

# Procjena citotoksičnoga i genotoksičnoga utjecaja suvremenih dentalnih materijala in vitro

---

**Trutina Gavran, Milena**

**Doctoral thesis / Doktorski rad**

**2024**

*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:127:892914>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-01**



*Repository / Repozitorij:*

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





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Milena Trutina Gavran

**PROCJENA CITOTOKSIČNOGA I  
GENOTOKSIČNOGA UTJECAJA  
SUVREMENIH DENTALNIH MATERIJALA  
*IN VIVO***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Milena Trutina Gavran

**PROCJENA CITOTOKSIČNOGA I  
GENOTOKSIČNOGA UTJECAJA  
SUVREMENIH DENTALNIH MATERIJALA  
*IN VIVO***

DOKTORSKI RAD

Mentori: prof. dr. sc. Nada Galić, prof. dr. sc. Davor Želježić

Zagreb, 2024.



UNIVERSITY OF ZAGREB  
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Milena Trutina Gavran

**EVALUATION OF CYTOTOXIC AND  
GENOTOXIC IMPACT OF MODERN  
DENTAL MATERIALS *IN VIVO***

DOCTORAL THESIS

Mentors: prof. dr. sc. Nada Galić, prof. dr. sc. Davor Želježić

Zagreb, 2024.

Rad je izrađen u Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju Stomatološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu i u Ordinaciji dentalne medicine Milene Trutine Gavran.

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: Sandra Tolić, prof. hrvatskog jezika i književnosti  
Kotezi 94, 21276 Vrgorac  
Tel: 091 163 5162

Lektor engleskog jezika: Ivana Pločkinić, prof. engleskog jezika  
Hrvatskih Velikana 16, 21315 Dugi Rat  
Tel: 092 305 0775

Sastav Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada:

1. prof. dr. sc. Katica Prskalo, predsjednica
2. prof. dr. sc. Sanja Šegović, član
3. prof. dr. sc. Damir Mihelić, član

Sastav Povjerenstva za obranu doktorskog rada:

1. prof. dr. sc. Katica Prskalo, predsjednica
2. prof. dr. sc. Sanja Šegović, član
3. prof. dr. sc. Damir Mihelić, član
4. izv. prof. dr. sc. Jurica Matijević, zamjena

Rad sadrži: 112 stranica

17 tablica

28 slika

1 CD

## ZAHVALA

Zahvaljujem svojim dragim mentorima prof. dr. sc. Nadi Galić i prof. dr. sc. Davoru Želježiću na neizmornoj podršci i susretljivosti prilikom izrade ovog rada.

Veliko hvala mojoj sestri Sanji, dr. dent. med., na stručnoj podršci, kao i Igoru na velikom strpljenju, volji i pružanju neizmjerne informatičke pomoći.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji i roditeljima, a osobito svojim sinovima i majci kojima i posvećujem ovaj rad. Beskrajno sam im zahvalna na potpori, ljubavi i strpljenju. Vi ste moja najveća snaga.

Hvala Vam što postojite.

Milena

## SAŽETAK

Svrha ovog istraživanja bila je utvrditi koliko su suvremeni kompozitni materijali i dentalni amalgami biokompatibilni i sigurni za kliničku uporabu. Istraživanje je provedeno na 150 zdravih pacijenata dobi između 10 i 20 godina koji su imali ispune starosti između 6 i 12 mjeseci, izrađene od Filtek Z 550 kompozitnog materijala i ANA 2000 dentalnog amalgama. U uvjetima *in vivo* uzimao se bris bukalnih stanica u blizini ispuna. Pomoću proširenog mikronukleus testa (*cytomeassay*), analizom bukalnih stanica sluznice u blizini ispuna, želio se procijeniti citotoksični i genotoksični utjecaj kompozitnog materijala i dentalnog amalgama na te stanice, ovisno o broju ploha kompozitnih i amalgamskih ispuna. Rezultati Kruskal-Wallis *omnibus* testa pokazali su statistički značajne razlike između skupina ispitanika bez ispuna, s amalgamskim ispunima i s kompozitnim ispunima za sljedeće parametre mikronukleus testa: broj mikronuklea ( $p=0,006$ ), broj pupova ( $p<0,001$ ), broj binuklearnih stanica ( $p<0,001$ ), broj nukleoplazmatskih mostova ( $p<0,001$ ) i broj karioliza ( $p=0,003$ ). Broj mikronuklea bio je statistički značajno veći u skupini ispitanika s amalgamskim ispunima i kompozitnim ispunima u usporedbi sa skupinom bez ispuna. Rezultati za jezgrene pupove, za broj binuklearnih stanica i broj nukleoplazmatskih mostova pokazali su da je skupina s amalgamskim ispunima imala statistički značajno veći broj ovih promjena u usporedbi sa ostalim skupinama. Rezultati regresijske analize povezanosti parametara mikronukleus testa i broja amalgamskih te kompozitnih ploha pokazali su niske vrijednosti  $R^2$ , što ukazuje na činjenicu da se razmjerno mali udio ukupne varijance može objasniti brojem amalgamskih/kompozitnih ploha. Na temelju rezultata može se zaključiti da su bukalne stanice ispitanika s amalgamskim ispunima pokazale najviši stupanj genotoksičnih promjena, zatim slijede oni s kompozitnim ispunima i najmanji su stupanj pokazale bukalne stanice pacijenata bez ispuna. Parametri koji ukazuju na citotoksične promjene stanica nisu bili povišeni ni kod ispitanika s kompozitnim ni s amalgamskim ispunima. Rezultati multivarijatne regresijske analize, koja je provedena kako bi se utvrdio utjecaj potencijalnih genotoksičnih čimbenika, vezanih za životni stil pacijenata na ishode mikronukleus testa, pokazali su da su se određeni prediktori (dijagnostičko zračenje, konzumacija kave, konzumacija kuhane, suhomesnate i pečene hrane) statistički značajno odrazili na neke pokazatelje citotoksičnosti i genotoksičnosti.

**Ključne riječi:** citotoksičnost, genotoksičnost, kompozitni materijali, dentalni amalgam, mikronukleus test, bukalne epitelne stanice.

## ABSTRACT

**Introduction:** In dentistry, a wide range of dental materials are used for the restoration of lost hard dental tissues. The question of whether and to what extent dental materials can be dangerous for patients, dental staff and the environment is of crucial importance.

Therefore, all dental materials today must meet a series of special regulations and directives, which aims to guarantee efficiency and high quality and to ensure that only biocompatible materials can enter the market. Since dental materials in the oral cavity are subject to mechanical, chemical, thermal and other influences, constant monitoring and *ex vivo* and *in vivo* clinical research of all dental materials is necessary, even though they have passed all tests and received permission for official use.

**Objectives:** The purpose of this research was to determine how biocompatible and safe modern composite materials and dental amalgams are for clinical use because, as materials used to make dental fillings, they come into direct and permanent contact with oral tissues. The aim was to evaluate the cytotoxic and genotoxic potential of composite material and dental amalgam, depending on the number of surfaces of composite and amalgam fillings and their age in the oral cavity, by analyzing cells of the buccal mucosa using the micronucleus test.

**Participants and methods:** The research was conducted on healthy patients aged 10 to 20 years, using composite materials Filtek Z 550 and amalgam ANA 2000. In *in vivo* conditions, using a cytological brush (cytobrush), a smear of exfoliated buccal mucosa cells was taken, after which the cells, according to a certain protocol, were prepared for an expanded micronucleus test (cytomeassay).

**Results:** Hypotheses testing was performed using a non-parametric approach, i.e. Kruskal-Wallis one-way ANOVA. The results of the Kruskal-Wallis omnibus test show statistically significant differences between the groups of subjects without fillings, with amalgam fillings and with composite fillings for the following parameters of the micronucleus test: number of micronuclei ( $p=0.006$ ), number of buds ( $p<0.001$ ), number of binuclear cells ( $p<0.001$ ), the number of nucleoplasmic bridges ( $p<0.001$ ) and the number of karyolysis ( $p=0.003$ ).

