuba kod svakog pojedinaca.

Radna hipoteza: Neće doći do povećanja učestalosti mikronukleusa i drugih jezgrinih anomalija (citogenetskih parametara) u ispitanika s kompozitnim ispunim u odnosu na one s intaktnim zubima, neovisno o broju restauriranih ploha zuba kompozitnim materijalom.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje se provodilo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu te u suradnji sa Stomatološkim fakultetom Sveučilišta u Zagrebu. Temu ovog diplomskog rada odobrilo Povjerenstvo za diplomski rad Studija dentalne medicine, a samo istraživanje Etičko povjerenstvo Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu (Klasa:003-09/15-03/0001; Ur. br.: 2181-198-03-04-16-0008). Svaki je ispitanik prije potpisivanja informiranog pristanka i suglasnosti u potpunosti bio upoznat sa svrhom rada.

U studiju su uključeni samo oni ispitanici (studenti Medicinskog fakulteta u Splitu i studenti Stomatološkog fakulteta u Zagrebu) koji su imali kompozitne ispune ili intaktnu, zdravu denticiju bez ispuna. Istraživanje je provedeno na 115 pacijenata, 36 muškaraca i 79 žena, starih između 22-25 godina (srednja dob 23,5 +/-1,5).

Kriteriji uključenja su bili zdravi studenti bez sistemskih oboljenja, s jedino kompozitnim ispunima u usnoj šupljini ili oni bez ispuna. Dok su kriteriji isključenja obuhvaćali oboljele od zaraznih bolesti, kroničnih inflamatornih bolesti, korištenje antibiotika, kortikosteroida i protuupalnih lijekova kao i oštećenje sluznice usne šupljine. Isto tako nisu bili uključeni studenti koji imaju fiksno-protetske radove, ortodontski aparatić te amalgamske ispune.

Svaki je ispitanik ispunio upitnik u kojem su davali odgovore na pitanja vezana uz demografske čimbenike (godine, spol, itd.), stil života (pušenje, konzumacija alkohola, itd), osobne faktore (zdravstveni status, korištenje lijekova, izloženost x-zrakama) te prehrambene navike.

Ispitanicima koji su pristali sudjelovati u istraživanju uzela se dentalna anamneza, te se procijenio broj ploha zuba restauriranih kompozitnim ispunom (10,3 ± 9,33; min 0; max 37).

3.2. Uzorkovanje stanica

Svakom ispitaniku uzimao se uzorak stanica područja bukalne sluznice citološkom četkicom (Cytobrush Plus, GmbH, Dietramszell-Linden, Njemačka). Ispitanici su zamoljeni da se sat prije uzimanja uzorka suzdrže od pušenja, jedenja i pijenja alkohola. Nakon ispiranja

usne šupljine vodom, mekom citološkom četkicom se uzimao bris s lijeve i desne bukalne sluznice. Nakon čega su se stanice razmazane preko predmetnog stakalca.

3.3. Mikronukleus test

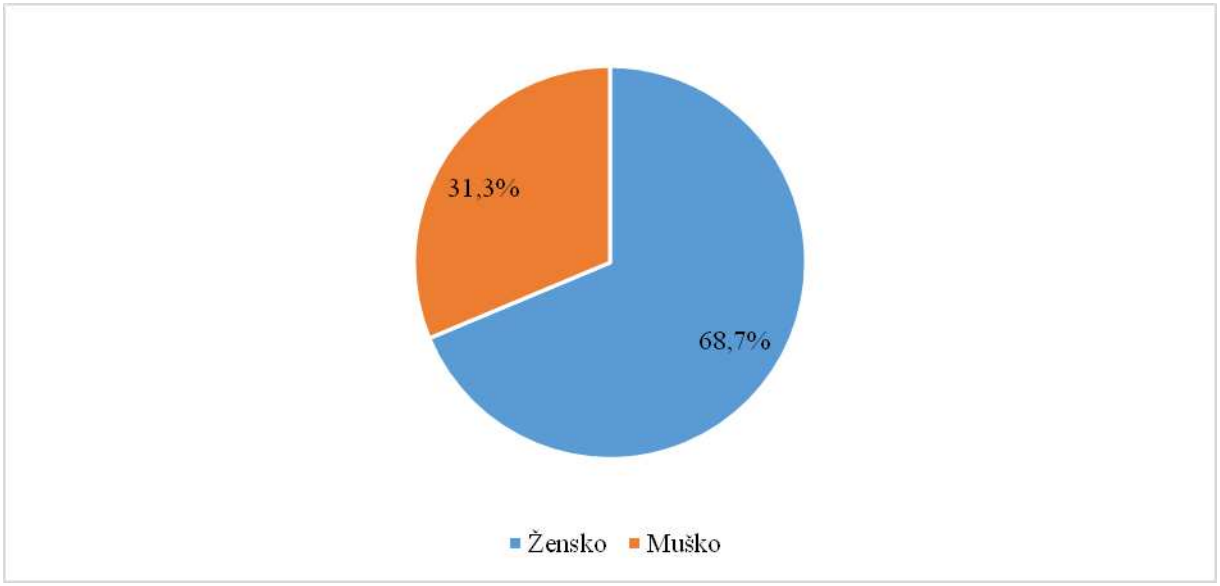
Uzorak epitelnih stanica nanio se na predmetno staklo prethodno zagrijano na 37°C, osušio na zraku, fiksirao metanolom (80% v/v) 20 minuta na 4°C i bojao otopinom 5% Giemsa-e kroz period od 10 minuta. Nakon toga uzorak je ispran destiliranom vodom i osušen na zraku te analiziran svjetlosnim mikroskopom s povećanjem 400X, a svaki mikronukleus i druge anomalije jezgre su dodatno potvrđene povećanjem od 1000X. Kao mjera genotoksičnosti i citotoksičnosti, u stanicama su se utvrdili broj mikronukleusa te drugih morfoloških promjena jezgre (mikronukleus test). Kako bi se mikronukleus detektirao treba zadovoljiti određene uvjete: a) mora sadržavati jezgreni sadržaj; b) mora biti skroz odvojen od izvorne stanice; c) mora biti manji od 1/3 dijametra pridružene jezgre; d) mora biti gladak i ovalan; e) mora biti u istom vidnom polju; f) mora biti iste boje, teksture i refrakcije kao i glavna jezgra. Odvojeno su prebrojane i stanice s dvije jezgre koje su evidentirane kao binukleusi, kao i ostale nuklearne anomalije karioreksa (nuklearna dezintegracija), karioliza (disolucija jezgre), jezgrini pupovi (prekursori mikronukleusa) i jezgrini mostovi (jezgra sužena na pola) (44).

3.4. Statistička obrada podataka

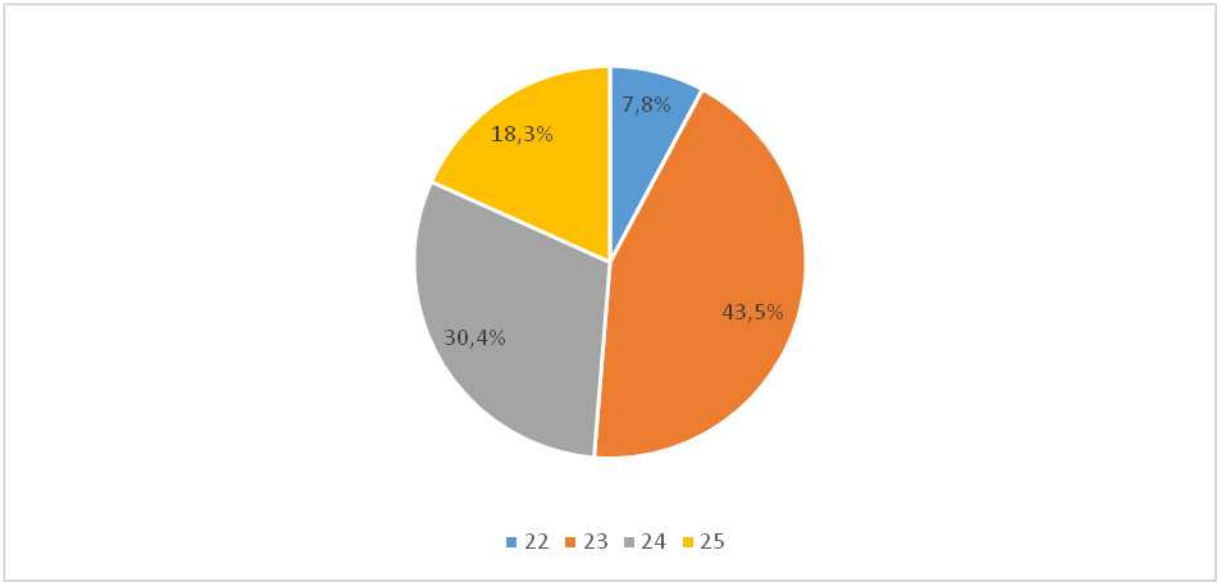
Program korišteni za statističku obradu podataka je SPSS 20.0 (IBM SPSS, Armonk, NY, SAD), uz značajnost postavljenu na $p<0,05$. Za određivanje osnovnih statističkih parametara (aritmetičke sredine, medijana, standardne devijacije, minimalne i maksimalne vrijednosti) korištena je deskriptivna statistika. Kako bismo utvrdili statističku značajnost u rezultatima mikronukleus testa korišten je Kruskal-Wallisov test. Za prikaz pojavnosti pušenja, uzimanja lijekova, prehrambenih navika itd. korišteni su grafički prikazi.

4. REZULTATI

U istraživanju je sudjelovalo 115 ispitanika od toga 79 žena 36 muškaraca (Slika 1). Prosječna dob ispitanika je 23,5 godina (Slika 2).