For the other parameters of the micronucleus test (morphological changes of the broken egg type, pyknosis, karyorexia, condensed chromatin), no statistically significant differences



between the groups were observed. The number of micronuclei was statistically significantly higher in the group of subjects with amalgam fillings and composite fillings compared to the group without fillings. The results for nuclear buds, for the number of binuclear cells and the number of nucleoplasmic bridges show that the group with amalgam fillings had a statistically significantly higher number of these changes compared to the other groups. The number of caryolysis in the group without fillings was statistically significantly higher than in the group with amalgam fillings and the group with composite fillings. The results of the regression analysis of the relationship between the parameters of the micronucleus test and the number of amalgam and composite surfaces showed low values of  $R^2$ , which indicates the fact that a relatively small part of the total variance can be explained by the number of amalgam/composite surfaces. Based on the results, it can be concluded that a certain degree of genotoxicity was observed by examining the buccal cells in all subjects. The buccal cells of subjects with amalgam fillings showed the highest level of genotoxicity, followed by those with composite fillings and the least buccal cells of patients without fillings. However, due to the possibility of repairing damaged DNA, the above results can be interpreted as relative indicators of genotoxicity. The parameters indicating cell cytotoxicity were not elevated either in subjects with composite or amalgam fillings. Multivariate regression analysis was performed to determine the associations between potential genotoxic factors related to patients' lifestyle and micronucleus test parameters. The aim of such an analysis was to examine which of the subjects' dietary and other habits could influence the results of the micronucleus test, in addition to the influence of amalgam and composite fillings. The results showed that the number of buds was statistically significantly higher for the four examined predictors (diagnostic radiation, consumption of cooked, dried meat and baked food). Diagnostic radiation was reflected on three (number of micronuclei, number of buds and number of pyknosis nucleoplasmic bridges), and coffee consumption on two (number of nucleoplasmic bridges and number of pyknose) indicators of cytotoxicity and genotoxicity.

**Conclusions:** Amalgam fillings showed a genotoxic effect on buccal mucosa cells, composite fillings showed a limited genotoxic effect, while the number of surfaces of amalgam and composite fillings in the oral cavity did not significantly affect their genotoxic effect on buccal cells. Cytotoxic effects have not been proven for either amalgam or composite fillings. Due to the limited number of respondents who voluntarily participated in this research, the obtained effects of the material are indicative values and should be confirmed on a larger study group over a longer period of time.

Composite and amalgam fillings remain in close contact with the tissues of the oral cavity (gingiva, pulp, oral mucosa) for a long time, during which degradation of the material and release of active substances may occur, so future research into their possible cytotoxicity and genotoxicity *in vivo* is necessary.

**Key words:** cytotoxicity, genotoxicity, composite materials, dental amalgam, micronucleus test, buccal epithelial cells.

## POPIS OZNAKA I KRATICA

Bis-GMA	Bisfenol-A-glicidilmetakrilat
TEGDMA	Trietilen-glikol-dimetakrilat
Bis-EMA	Bisfenol-A-etilmetakrilat
Bis-PMA	Bisfenol-A-propil-metakrilat
Bis-DMA	Bisfenol dimetakrilat
BPA	Bisfenol-A
UDMA	Uretan dimetakrilat
MMA	Metilmetakrilat
MAA	Metakrilna kiselina
EGDMA	Etilenglikol dimetakrilat
HEMA	Hidroksi-etil-metakrilat
LED	Diodni polimerizatori koji emitiraju plavo svjetlo
FDA	Agencija za hranu i lijekove
ANSI	Američki nacionalni insitut za standarde
ISO	Međunarodna organizacija za standarde
ADA	Američko dentalno udruženje
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina
ROS	Reaktivni kisikovi spojevi

## SADRŽAJ

1.0. UVOD .....	1
1.1. Biokompatibilnost dentalnih materijala.....	2
1.2. Testovi za procjenu biokompatibilnosti dentalnih materijala .....	7
1.2.1. Mikronukleus test.....	10
1.3. Kompozitni materijal .....	14
1.3.1. Sastav kompozita.....	14
1.3.2. Klasifikacija kompozita.....	17
1.3.3. Polimerizacija kompozita .....	18
1.3.4. Biokompatibilnost kompozitnih materijala.....	21
1.4. Dentalni amalgam .....	25
1.4.1. Sastav dentalnog amalgama.....	28
1.4.2. Svojstva dentalnog amalgama.....	30
1.4.3. Toksičnost dentalnog amalgama.....	30
2.0. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	34
3.0. MATERIJALI I POSTUPCI/ISPITANICI I POSTUPCI.....	36
3.1. Materijali.....	37
3.2. Ispitanici .....	37
3.3. Uzorkovanje stanica .....	38
3.4. Mikronukleus test .....	38
3.5. Statistička obrada podataka.....	39
4.0. REZULTATI .....	40
5.0. RASPRAVA .....	79
6.0. ZAKLJUČAK .....	92
7.0. LITERATURA.....	95
8.0. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA .....	110
8.1. Popis objavljenih radova .....	111

## **1. UVOD**

U suvremenoj restaurativnoj stomatologiji, odnosno dentalnoj medicini primjenjuje se široki raspon dentalnih materijala (kompozitni materijali, dentalni amalgami, staklenoionomerni cementi i dr.). Ovi materijali se primjenjuju za pečačenje fisura, nadoknadu izgubljenih tvrdih zubnih tkiva uslijed karijesnih i nekarijesnih lezija i iz drugih razloga, izradom izravnih i neizravnih restauracija (*inlay, onlay, overlay*). Da bi se neki materijal mogao primijeniti u usnoj šupljini i općenito u organizmu čovjeka, mora, prije svega, biti biokompatibilan. U skladu s tim uspješna klinička uporaba dentalnih materijala ovisi, prije svega, o stupnju njihove biokompatibilnosti i fizikalno-kemijskim svojstvima te načinu rukovanja i primjeni u usnoj šupljini.

Što se tiče pitanja mogu li i u kojoj mjeri dentalni materijali biti opasni za pacijente, stomatološko osoblje i okoliš su od presudnog značenja. Radi toga svi dentalni materijali danas moraju zadovoljavati niz posebnih propisa i direktiva u gotovo svim zemljama svijeta, čime se žele jamčiti učinkovitost i visoka kakvoća te osigurati da na tržište mogu doći samo biokompatibilni materijali. Pritom su proizvođači odgovorni za sigurnost i kvalitetu svojih medicinskih proizvoda, no na stomatologu je odgovornost za izbor najprikladnijeg materijala za svaku specifičnu indikaciju kod pojedinog pacijenta. Nadalje, stomatolog je primarna osoba za sva pitanja i nedoumice svakog pojedinog pacijenta te mora dobro poznavati područje biokompatibilnosti dentalnih materijala koji čvrsto povezuju suvremenu stomatologiju s drugim medicinskim disciplinama, biologijom, kemijom, fizikom i nizom drugih područja (1–4).

U ovom radu ispitati smo biokompatibilnost dentalnih materijala pomoću mikronukleus testa u in vivo kliničkom istraživanju.

### **1.1. Biokompatibilnost dentalnih materijala**

Dentalni materijal mora biti bezopasan za sva oralna tkiva: gingivu, oralnu sluznicu, pulpu i kost. Ne smije sadržavati toksične tvari koje mogu ući u cirkulaciju i izazvati: sistemsku toksičnu reakciju, preosjetljivost ili alergijsku reakciju. Ne smiju djelovati teratogeno ili kancerogeno. Biokompatibilnost podrazumijeva da na primijenjeni materijal organizam domaćina ne razvija obrambenu reakciju.

Budući da gotovo svi restaurativni dentalni materijali ipak izazivaju neki odgovor okolnih tkiva i sustavnu reakciju domaćina, u novije vrijeme se pokušava prilagoditi dosadašnja definicija biokompatibilnosti te se biokompatibilnost nekog materijala opisuje kao njegova sposobnost da tijekom kliničke primjene stimulira povoljan odgovor domaćina (1–5).

Poput mnogih drugih disciplina, područje biokompatibilnosti ima težnju dogovoriti na općeprihvaćene definicije pojmova, stoga se, iako to nije uvijek bilo uspješno, pokušala napraviti sistematizacija pojmova vezanih za biokompatibilnost.

Biomaterijal je svaki nevitalni materijal namijenjen za primjenu tijekom duljeg razdoblja unutar organizma, odnosno biološkog sustava, s ciljem liječenja ili zamjene tkiva, organa ili njihove funkcije. U skladu s tim stomatološki materijali umetnuti u usnu šupljinu spadaju u skupinu biomaterijala. Budući da većina materijala sadrži neke toksične komponente, većina zemalja dopušta korištenje samo onih dentalnih materijala koji su uspješno prošli poseban proces certificiranja (1–4). Kako je ljudsko tijelo svakim danom izloženo sve većem broju potencijalnih toksičnih tvari, reakcije na štetne tvari mogu se reflektirati kao blaga preosjetljivost ili kao izrazita alergijska reakcija. Jednako tako postoji mogućnost da tijelo ne pokazuje vidljive promjene, a da neka tvar djeluje teratogeno ili kancerogeno na ljudski organizam. Upravo zbog takvih neželjenih reakcija, a i činjenice da dentalni materijali predstavljaju veliki problem jer su prisutni u tijelu 24 sata na dan, materijali koji dolaze u bliski dodir s tijelom moraju biti biokompatibilni, tj. moraju biti biološki podnošljivi. Prema definiciji biokompatibilnosti, biokompatibilan je onaj materijal koji može egzistirati unutar ili pored živog tkiva, a da mu ne šteti (4–6). Biokompatibilnost se procjenjuje kroz genotoksičnost, mutagenost, karcinogenost, citotoksičnost, histokompatibilnost i mikrobiološki učinak (1, 4, 6–8).

Kako bi dentalni materijali mogli doći u uporabu, moraju proći niz testova koji podrazumijevaju standardne specifikacije, u koje ubrajamo fizikalna, kemijska i biološka svojstva materijala (usporedba s nekim od provjerenih materijala u uporabi). Potom slijedi laboratorijska evaluacija gdje se nastoje postići uvjeti slični usnoj šupljini i klinički pokusi, koji se obično odvijaju pod optimalnim uvjetima (1, 2, 6). Danas se, uz fizička i kemijska svojstva, rade i biološka testiranja koja obuhvaćaju primarne testove (stanični odgovor), sekundarne testove (tkivni odgovor) i testove na pokusnim životinjama. Provjera toksičnosti materijala izvodi se pomoću testova staničnih kultura (trajne stanične linije: HeLa, 3T3 ili L929, primarne diploidne stanice-oralni fibroblasti) (8, 9-14), genotoksičnosti (prokariotski i eukariotski testovi), implantacije u potkožno vezivno tkivo, mišići i kosti laboratorijskih

štakora, kunića, zamoraca, hrčaka, tvorova, testova na životinjama te pomoću istraživanja na ljudima, koje podrazumijevaju samo testiranje i statističku procjenu toksičnosti materijala koji su već dobili dozvolu za uporabu (1, 4, 8). Potrebno je neprestano testirati biokompatibilnost svih dentalnih materijala i *ex vivo* i *in vivo* iako su prošli sva testiranja i dobili dozvolu za službenu uporabu (15–18).

Budući da gotovo svi restaurativni dentalni materijali ipak izazivaju neki odgovor okolnih tkiva i sustavnu reakciju domaćina, u novije vrijeme se pokušava prilagoditi dosadašnja definicija biokompatibilnosti te se biokompatibilnost nekog materijala opisuje kao njegova sposobnost da tijekom kliničke primjene stimulira povoljan odgovor domaćina (1, 2, 6, 8).

Toksičnost nekog materijala je njegova sposobnost da uzrokuje štetne učinke, koji mogu pogoditi jednu stanicu, grupu stanica, organski sustav ili cijelo tijelo. Toksični učinak može biti vidljivo oštećenje ili smanjenje učinkovitosti, odnosno funkcije koja je mjerljiva jedino testom. Većina dentalnih materijala sadrži neku potencijalno toksičnu komponentu, na koju organizam može reagirati jer gotovo svi navedeni materijali otpuštaju tvari u usnoj šupljini. Odgovor organizma na dentalne materijale može biti lokalni (gingiva, oralna sluznica, pulpa, tvrda zubna tkiva) ili sistemski (udaljena tkiva ili organi, najčešće alergijska reakcija). Pritom mogu izazvati reakciju (npr. upalu ili nekrozu) u susjednim tkivima (lokalna toksičnost), kao što je oralna sluznica/gingiva, pulpa ili alveolarna kost ili mogu ući u tijelo čovjeka različitim putevima, uključujući gutanje sline i udisanje, s naknadnim prolaskom epitelne barijere u gastrointestinalnom traktu ili plućima. Spomenute tvari mogu, putem krvotoka, biti prevezeni do različitih organa te može doći do poremećaja njihove funkcije ako je koncentracija dovoljno visoka (sustavna toksičnost). Sustavna toksičnost se, prema vremenskom trajanju, dijeli na akutnu (vrijeme izloženosti do 24 h), subakutnu (do 3 mjeseca) i kroničnu toksičnost. (1, 8, 19).

Citotoksičnost je izraz koji opisuje koliko je neki spoj ili tvar otrovna za stanice (20). Citotoksični spoj može uzrokovati oštećenje ili smrt stanice, bilo putem nekroze ili apoptoze. Apoptoza i nekroza su dva mehanizma uključena u staničnu smrt u višestaničnih organizama. Apoptoza se opisuje kao aktivan, programirani proces stanične smrti, koja omogućuje redoviti i kontrolirani mehanizam rasta i razvoja organizma. Naziva se i staničnim samoubojstvom jer u tom procesu stanica sudjeluje u svojoj smrti. Apoptoza omogućuje održavanje ravnoteže umnožavanja stanica. Primjer su crvena krvna zrnca, koja žive samo 120 dana i uništavaju svoje stanice iznutra, to jest apoptozom. Tijekom apoptoze nastaju određene morfološke promjene stanica. Stanica se sušenjem skuplja, kondenzira i naposljetku je rascjepkana uz izraženu kondenzaciju kromatina u jezgri. Tijekom odumiranja stanice ovim načinom stvaraju



se vezikule koje se nazivaju apoptotička tjelešca i sadrže sadržaj stanice, stoga tijekom apoptoze nema oslobađanja sadržaja stanice u izvanstanični okoliš te nema upalnog odgovora okolnog tkiva. Nekroza se opisuje kao pasivna, slučajna stanična smrt koja je posljedica poremećaja okoliša s nekontroliranim otpuštanjem upalnog staničnog sadržaja. Nasuprot apoptozi, stanična smrt kao odgovor na oštećenje tkiva u nekrozi pokazuje različite morfološke promjene. Kod nekroze stanice vanjski ekstremni uvjeti uzrokuju oštećenje unutarnjeg staničnog okoliša s brzim oštećenjem stanica i tkiva. Shodno tome, nekroza se definira kao pasivna i slučajna smrt stanice, tijekom koje se stanični sadržaj oslobađa u izvanstanični prostor i stvara štetne učinke na susjedne stanice te izaziva njihov upalni odgovor. Zaključno se može reći da se apoptoza promatra kao prirodni fiziološki proces, dok se nekroza opisuje kao patološki proces koji je uzrokovan vanjskim agensima poput toksina, traume i infekcija. Apoptoza je visoko reguliran i pravovremeni proces, dok je nekroza nereguliran i slučajan proces koji dovodi do upale i oštećenja okolnog tkiva. Temeljna razlika između apoptoze i nekroze očituje se u tome što je apoptoza unaprijed definirano samoubojstvo stanice, gdje stanica aktivno uništava samu sebe u svrhu održavanja nesmetanog funkcioniranja u tijelu, dok je nekroza slučajna smrt stanice koja se javlja zbog nekontroliranog djelovanja čimbenika iz vanjskog okruženja stanice. Neke tvari su citotoksičnije od drugih, stoga je cilj istraživača izmjeriti razine citotoksičnosti nekog dentalnog materijala kako bi osigurali da nije štetan i/ili opasan za pacijente (4, 5, 8, 19, 20–23).