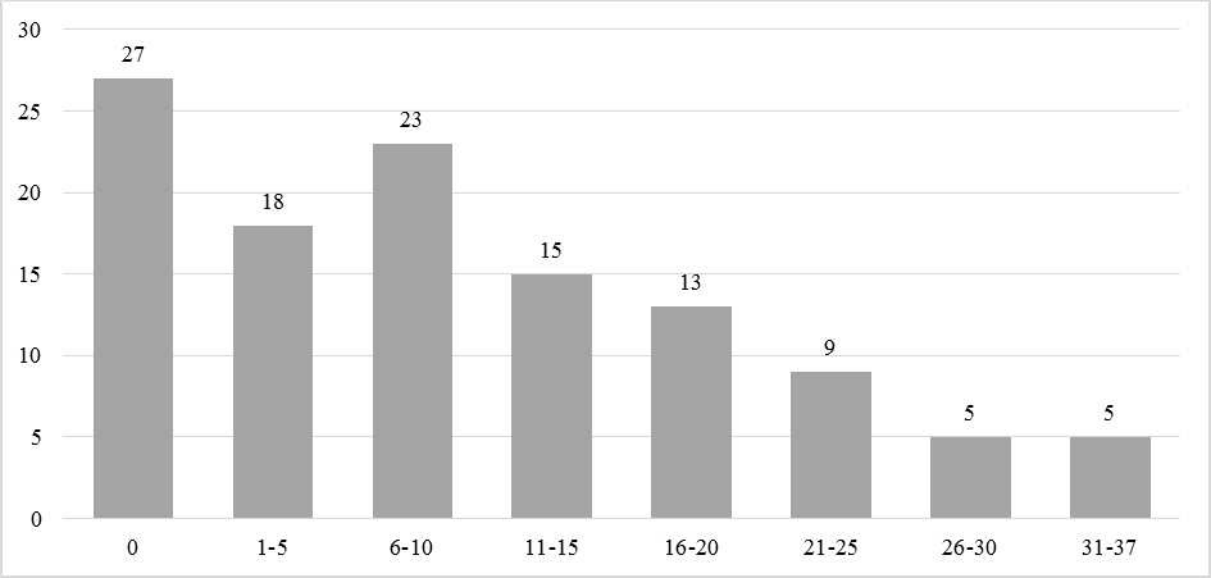


Slika 1. Raspodjela ispitanika po spolu (n=115).



Slika 2. Raspodjela ispitanika po dobi (n=115).

Ispitanici su imali od 0 do 37 restauriranih ploha zuba kompozitnim ispunom (Slika 3). Njih 27 nije imalo nikakvu restauraciju u usnoj šupljini. Prosječan broj restauriranih ploha zuba bio je 10, 3±9,6 (Tablica 1).



Slika 3. Raspodjela broja ploha kod ispitanika (n=115).

Osnovni statistički parametri mikronukleus testa dani su u Tablici 1. Prosječan broj mikronukleusa po ispitaniku je bio 1,33±1,1, stanica s karolizom 0,29±0,52, stanica karioreksom 0,23±0,52, piknozom 0,68±0,72, pupova 0,16±0,39, te mostova 0,11±0,39 i binuklearnih stanica 3,12±1,7.

Tablica 1. Deskriptivna statistika broja ispuna i parametara mikronukleus testa.

	Broj površina ispuna	Mikronukleus	Karioliza	Karioreksa	Piknoza	Pup	Most	Binuklearna stanica
Vrijednost	115	115	115	115	115	115	115	115
Nema	0	0	0	0	0	0	0	0
Aritmetička sredina	10,3043	1,3304	,2957	,2348	,6783	,1565	,1130	3,1217
Medijan	8,0000	1,0000	,0000	,0000	1,0000	,0000	,0000	3,0000
Mod	,00	1,00	,00	,00	,00	,00	,00	2,00
Std. Devijacija	9,62924	1,10598	,52938	,51861	,71999	,38823	,39214	1,74792
Raspon	37,00	5,00	2,00	2,00	3,00	2,00	3,00	7,00
Minimum	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00
Maksimum	37,00	5,00	2,00	2,00	3,00	2,00	3,00	7,00