Pojam genotoksičnosti odnosi se na štetan utjecaj određene supstance na genom DNA-e. Genotoksičnost se definira kao destruktivni učinak koji utječe na integritet genetskog materijala stanica (DNA, RNA) uzrokujući mutacije. Pri tome je važno naglasiti kako svi mutageni jesu genotoksični, ali neke genotoksične tvari nisu mutagene. Kemikalija ili agens koji može uzrokovati oštećenje DNK-a ili kromosoma naziva se genotoksin. Takvo oštećenje zametne stanice ima potencijal uzrokovati nasljedno izmijenjeno svojstvo (mutacija zametne linije). Stanice sprječavaju ekspresiju genotoksične mutacije ili popravkom DNA-e ili apoptozom, međutim, oštećenje se ne može uvijek popraviti, što dovodi do mutageneze. Promjena može imati izravne ili neizravne učinke na DNK: indukciju mutacija, aktivaciju neodređenog događaja i izravno oštećenje DNK-a koje dovodi do mutacija. Trajne, nasljedne promjene mogu utjecati ili na somatske stanice organizma ili na zametne stanice koje će se prenijeti budućim generacijama. Oštećenje DNA-e u somatskoj stanici može rezultirati somatskom mutacijom, što može dovesti do maligne transformacije stanica (1, 24). Razvijeni su brojni *in vitro* i *in vivo* testovi genotoksičnosti koji otkrivaju oštećenje DNK-a ili njegove

biološke posljedice u prokariotskim (npr. bakterijskim) ili eukariotskim (npr. stanicama sisavaca, ptica ili kvasaca) sustavima. Navedeni se testovi koriste za procjenu sigurnosti kemikalija iz okoliša i potrošačkih proizvoda te za istraživanje mehanizma djelovanja poznatih ili sumnjivih karcinogena. Brojni kemijski karcinogeni/mutageni podliježu metaboličkoj aktivaciji do reaktivnih vrsta koje se kovalentno vežu na DNK, a na taj način formirani adukti DNK-a mogu se detektirati u stanicama i ljudskim tkivima različitim osjetljivim tehnikama. Detekcija i karakterizacija adukata DNA-e u ljudskim tkivima predstavlja pomoć u etiologiji malignih promjena kod ljudi. U tu svrhu razvijene su brojne sofisticirane tehnike, uključujući Amesov test, *in vitro* i *in vivo* toksikološke testove, mikronuklus test, comet test i druge testovi za procjenu toksičnog potencijala materijala koji izazivaju oštećenje DNK-a koje može dovesti do patoloških promjena (1, 2, 8, 24, 25). Poznato je da određene tvari (npr. talidomid) mogu uzrokovati malformacije tijekom embrionalnog razvoja (teratogenost), stoga treba procijeniti tvari koje se oslobađaju iz materijala zbog potencijalnog rizika od teratogenog učinka. Jednako vrijedi i za mogući utjecaj na reproduktivnu sposobnost. U odnosu na dentalne materijale, navedeni zdravstveni učinci općenito su više teoretski jer do sada nisu klinički uočeni nakon primjene tih materijala (1, 8).

Imunotoksičnost materijala podrazumijeva štetne učinke na građu i funkciju imunološkog sustava. Spomenuti učinci oštećuju obranu domaćina (npr. protiv infekcije) i mogu uzrokovati oštećenje tkiva ili, preciznije govoreći, kroničnu upalu.

Alergijska reakcija na neku tvar može se pokrenuti kada je organizam već osjetljiv na taj spoj. Četiri su različite vrste alergijskih reakcija: tipovi I., II. i III. posredovani su protutijelima (IgE, IgG), dok tip IV. primarno prenose stanice. Stomatološki materijali, uglavnom, mogu uzrokovati alergije tipa I. (neposredna reakcija) i tipa IV. (odgođena reakcija). Koncentracije koje izazivaju reakciju kod prethodno osjetljive osobe variraju, a razine doza koje uzrokuju alergijske reakcije su općenito znatno niže od onih koji uzrokuju toksične.

Biokompatibilnost dentalnih amalgama, kompozita i ostalih dentalnih materijala od presudnog je značaja iz više razloga. Svi dentalni materijali su u bliskom i trajnom kontaktu s ljudskim oralnim tkivima kroz dugo razdoblje. Međutim, biokompatibilnost nekog dentalnog materijala se može mijenjati jer su oni u usnoj šupljini podložni mehaničkim, kemijskim, termičkim i drugim utjecajima, stoga su potrebna stalna praćenja i *ex vivo* i *in vivo* klinička istraživanja svih dentalnih materijala koji su prošli sva testiranja i dobili dozvolu za službenu uporabu (2). Stoga se, kao što je već navedeno, u novije vrijeme biokompatibilnost nekog

materijala definira kao njegova sposobnost da tijekom kliničke primjene potiče povoljan, a ne štetan odgovor domaćina (1, 2, 8, 26).

## **1.2. Testovi za procjenu biokompatibilnosti dentalnih materijala**

Ljudsko tijelo je svakim danom izloženo sve većem broju potencijalnih otrova. Reakcije na štetne tvari mogu se očitovati kao blaga preosjetljivost ili kao izrazita alergijska reakcija. Naravno, postoji mogućnost da tijelo ne pokazuje vidljive promjene, a da neka tvar djeluje teratogeno ili kancerogeno na ljudski organizam. Upravo zbog takvih neželjenih reakcija, materijali koji dolaze u bliski dodir s tijelom moraju biti biokompatibilni, tj. biološki prihvatljivi. Dentalni materijali predstavljaju veliki problem jer su prisutni u tijelu 24 sata na dan. Postoje dvije različite razine biokompatibilnosti:

### **1. Opća biokompatibilnost**

Na ovoj razini se proučava kako neki material reagira s ljudskim tkivom, odnosno je li materijal otrovan za stanicu. Većina ljudi će slično reagirati na takvu vrsta podražaja.

### **2. Imunološka biokompatibilnost**

Pojedinci različito reagiraju na pojedine materijale. Zbog toga se rade alergološka testiranja i pretrage krvi. Prema današnjim kriterijima, od stomatoloških materijala se traži da zadovoljavaju opću biokompatibilnost. FDA (Food and Drug Administration) je svrstala sve dentalne materijale u tri skupine, ovisno o njihovoj rizičnosti.

**KLASA I.:** Materijali niskog rizika koji zahtijevaju samo opću kontrolu, odnosno odgovarajući proces proizvodnje i skladištenje.

**KLASA II.a i II.b:** Materijali moraju zadovoljiti propise ANSI-e (American National Standard Institute).

**KLASA 3.:** Materijali se podvrgavaju najopširnijim testiranjima prije plasmana na tržište.

Materijali trebaju zadovoljiti određene funkcije, a da pri tom ne uzrokuju lokalne ili sistemske reakcije. Idealno, materijal ne smije biti štetan za gingivu, sluznicu, pulpu i kost. Ne smije

sadržavati otrovne tvari ili difuzibilne tvari koje se mogu apsorbirati u krvožilni sustav te uzrokovati sistemske reakcije na udaljenim tkivima ili organima. Usta su i specifičan medij gdje je materijal stalno izložen slini i bakterijama. Obveza je svih proizvođača dentalnih materijala postizanje sigurnosti prije plasmana na tržište, odnosno prije uporabe u svakodnevnoj praksi. Sigurnost nekog materijala danas se dokazuje toksikološkim i drugim istraživanjima koje je preporučio ISO, međunarodna organizacija za normizaciju. ISO nastoji ujediniti sve navedene standarde i izdati propise za određivane biološke podnošljivosti određenog materijala koji se koristi u medicinske svrhe. Neki dijelovi su već prihvaćeni, dok se drugi nadopunjavaju. Smjernice dvaju dokumenta ISO-a 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 (1). Standardi određuju vrstu testa, način provođenja, pripremu uzorka pa čak i uvjete u kojima se drže laboratorijske životinje. Postoje testovi koji već desetak godina služe kao baza za preporuku svih materijala. U prošlosti je sve bilo temeljeno na fizičkim i kemijskim karakteristikama materijala, a danas se obavezno provode i biološka testiranja. U skladu s postojećim standardima, svi dentalni materijali moraju biti testirani primarnim testovima (vrednovanje tkivnog odgovara), testovima na životinjama (usage testovi) te kliničkim testovima na ljudima. Svi proizvodi moraju proći četiri razine testiranja. U prvoj fazi ispituje se općenita toksičnost (citotoksičnost), u drugoj fazi lokalni tkivni odgovor (test implantacije na životinjama), nakon čega slijede pretkliničko korištenje na životinjama (faza III.) i kliničko testiranje na malom broju pacijenata (faza IV.) (1, 8, 26).

Nadalje, materijali su podijeljeni na one koji se primjenjuju površinski (npr. zubne proteze), one koji su u tijelu, ali na neki način komuniciraju s okolinom (npr. cementi i zubne plombe) i one koji se u potpunosti implantiraju u tijelo. Također, duljina kontakta određuje vrstu testiranja. Podijeljeni su u tri kategorije: ograničeni kontakt (do 24 sata), produljeni kontakt (od 24 sata do 30 dana) i stalni kontakt (dulje od 30 dana). Sve navedene smjernice olakšavaju daljnji odabir prikladnog testa. Rizik se, primjerice, može procijeniti prema postupcima koji su preporučeni standardnim smjernicama ISO-a (ISO 14971) (1).

### Testovi citotoksičnosti

Cilj testova staničnih kultura je uočiti potencijalnu toksičnost materijala koja se uočava na staničnim elementima. *In-vitro* testovi za istraživanje citotoksičnih reakcija predstavljaju

osnovu svih daljnjih testiranja. Uglavnom se koriste trajne matične stanice kao što su HeLa, 3T3 ili L 929 i oralni fibroblasti. Stanične kulture se mogu tretirati eluatom ispitivanog materijala ili izravnim kontaktom s ispitivanim materijalom. Rezultati testiranja se uglavnom poklapaju s *in-vivo* testiranjima, ali se u svakom slučaju trebaju provesti prije drugih postupaka (8, 9–14).

#### Testovi osjetljivosti

Testovi osjetljivosti se također upotrebljavaju kao osnovni testovi za sve nove materijale. Cilj je uočiti sve imunološke reakcije koje materijal izaziva. Kod ljudi se očituju kao kontaktni dermatitis, a kod pokusnih životinja kao crvenilo i natečenost.

#### Testovi iritacije kože

ISO 10993-10 standardi opisuju testove iritacije kože kod pojedinačnog i kumulativnog izlaganja materijalu. Testovi se provode na albino zečevima čija je koža izrazito osjetljiva i reagira i na najmanje podržaje. Kod pojedinačnog izlaganja, ono traje nekoliko sati, a kod kumulativnog nekoliko dana. Reakcije se očituju kao crvenilo i natečenost, a svrstavaju se po točno određenom sustavu. Reverzibilne promjene omogućuju daljnja testiranja, dok ireverzibilna oštećenja kože odbacuju materijal kao potencijalno medicinsko pomagalo.

#### Test intrakutane reakcije

Osmišljeni su za tekuće materijale koji se apliciraju potkožno. Parametri koji se prate također su crvenilo i otečenost.

#### Testovi genotoksičnosti

Testovi genotoksičnosti služe za predviđanje eventualne karcinogenosti nekog materijala. Njima se otkriva utjecaj na kromosome, odnosno gene. Provode se *in vitro* i *in vivo*. *In vitro* testovi se mogu podijeliti u prokariotske i eukariotske. Obično se u praksi kombinira više testova. ISO ih preporučuje za sve materijale koji su u kontaktu s tijelom više od 30 dana.

## Implantacija

Testovima implantacije nastoji se postići okruženje koje pobliže odgovara onom u kojem će materijal biti smješten. Uglavnom se koriste zečevi kao pokusne životinje, a sredstvo se implantira u mišiće. Može se unijeti izravno ili na silikonskim nosačima. U oba slučaja se promatraju tkivne reakcije koje materijal uzrokuje.

## Istraživanja na ljudima

Istraživanja na ljudima daju statističku procjenu biokompatibilnosti (27–32).

### 1.2.1. Mikronukleus test

Mikronukleus je naziv za malu jezgru koja nastaje kad god kromosom ili fragment kromosoma nije ugrađen u jednu od jezgri kćeri tijekom stanične diobe (mala kromatinska tvorba slična jezgri smještena u citoplazmi). Obično je to znak genotoksičnih događaja i kromosomske nestabilnosti. Mikronukleusi nastaju tijekom anafaze iz zaostalog acentričnog kromosoma ili fragmenata kromatida uzrokovanih neispravno popravljenim ili nepopravljenim lomovima DNK-a ili nedisfunkcijom kromosoma. Mikronukleusi se obično vide u kancerogenim stanicama i mogu ukazivati na događaje oštećenja genoma koji mogu povećati rizik od razvojnih ili degenerativnih bolesti. Za procjenu razine toksičnosti materijala koji oštećuju DNK postoje mnogobrojne sofisticirane tehnike, odnosno testovi *in vitro/ex vivo* i *in vivo*. Najvažniji *in vivo* testovi su tri citogenetska postupka: komet test, test kromosomskih aberacija i različite vrste mikronukleusnog (MN) testa (1, 24, 33). Mikronukleusni testovi pružaju važne informacije o tome koliko su kemikalije i drugi genotoksični učinci sposobni ometati strukturu i funkciju kromosoma. U navedenim testovima organizmi se tretiraju kemikalijom i mjeri se učestalost stanica s mikronukleima. Budući da oralne epitelne stanice često predstavljaju ciljne stanice za rane genotoksične događaje izazvane kancerogenim agensima koji ulaze u tijelo udisanjem i gutanjem, te za one koje se primjenjuju u terapijske svrhe unutar usne šupljine, one su vrlo pogodne za mikronukleusni test jer su lako dostupne za neinvazivnu izvedbu MN testa kojim se mogu mjeriti oštećenja DNK-a kod ljudi (34–36). Ako postoji izrazito povećanje broja stanica s mikronukleusima,