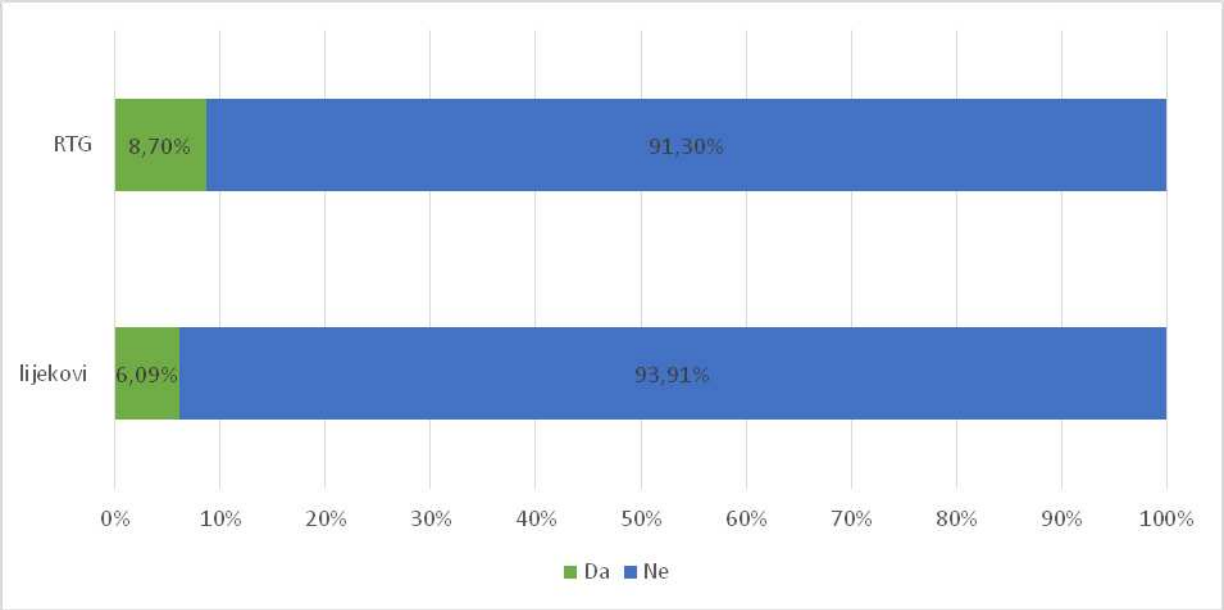
Ovisnost mikronukleus testa u ispitivanoj skupini o svim prediktorskim varijablama prikazana je u Tablici 2. Na pojavnost mikronukleusa statistički značajan utjecaj imaju spol (p=0,022), konzumacija čaja (p=0,001) te tjelesna aktivnost (p=0,018). Na pojavnost kariolize statistički značajan utjecaj ima samo konzumacija suhomesnatih proizvoda (p=0,035), dok je na pojavnost kariorekse statistički značajan utjecaj imaju pušenje (p=0,008) i alkohol (p=0,017).Značajan utjecaj na pojavnost piknoze statistički ima konzumacija kave (p=0,008).Na pojavnost pupova statistički značajan utjecaj ima pušenje (p=0,021) dok na pojavnost mostova statistički značaj imaju broj ploha (p=0,000) i konzumacija čaja (p=0,002). Na pojavnost binuklearnih stanica statistički značaj ima konzumacija suhomesnatih proizvoda (p=0,029), kave (p=0,008), čaja (p=0,009) i tjelesna aktivnost (p=0,20).

Broj ispuna nije bio relevantan za objašnjenje pojavnosti mikronukleusa, kariolize, kariorekse, piknoze, pupa i broja binuklearnih stanica

Tablica 2. Objedinjena tablica učinka grupirajućih varijabli kao što su broj ploha, spol, lijekovi itd. na parametre mikronukleus testa.

	Mikronukleus	**Karioliza**	**Karioreksa**	**Piknoza**	**Pup**	**Most**	**Binuklearna st.**
Broj ploha	0,492	0,438	0,503	0,356	0,331	**0,000**	0,451
Spol	**0,022**	0,906	0,286	0,809	0,724	0,303	0,713
Lijekovi	0,659	0,449	0,188	0,267	0,258	0,671	0,548
RTG	0,103	0,098	0,425	0,100	0,170	0,251	0,758
Pušenje	0,517	0,269	**0,008**	0,113	**0,021**	0,877	0,369
Alkohol	0,681	0,415	**0,017**	0,672	0,314	0,716	0,159
Meso	0,450	0,615	0,191	0,156	0,415	0,515	0,419
Suhomesnato	0,916	**0,035**	0,698	0,139	0,593	0,493	**0,029**
Povrće	0,157	0,461	0,850	0,333	0,099	0,222	0,570
Voće	0,666	0,491	0,575	0,308	0,095	0,473	0,734
Kava	0,477	0,327	0,450	**0,008**	0,597	0,077	**0,008**
Čaj	**0,001**	0,177	0,240	0,063	0,576	**0,002**	**0,009**
Tj. aktivnost	**0,018**	0,432	0,946	0,244	0,444	0,079	**0,020**

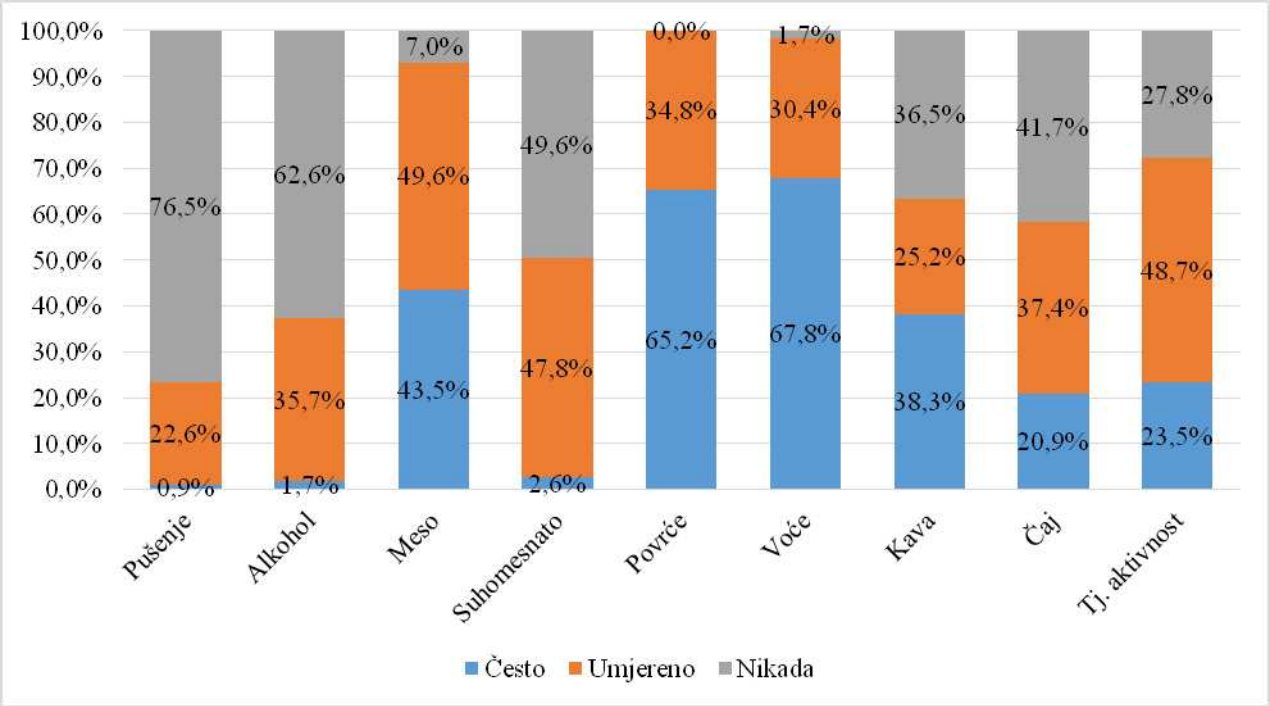
Među ispitanicima njih 91, 3% nije se podvrglo RTG snimanjima šest mjeseci prije uzorkovanja stanica bukalne sluznice. Lijekove nije koristilo njih 93,9% (Slika 4).