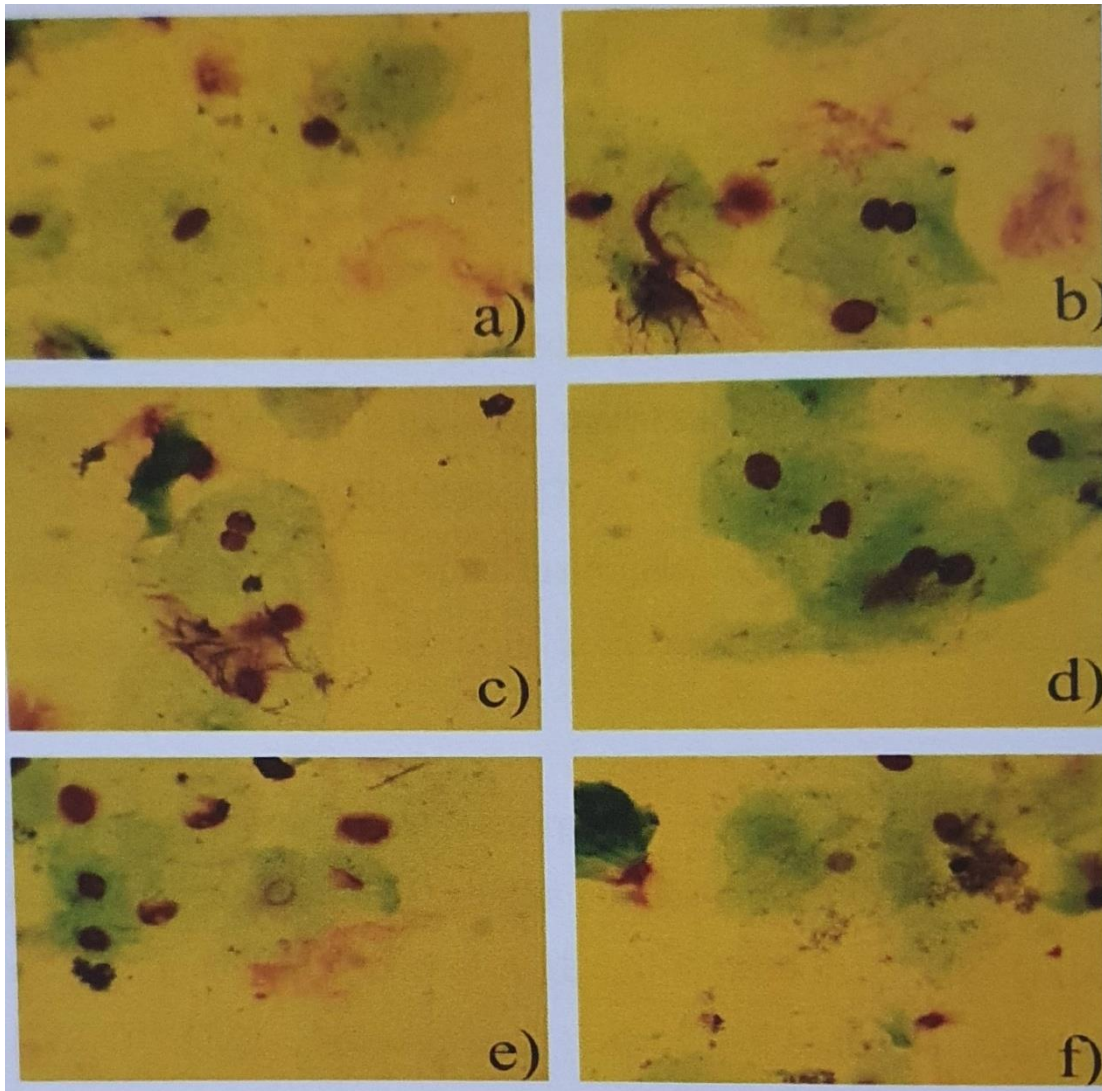
može se zaključiti da kemikalija uzrokuje strukturno i/ili numeričko oštećenje kromosoma. Sustavi mikronukleusne analize vrlo su ekonomični, zahtijevaju puno manje vještine u bodovanju od konvencionalnih metafaznih testova i mnogo su brži od ovih konvencionalnih testova. Budući da testovi mikronukleusa pouzdano i brzo odražavaju kromosomske aberacije, iznimno su korisni za brzu procjenu oštećenja kromosoma.

Cjelokupna je usna šupljina obložena sluznicom koja je histološki građena od epitela, bazalne membrane i vezivnoga tkiva. Epitel je višeslojni pločasti, na površini keratiniziran, a gledajući od usta prema submukozi, sastoji se od četiriju slojeva: *stratum corneum* (rožnati sloj), *stratum granulosum* (zrnati sloj), *stratum spinosum* (trnasti sloj) i *stratum germinativum* (bazalni sloj). Oralni epitel se održava kontinuiranom obnovom stanica pri čemu se nove stanice proizvedene mitozom u bazalnom sloju sele prema površini kako bi zamijenile one odbačene. Bazalni sloj sadrži matične stanice koje se mogu tijekom stanične diobe izraziti genetskim oštećenjem (lom ili gubitak kromosoma), primjerice oštećenjem mikronuklea. Promjene koje nastaju su (Slika 1.): *stanica s mikronukleusom* (mikronukleus mora biti manji od trećine promjera jezgre, ali dovoljno velikog i vidljivog oblika, boja i tekstura mu je poput jezgri, mora biti na istoj žarišnoj ravnini kao jezgra, no ne smije se preklapati s jezgrom); *binuklearna stanica* (morfološka anomalija do koje dolazi zbog oštećenja citoskeleta i posljedično nepravilnog odvijanja citokineze zbog poremećaja mikrotubula diobenog vretena); *stanica s nuklearnim pupoljkom* (jezgreni pupovi su morfološka promjena koja služi kao indikator oštećenja genetskog materijala koji je zbog težih oštećenja izdvojen iz genoma jezgre i putem egzocitoze se izbacuje iz stanice. Vezikula s tako izdvojenim genetskim materijalom prvo se spaja s jezgrenom membranom kako bi se izbacila iz citoplazme i u toj fazi se opaža se kao jezgreni pup); *stanica s kariolizom* (stanica u potpunosti gubi svoj nuklearni materijal, „duh“ stanica) se smatra morfološkom manifestacijom stanične smrti mehanizmom nekroze; *stanica s karioreksom* je morfološka manifestacija apoptoze; *stanica s piknotičnom jezgrom* je morfološka manifestacija kondenzacije kromatina u jezgri stanice u kojoj je u tijeku stanična smrt mehanizmom nekroze ili apoptoze; *stanica s kondenziranim kromatinom* predstavlja stadij apoptoze koji se događa zbog brze proteolize nuklearnih matriksnih proteina; *nukleoplazmatski mostovi* su morfološke promjene povezane s oštećenjima telomera koje dovode do poremećaja u strukturi kromosoma i njihovoj organizaciji tijekom anafaze.

Čiimbenici koji utječu na brojnost mikronuklea u oralnim epitelnim stanicama su: (a) vrijeme prikupljanja, (b) metoda prikupljanja, (c) metoda fiksacije i bojanja, (d) veličina i izbor

uzorka stanica, (e) način bodovanja i (f) druge nuklearne anomalije u normalnim i promijenjenim stanicama. Mikronukleus test koji se provodi na bukalnim stanicama usne šupljine nije invazivan i vrlo se jednostavno izvodi jer su stanice relativno dostupne, a svako novo prikupljanje je lako ponovljivo (33, 37–43). Za odabir stanica koje se ocjenjuju najčešće se primjenjuju kriteriji koje su razvili Tolbert i suradnici (43). Parametri za uključivanje stanica u stanice koje se ocjenjuju, prema navedenim kriterijima, su: (a) intaktna citoplazma i relativno ravan položaj stanice na stakalcu, u ravnini s fokusom; (b) minimalno ili nimalo preklapanje sa susjednim stanicama; (c) preparat smije sadržavati minimalno ili nimalo nečistoća; (d) jezgra normalna i intaktna, glatka i ovalna. Predloženi kriteriji za identifikaciju mikronukleusne tvorbe su: (a) MN tvorba mora biti manja od trećine jezgre, ali dovoljno velika da se razazna oblik i boja; (b) intenzitet bojenja mora biti sličan bojenju jezgre; (c) tekstura mora biti slična jezgri; (d) MN tvorba mora imati istu žarišnu ravninu kao jezgra; (e) MN tvorba se ne smije preklapati s jezgrom. Kako bi se mikronukleusna tvorba potvrdila, mora zadovoljavati sljedeće kriterije: (a) mora biti manja od trećine promjera jezgre, ali dovoljno velika i prepoznatljiva, (b) boja mikronuklea mora intenzitetom odgovarati jezgri, (c) tekstura mikronuklea mora biti slična jezgri, (d) mikronukleusna tvorba mora biti na istoj žarišnoj ravnini kao jezgra; (e) mikronukleusna tvorba ne smije se preklapati s jezgrom. Tolbert i sur. (43) su preporučili bodovanje, odnosno pregledavanje najmanje 1000 stanica. Međutim, ako je nakon prebrojavanja 1000 stanica uočeno manje od 5 mikronuklusa, preporučuju povećanje brojenja na 2000-3000 stanica.





Slika 1. Anomalije jezgre: (a) mikronukleus, (b) binuklearna stanica, (c) most, (d) jezgrin pup, (e) karioliza, (f) karioreksa.

Broj radova koji su se za istraživanje genotoksičnosti brojnih vrsta dentalnih materijala koristili MN-ovim testom sve je veći, a nevedeno je posljedica relativno lake i neinvazivne izvedbe spomenutog testa. U suvremenoj dentalnoj medicini *in vivo* mikronukleus test na epitelnim stanicama usne šupljine se primjenjuje vrlo često u procjeni utjecaja sredstava za ispiranje usne šupljine i različitih pasta za zube (44–46), dentalnih cemenata (47), materijala za pečaćenje fisura (48), rtg zračenja (49–51), ortodontskih naprava (52), kompozitnih ispuna i dentalnih amalgama (53–56) te implantata izrađenih od titana u kombinaciji s različitim protetskim materijalima i dentalnim amalgamima (57).

### **1.3. Kompozitni materijal**

Dentalni kompoziti obično se sastoje od tri glavne komponente koje se kemijski razlikuju jedna od druge: matrica na bazi smole (organska matrica), punilo (anorganska matrica) i sredstvo za umrežavanje (obično silan, za poboljšanje kemijskih veza između punila i organske matrice) (52). Materijali u kompozitu su raspršeni jedni u drugima, ali su jasno mehanički odvojeni. Kombinacijom različitih materijala dobivaju se nova optimalna svojstva koja su bolja od onih pojedinačnog materijala. U sastav kompozita ulaze i inicijatori, inhibitori, stabilizatori boje, pigmenti, aktivatorski sustav i dr. (58–60).

#### **1.3.1. Sastav kompozita**

##### Organska polimerna matrica

Osnova svih kompozita je Bis-GMA. To je diakrilat bisfenol-A-glicidilmetakrilat, a prvi Bis-GMA je dobio Bowen još 1950.godine kad je pomiješao bisfenol A i glicidil metakrilat tinoela s TEGDMA (trietilenoglikol dimetakrilat). Danas se koristi i niz drugih oligomera. Neki od njih su bisfenol-A-etilmetakrilat (Bis-EMA), bisfenol-A-propil-metakrilat (Bis-PMA). S obzirom da je Bis-GMA vrlo viskozna tekućina, dodaju joj se tzv. razrjeđivači odnosno modifikatori viskoznosti kako bi se dobile paste i tekućine u koje se lako umiješaju ostale komponente kompozita. Danas se koriste Bis-DMA (bisfenol dimetakrilat), UDMA (uretan dimetakrilat), MMA (metilmetakrilat), TEGDMA (trietilenglikol dimetakrilat) i EGDMA (etilenglikol dimetakrilat). Pojedinačne molekule su povezane Van Der Waalsovima silama na udaljenosti od 4 angstroma. Monomeri se međusobno spajaju u polimere pod utjecajem slobodnih kisikovih radikala pri čemu se njihova veza smanjuje sa 4 na samo 1.9 angstroma te dolazi do volumnih promjena sveukupne matrice i do 20 %. Da bi se to spriječilo, a i da bi se poboljšala druga svojstva, u matricu se dodaje anorgansko punilo ostavljajući što manje slobodne matrice.

##### Raspršena anorganska faza

Anorgansko punilo se dodaje organskoj matrici radi poboljšanja fiziočkomehaničkih i kemijskih svojstava, a najviše zbog povećanja tvrdoće kompozitnog ispuna. Dentalni kompoziti zahtijevaju uporabu materijala koji imaju sličnu boju i translucenciju kao prirodan

zub. To se postiže odabirom onih koji imaju optički indeks 1,5. U tu svrhu se rabe kristalični kvarc, borosilikatno staklo, alumosilikati barija i stroncija, pirogeni koloidni silicij-dioksid i dr. Punila se razlikuju po materijalu, obliku i veličini. Oblik im je nepravilan ili sferičan. Češće se koriste sferične čestice jer se bolje preraspodjeljuju i uklapaju ostavljajući malo slobodne organske matrice koja je odgovorna za negativne volumne posljedice konačnog ispuna. Kombinacijom različitih veličina postižu se još bolja svojstva.

Prema veličini čestica punila, kompozitni materijali se dijele u sljedeće skupine:

1. Makropunjeni kompozitni materijali (veličina čestica od 0.1 do 100  $\mu\text{m}$ ). Koristili su se sedamdesetih godina prošlog stoljeća. Imali su dobra mehanička svojstva zbog punjenosti smole, no teška obrada i poliranje kompromitirali su trajnost ispuna. Danas uglavnom nisu u uporabi.
2. Mikropunjeni kompozitni materijali (veličina čestica od 0.001 do 0.1  $\mu\text{m}$ ). Osmišljeni su osamdesetih godina prošlog stoljeća, no zbog malog promjera čestica i niskog volumnog udjela punila, mehanička svojstva ovih kompozita nisu optimalna te se mogu rabiti samo u području koje nije podložno jakim žvačnim silama.
3. Hibridni kompozitni materijali (mikrohibridni kompoziti) (veličina čestica od 0,4 do 4  $\mu\text{m}$  i submikronske čestice od 0,04  $\mu\text{m}$ ). Nastali su kao rezultat istraživanja na temelju makropunjenih i mikropunjenih kompozita, osiguravaju dovoljnu čvrstoću i mehanička svojstva, mogućnost poliranja te postizanje željene estetike. Budući da se koriste za restauracije u svim područjima usne šupljine, nazivaju se i univerzalnim kompozitnim materijalima.
4. Kompozitni materijali s nanopunilom sadrže čestice manje od 100 nm. Ova punila se dobivaju pomoću nanotehnologije, jedinstvenom kombinacijom nanočestica i nanoklastera. Veličina nanočestica može biti čak i 5 – 75 nm, a njihovom agregacijom se dobivaju nanoklasteri koji omogućuju visoko punjenje materijala.  
Većina proizvođača izmijenila je sastav svojih mikrohibrida dodavanjem više nanočestica, a ponekad i prepolimeriziranih čestica punila, sličnih onima koje se nalaze u mikropunjenim kompozitima, te su ovu skupinu nazvali nanohibridi. Općenito, zbog sličnih svojstva teško je razlikovati nanohibride i mikrohibride.

Granični spojni međusloj

Organsku matricu i anorgansko punilo potrebno je što čvršće povezati. To se postiže stvaranjem mehaničkih i kemijskih sveza. U oba slučaja potrebno je tretirati površinu čestica

punila. Mehanička sveza se postiže mijenjanjem fizičke strukture jetkanjem površine da bi se stvorila porozna površina u koju prodire monomer. Ipak, postojanija je kemijska sveza koja nastaje primjenom silana koji sprječava hidrolitičku razgradnju i omogućuju raspodjelu naprezanja između smole i punila (najčešće se primjenjuju organosilani, odnosno gama-metaksiloksipropiltrimetoksi silan).

Ostali dodaci:

### Inicijatori

Inicijatori polimerizacije aktiviraju molekule monomera stvaranjem slobodnih radikala. Najčešće su to organski i anorganski peroksidi. Radikali se stvaraju pucanjem veza među centralnim kisikovim atomima kod inicijatora. Pucanje veza može se potaknuti toplinom, svjetlom ili određenim kemikalijama. Stoga je izuzetno važan način skladištenja materijala. On mora biti na hladnom, tamnom i nekontaminiranom mjestu. Da bi se izbjegle neželjene polimerizacije, danas se koriste fotokemijski inicijatori. Prije su se koristili sustavi osjetljivi na ultraljubičaste zrake (300 – 400 nm), a danas se koriste diketoni koji su osjetljivi na vidljivo svjetlo (400 – 700 nm). Prednost je u kontroliranoj polimerizaciji. Različiti kompoziti koriste različite fotokemijske sustave te se aktiviraju različitim valnim duljinama, stoga u nekim slučajevima ista lampa ne može polimerizirati dva različita kompozita. Neki od fotokemijskih sustava su: kamforkinon, acenaftenkinon i benzil.