Slika 4. Prikaz učestalosti uzimanja lijekova i RTG pretrage kod ispitanika (n=115).

Na Slici 5 prikazana je učestalosti (često, umjereno, nikada) životnih navika u ispitanika (n=115): pušenje, alkohol, meso, suhomesnato, povrće, voće, kava, čaj, tjelesna aktivnost.

Većina ispitanika su bili nepušači, 76,5 %. Također veliki broj ispitanika nikada (rijetko) pije alkohol.



Slika 5. Prikaz učestalosti (često, umjereno, nikada) životnih navika u ispitanika (n=115): pušenje, alkohol, meso, suhomesnato, povrće, voće, kava, čaj i tjelesna aktivnost.

5. RASPRAVA

Ova presječena studija bavila se procjenom dugoročnog lokalnog genotoksičnog učinka kompozitnih materijala na bukalne stanice, ovisno o broju obnovljenih površina zuba kompozitnim ispunom. Genotoksičnost je procijenjena mikronukleus testom na bukalnim epitelnim stanicama. Hipoteza istraživanja je potvrđena, nismo našli korelaciju između broja ploha zuba restauriranih kompozitnim ispunom i frekvencije mikronukleusa u testiranoj skupini.

Usna šupljina početni je dio probavnog i dišnog sustava, a njen sadržaj je više nego kompleksan. Brojni faktori poput enzima, promjena temperature, pH te brojnih drugih pridonose degradaciji dentalnih restaurativnih materijala. Stanice oralne sluznice su konstantno izložene topljivim komponentama dentalnih materijala, zato je njihova biokompatibilnost od primarne važnosti za uspjeh restaurativne terapije (42, 46). Mikronukleus test koji koristi odljuštene epitelne stanice je minimalno invazivan, visoko osjetljiv i jeftin način praćenja genotoksičnog učinka (oštećenja DNK, proliferativnog potencijala bazalnih stanica i stanične smrti) i citotoksičnog učinka na mjestu prvog kontakta. Ovaj indeks je direktno proporcionalan s frekvencijom mikronukleusa u određenom broju epitelnih stanica što konačno ukazuje na povećan rizik od nastanka karcinoma (43, 47-49).

U istraživanju su sudjelovali ispitanici sa zdravom denticijom i oni s isključivo kompozitnim ispunima, pod uvjetom da ni jedan nije napravljen u zadnja tri mjeseca. Dobiveni rezultati nisu pokazali nikakvu značajnu razliku u broju mikronukleusa kod pacijenata s kompozitnim ispunima i zdravom denticijom, kao ni razliku ovisno o broju restauriranih ploha ($p=0,492$). Također broj restauriranih ploha nije utjecao na broj stanica s kariolizom ($p=0,438$), karioreksom ($p=0,503$), piknozom ($p=0,356$), jezgrenih pupoljaka ($p=0,331$) i binuklearnih stanica ($p=0,451$).

Rezultati objedinjeni u ovoj studiji su u korelaciji s istraživanjem u kojem je pronađena prolazna genotoksičnost kompozitnih materijala na gingivalne fibroblaste nakon sedam i trideset dana od postavljanja ispuna, gdje se broj mikronukleusa vratio na osnovnu razinu nakon šest mjeseci, a što potvrđuje genomnu stabilnost stanica nakon dugotrajne izloženosti materijalima (46). Rezultati ovog istraživanja su također u skladu sa studijom Pettini i suradnika (47), u kojoj je mjerena moguća genotoksičnost dentalnih kompozitnih materijala u grupi ispitanika s nekoliko zuba ispunjenih istim materijalom. U spomenutoj studiji nije pronađena poveznica između izloženosti ispitanika i pojavnosti kromosomskih aberacija, izmjene sestrinskih kromatidnih lanaca (SCE) i visini frekvencije SCE-a. U studiji Kasacka i Lapinska (50) je gledana morfološku aktivnost stanica iz sline kod nosioca

amalgamskih i kompozitnih ispuna te kontrole (bez ispuna). Oni nisu uočili razlike u broju, obliku i veličini stanica i same jezgre u pojedinaca s kompozitnim ispunim i kontrolne skupine bez ispuna. Rezultati još jedne *in vivo* provedene studije brazilske grupe autora potvrđuje dobivene rezultate. Oni nisu uočili povećanje broja stanica s mikronukleusom u djece nakon mjesec dana od postavljanja restauracije smolastim materijalima u odnosu na kontrolni uzorak (prije postavljanja ispuna) (51).

Postoje indicije da mnoge tvari otpuštene iz kompozita mogu imati toksične učinke. Gotovo svi monomeri i aditivi su se pokazali toksičnima, ali samo u visokim koncentracijama. Bouillaguet i sur. (49) su u svojim *in vitro* istraživanju primijetili da polimerizirani kompozitni materijal otpušta najveću količinu monomera u prva 24 sata kada je njegova citotoksičnost najveća te da s vremenom postaje sve manje i manje toksičan. Ovi rezultati su također potvrđeni *in vivo* istraživanjima (52). Michelsen i sur. (52) su u svojoj *in vivo* studiji istraživali količinu monomera u ljudskoj slini nakon restauracije kompozitnim smolama. Monomeri nisu pronađeni u uzorcima nestimulirane sline skupljene nakon 24 sata i 7 dana nakon postavljanja kompozitnog ispuna. Također je zanimljivo da u ovoj studiji nisu pronađeni monomeri u slini uzetoj prije postavljanja novog kompozitnog ispuna, iako je pacijent imao ranije kompozitom restaurirane zube, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja.

Otkrića ovog istraživanja su u suprotnosti s podatcima Di Pietro i sur. (53) i Visalli i sur. (42). Di Pietrova grupa (53) proučavala je efekt dentalnih restaurativnih materijala na perifernu krv, limfocite i bukalne stanice u pacijenata s kompozitnim ispunima u usporedbi s onima bez ispuna. Rezultati komet testa su u limfocitima iz ljudske krvi pokazali kako su oštećenja DNK dva puta veća u izloženoj skupini nego u kontrolnoj. Također se s produljenim izlaganjem i porastom broja ispuna povećavalo i oštećenje DNK. Slični rezultati su dobiveni i u drugoj studiji u kojoj su analizirali oralne mukozne stanice 63 mlada ispitanika pomoću komet i mikronukleus testa te prateći markere stanične smrti. Zaključci doneseni na osnovi rezultata mikronukleus i komet testa, pokazali su kako kompozitni ispuni mogu uzrokovati genotoksična oštećenja, kako lokalno na mjestu otpuštanja tako i šireći se sistemno (42).

U našem istraživanju nije uzeto u obzir, ali su istraživanja Reichl i sur. (54) i Poplawski i sur. (55) pokazala kako monomeri iz smola mogu difundirati kroz dentin u pulpni prostor, odakle dalje krvotokom potencijalno do svih organa.

Ova studija ima nekoliko nedostataka koji su mogli utjecati na rezultat. Jedan od njih je nepoznavanje vrste kompozitnog materijala koji je korišten u ispitanika. Na primjer, različit sastav kompozitnih materijala utječe na postotak konverzije monomera u polimer o čemu ovisi topljenje rezidualnog monomera i njegov genotoksični učinak na oralnu mukozu. Osim tipa kompozita, nije uzeto u obzir ni vrijeme od postavljanja materijala, kao što bi to zahtijevalo klinički reprezentativno sakupljanje uzoraka.

Nije moguće standardizirati *in vivo* istraživanje. U usnoj šupljini brojni faktori utječu na testirani materijal i svaki pacijent se gleda kao posebna biološka varijacija. Nemogućnost standardiziranja ipak je prednost jer dopušta procjenu utjecaja kompozitnih materijala u njihovom prirodnom okruženju. Također je analiziran utjecaj ometajućih faktora poput godina, spola, pušenja, konzumacije alkohola, itd. na razliku u oštećenju DNK. Rezultati su pokazali značajnu razliku s obzirom na spol ($p=0,022$) i fizičku aktivnost ($p=0,018$) u broju stanica s mikronukleusom. Ovi rezultati se slažu s većinom do sada objavljenih studija (43).

Unatoč dvojbama oko sigurnosti kliničke upotrebe, ova studija nije pronašla dokaze o kompozitnim materijalima kao okidaču dugoročnog citogenetičkog učinka na epitelne stanice bukalne sluznice. U ovom trenu nema objektivnog i mjerljivog dokaza o genotoksičnosti uzrokovanom kompozitnim materijalima u kliničkoj praksi. Dok god je javnost posebno zainteresirana za sigurnost na smoli baziranih dentalnih materijala, definitivno je potrebno provoditi kontrolirana klinička ispitivanja da se isključi njihova toksičnost.

6. ZAKLJUČCI

Iz navedenih rezultata dolazimo do sljedećih zaključaka:

1. Nema razlike u parametrima citotoksičnosti i genotoksičnosti dobivenih mikronukleus testom između ispitanika bez i sa kompozitnim ispunima.
2. Nema razlike u parametrima citotoksičnosti i genotoksičnosti dobivenih mikronukleus testom između ispitanika ovisno o broju ploha zuba restauriranih kompozitnim ispunom.
3. Pošto su kompozitni materijali dugo vremena u bliskom kontaktu s tkivima usne šupljine gdje pod utjecajem različitih uvjeta dolazi do njegove degradacije i otpuštanja aktivnih supstanci, poželjna su daljnja *in vivo* istraživanja njihove potencijalne toksičnosti.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Dogon IL. Present and future value of dental composite materials and sealants. Int J Technol Assess Health Care. 1990;6(3):369-77.

2. Gerzina TM, Hume WR. Effect of dentine on release of TEGDMA from resin composite *in vitro*. J Oral Rehabil. 1994;21(4):463-8.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. Anusavice KJ, de Rijk WG. Performance of dental biomaterials: conference report. Dent Mater. 1990;6(1):69-72.

7. 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.

8. Soderholm KJ, Zigan M, Ragan M, Fischlschweiger W, Bergman M. Hydrolytic degradation of dental composites. J Dent Res. 1984;63(10):1248-54.

9. Bowen RL. Properties of a silica-reinforced polymer for dental restorations. J Am Dent Assoc. 1963;66:57-64.

10. Ruyter IE, Oysaed H. Composites for use in posterior teeth: composition and conversion. J Biomed Mater Res. 1987;21(1):11-23.

11. Cook WD, Beech DR, Tyas MJ. Resin-based restorative materials-a review. Aust Dent J. 1984;29(5):291-5.

12. Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. J Dent Res. 1991;70(11):1450-5

13. Goldman M. Polymerization shrinkage of resin-based restorative materials. Aust Dent J. 1983;28(3):156-61.

14. Venhoven BA, de Gee AJ, Davidson CL. Polymerization contraction and conversion of light-curing BisGMA-based methacrylate resins. Biomaterials. 1993;14(11):871-5.

15. Saltzberg DS, Ceravolo FJ, Holstein F, Groom G, Gottsegen R. Scanning electron microscope study of the junction between restorations and gingival cavosurface margins. J Prosthet Dent. 1976;36(5):517-22.

16. Bouillaguet S. Biological Risks of Resin-Based Materials to the Dentin-Pulp Complex. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15(1):47-60.

17. Kidd EA, Beighton D. Prediction of secondary caries around tooth-colored restorations: a clinical and microbiological study. J Dent Res. 1996;75(12):1942-6.

18. Bergenholtz G. Evidence for bacterial causation of adverse pulpal responses in resin-based dental restorations. Crit Rev Oral Biol Med. 2000;11(4):467-80.

19. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. Oper Dent. 2003;28(3):215-35.

20. Schwartz RS, Fransman R. Adhesive dentistry and endodontics: materials, clinical strategies and procedures for restoration of access cavities: a review. J Endod. 2005;31(3):151-65.

21. Gociu M, Patroi D, Prejmerean C, Pastrav O, Boboia S, Prodan D, et al. Biology and cytotoxicity of dental materials: an *in vitro* study. Rom J Morphol Embryol. 2013;54(2):261-5.

22. Hume WR, Gerzina TM. Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. Crit Rev Oral Biol Med. 1996;7(2):172-9.

23. Murray PE, Garcia Godoy C, Garcia Godoy F. How is the biocompatibilty of dental biomaterials evaluated? Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2007;12(3):E258-66.

24. Lemons J, Natiella J. Biomaterials, biocompatibility, and peri-implant considerations. Dent Clin North Am. 1986;30(1):3-23.

25. Schmalz G. Materials science: biological aspects. J Dent Res. 2002;81(10):660-3.

26. Roulet JF, Walti C. Influence of oral fluid on composite resin and glass-ionomer cement. J Prosthet Dent. 1984;52(2):182-9.

27. 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.

28. Akgul N, Gul P, Alp HH, Kiziltunc A. Effects of composite restorations on nitric oxide and uric acid levels in saliva. Contemporary Clinical Dentistry. 2015;6(3):381-5.

29. Oilo G. Biodegradation of dental composites/glass-ionomer cements. Adv Dent Res. 1992;6:50-4.

30. Drummond JL. Degradation, fatigue and failure of resin dental composite materials. J Dent Res. 2008;87(8):710-9.

31. Gupta SK, Saxena P, Pant VA, Pant AB. Release and toxicity of dental resin composite. Toxicol Int. 2012;19(3):225-34.

32. Munksgaard EC, Freund M. Enzymatic hydrolysis of (di)methacrylates and their polymers. Scand J Dent Res. 1990;98(3):261-7.

33. 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.

34. 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.

35. Gopferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. Biomaterials. 1996;17(2):103-14.

36. Kostoryz EL, Dharmala K, Ye Q, Wang Y, Huber J, Park J-G, et al. Enzymatic Biodegradation of HEMA/BisGMA Adhesives Formulated With Different Water Content. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009;88(2):394-401.

37. Larsen IB, Munksgaard EC. Effect of human saliva on surface degradation of composite resins. Scand J Dent Res. 1991;99(3):254-61.

38. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. Dent Mater. 2006;22(3):211-22.

39. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. Crit Rev Oral Biol Med. 2000;11(3):333-55.

40. Porto ICCdM, Andrade AKMd, Guênes GMT, Ribeiro AIAM, Braz R, Castro CMMBd. *in vitro* potential cytotoxicity of an adhesive system to alveolar macrophages.Braz Dent J. 2009;20:195-200.

41. W. E. Biocompatibility. In advances in ceramics - electric and magnetic ceramics, bioceramics, ceramics and environment: InTech; 2011.

42. 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.

43. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. Mutat Res. 2008;659(1-2):93-108.

44. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. Mutat Res. 1992;271(1):69-77.

45. Yadav A.S JS. Buccal Micronucleus Cytome Assay-A Biomarker of Genotoxicity. J Mol Biomark Diagn. 2015;6(3):6.

46. Tadin A, Galic N, Mladinic 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. 2014;18(1):87-96.

47. Pettini F, Savino M, Corsalini M, Cantore S, Ballini A. Cytogenetic genotoxic investigation in peripheral blood lymphocytes of subjects with dental composite restorative filling materials. J Biol Regul Homeost Agents. 2015;29(1):229-33.

48. Neri M, Fucic A, Knudsen LE, Lando C, Merlo F, Bonassi S. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review.Mutat Res. 2003;544(2-3):243-54.

49. 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.

50. Kasacka I LJ. Salivary cells in patients with dental amalgam and composite resin material restorations – a morphological investigation. PJoES. 2010;19(6):1223-7.

51. Rezende EF M-CM, Fonseca JC, Ribeiro AO. Nuclear anomalies in the buccal cells of children under dental treatment. RSBO. 2011;8:182-8.

52. 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.

53. 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.

54. 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.

55. 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.

8. SAŽETAK

Naslov: Citotoksični i genotoksični učinak modernih restaurativnih materijala na stanicama bukalne sluznice

Cilj istraživanja: Procijeniti mogući genotoksični i citotoksični učinak dentalnih kompozita promatrajući učestalost mikronukleusa i drugih morfoloških promjena jezgre u oljuštenim bukalnim stanicama

Materijali i metode: Brisevi su uzeti s bukalne mukoze 115 zdravih ispitanika. Svi sudionici su imali ili zdravu denticiju ili isključivo kompozitne ispune. Genotoksičnost i citotoksičnost je procijenjena mikronukleus testom.

Rezultati: Rezultati nisu pokazali nikakvu značajnu razliku u broju stanica s mikronukleusom u ispitanika s različitim brojem ploha zuba restauriranih u kompozitu (p=0,492). Također broj restauriranih ploha nije imao utjecaja na morfološke promjene jezgre kao što su karioliza (p=0,438), karioreksa (p=0,503) i piknoza (p=0,356).

Zaključak: Unatoč sumnji u sigurnost kliničke upotrebe kompozitnih smola, ovo istraživanje nije našlo nikakav dokaz da kompozitni materijali uzrokuju dugoročno citogenetičko oštećenje na epitelnim stanicama bukalne mukoze u ljudi. Nema ni objektivne i mjerljive potvrde genotoksičnosti uzrokovane kompozitom u kliničkoj praksi.

9. SUMMARY

Thesis Title: Cytotoxic and genotoxic effect of contemporary restorative materials on buccal cells of oral cavity

Research objective: To evaluate the possible geno/cytotoxic effects of dental composite materials by assessing the frequency of micronuclei formation and other nuclear abnormalities in the exfoliated buccal epithelium.

Materials and methods: Swabs were taken from the buccal mucosa among 115 young healthy subjects. All participants had healthy dentition or dentition restored only with composite materials. Genotoxicity and cytotoxicity was assessed by micronucleus assay.

Results: The results indicated no significant difference in number of oral mucosa cells with micronuclei in subjects with different numbers of composite restored tooth surfaces ($p=0.492$). Also, the number of restored surfaces had no effect on nuclear alterations closely related to cytotoxicity, such as karyolysis ($p=0.448$), karyorrhexis ($p=0.503$) and picnosis ($p=0.356$).

Conclusion: Despite doubts about the safe clinical use of resin composites, this study found no evidence that composite materials trigger long-term cytogenetic damage in the epithelial cells of buccal mucosa in humans. There is no objective and quantifiable evidence of genotoxicity induced by composite restorative materials in clinical practice.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI:

Ime i prezime: Klara Ugrin

Datum i mjesto rođenja: 21. srpnja 1991. u Splitu, Republika Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa stanovanja: Sv. Ivana 33 Donje Sitno, Žrnovnica

Telefon: 0989762833

E-mail: klaraugrin100@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- 1998-2006. Osnovna škola „Žrnovnica“, Žrnovnica
- 2006-2010. Opća gimnazija „Marko Marulić“, Split
- 2010-2016. Medicinski fakultet, integrirani studij Dentalna medicina, Split

MATERINJI JEZIK:

- Hrvatski jezik

OSTALI JEZICI:

- Engleski jezik: C1
- Njemački jezik B1

AKTIVNOSTI I VJEŠTINE:

- Demonstrator u Katedri za restaurativnu dentalnu medicinu i endodonciju (ak. god 2015./2016)
- Član studentskog zbora