### Akceleratori

U svrhu ubrzanja razgradnje inicijatora na slobodne radikale, dodaju se akceleratori. Danas se kao akceleratori koriste dimetil p-toluidin i N, N-bis (hidroksi-niži-alkil-3,5-ksilidin). Nedostatak akceleratora je u nezadovoljavanju estetskim biokompatibilnim zahtjevima te je još sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog stoljeća grupa istraživača došla do zaključka da koncentraciju akceleratora treba svesti na minimum.

### Inhibitori

Inhibitori polimerizacije koriste se da bi spriječili spontanu polimerizaciju monomera i omogućili skladištenje i rukovanje. Djeluju tako što sprječavaju stvaranje slobodnih radikala koje je u normalnim uvjetima sporo, ali kontinuirano. U to svrhu koriste se derivati fenola. Nekad se koristio hidrokinon, ali se pokazalo da on uzrokuje diskoloracije ispuna (58–65).

### 1.3.2. Klasifikacija kompozita

Kompoziti se dijele prema veličini čestica punila, prema kliničkoj primjeni, prema boji i transparentnosti te prema broju komponenti (jednokomponentni i dvokomponentni), odnosno prema načinu polimerizacije.

Prema kliničkoj primjeni kompozite dijelimo na: kompozitne materijale za preventivno pečačenje jamica i fisura, viskoviskozne kompozitne materijale za direktne ispune, tekuće kompozitne materijale, debeloslojne (*bulk*) kompozitne materijale, laboratorijske kompozite, kompozitne materijale za izradu bataljaka i kompozite za privremene restauracije i kompomere.

Kompozitni materijali za preventivno pečačenje jamica i fisura po sastavu su tekuće smole s niskim udjelom punila, a koriste se u dječjoj dentalnoj medicini za prevenciju nastanka karijesa na intaktnim jamicama i fisurama trajnih zuba.

Viskoviskozni kompozitni materijali mogu biti mikrohibridni i nanohibridni te se mogu primjenjivati za izradu ispuna i na prednjim i na stražnjim zubima.

Tekući kompozitni materijali su izrazito niskoviskozni materijali jer sadrže mali udio anorganskog punila. Imaju nizak modul elastičnosti i nisu radioopakni. Indicirani su u zonama niskog okluzijskog opterećenja, za kavitete III. i V. razreda, za minimalno invazivne preparacije ili kao podloga ili „liner“ ispod kompozitnih materijala većeg modula elastičnosti (hibridni ili kondenzibilni kompozitni materijali) gdje smanjuju stres izazvan polimerizacijom i okluzijskim opterećenjem. Također, osiguravaju bolje rubno zatvaranje ako se koriste u kombinaciji s kompozitom veće viskoznosti.

*Bulk fill* kompozitni materijali inovativni su kompoziti koji su promijenili osnovni princip izrade kompozitnog ispuna u adhezijskom kavitetu. Cilj je bio napraviti materijal za estetske ispune na stražnjim zubima koji će imati prednosti amalgama i kompozita. Ovi kondenzibilni kompozitni materijali visoko su punjeni poroznim ili nepravilnim česticama punila različite veličine (0,04 – 10  $\mu\text{m}$ ). Manje su ljepijivi i visoko su viskozni pa ostaju na mjestu ne razlijevajući se, bez obzira na vrijeme potrebno za oblikovanje. Na taj način ostvaruju bolji kontakt u odnosu na standardne kompozitne materijale. Nanose se u slojevima debljine 4 – 5 mm, što olakšava rad i smanjuju vrijeme potrebno za izradu ispuna (vrijeme potrebno za

polimerizaciju LED svjetlom iznosi 20 sekundi). Postoje niskoviskozni i viskoviskozni debeloslojni kompozitni materijali. Niskoviskozni se mogu rabiti samo kao podloga ispod viskoviskoznih kompozita, dok se viskoviskozni bulk kompoziti koriste za kavitete I., II. i VI. razreda i osiguravaju bolji interproksimalni kontakt od uobičajenih kompozita. Novije generacije *bulk* materijala spadaju u skupinu nanohibridnih kompozita i njihovo polimerizacijsko skupljanje iznosi 1.9 %. Zahvaljujući inhibitorima polimerizacije koji reduciraju osjetljivost na svjetlo imaju produljeno vrijeme modelacije, a specifični fotoinicijatori omogućuju ubrzavanje procesa polimerizacije i na dubini od 4 mm. Laboratorijski kompozitni materijali koriste se za izradu različitih indirektnih nadomjestaka. Kompozitni materijali za izradu bataljaka i kompoziti za privremene restauracije rabe se u pretprotetičkoj pripremi zuba i kao pomoć u planiranju konačnog protetskog rada. Kompomeri su materijali koji kombiniraju svojstva od kompozitnih materijala i staklenoionomernih cemenata (SIC) (58–64, 66).

### 1.3.3. Polimerizacija kompozita

U suvremenoj dentalnoj medicini uobičajeno se rabe jednokomponentni kompoziti koji se polimeriziraju pod utjecajem svjetla, procesom radikalske polimerizacije tijekom kojega, pod djelovanjem svjetla iz odgovarajućeg uređaja, iz monomera nastaje polimer. Najčešće je fotosenzitivna tvar, odnosno sustav fotoinicijatora u kompozitu, kamforčinon, ubrzan tercijarnim aminom, tipično aromatičnim, a koji ima maksimumu valnu duljinu oko 468 nm. Što se tiče uređaja za svjetlosnu polimerizaciju, danas se standardom smatra Light Emitting Diode (LED) tehnologija.

Postoji više uređaja za svjetlosnu polimerizaciju: halogene žarulje, laser, plazma uređaji, plave diode.

Halogene žarulje

Halogene žarulje konvencionalni su uređaji za svjetlosnu polimerizaciju, a proizvode bijelo svjetlo koje filtracijom iz svjetlovoda izlazi kao plavi snop valnih duljina između 410 i 520 nanometara. Starenjem uređaja i kontaminacijom optičkog sustava dolazi do slabljenja

učinkovitosti i nedovoljne konverzije monomera, što utječe na kvalitetu ispuna. Da bi se osiguralo što potpunije i brže stvrdnjavanje materijala, na tržište su uvedene halogene žarulje visokog intenziteta (1000 do 2000 mW/cm<sup>2</sup>). Jači halogeni polimerizacijski uređaji stvorili su problem postoperativne osjetljivosti koja je posljedica 2-5 % polimerizacijske kontrakcije. Posljednjih nekoliko godina proizvode se halogene žarulje koje emitiraju plavo svjetlo početnog nižeg intenziteta, nakon čega slijedi veći intenzitet, tzv. soft-start uređaji. Svrha je navedenih uređaja da osiguraju bolji rubni integritet ispuna tzv. odgođenom polimerizacijom jer je eksperimentalno dokazano da se postupnim osvjetljenjem materijala može smanjiti naprezanje u hibridnom sloju. Naime, kompozitna smola polimerizira se sporije u početnoj pre-gel fazi stvrdnjavanja, što omogućuje oticanje materijala i minimalizira stres uzrokovan polimerizacijom. Razvila su se tri tipa halogenih uređaja s obzirom na režim polimerizacije:

- dvostupanjska polimerizacija (*step*) - nakon početnog niskog intenziteta (obično 100 – 200 mW/cm<sup>2</sup>).
- eksponencijska polimerizacija (*ramp*) - počinje s niskim intenzitetom i povećava se postupno do konačnog visokog intenziteta.
- pulsno odgođena polimerizacija (*pulse*) - emitira svjetlo u kratkim vremenskim intervalima, preporuča se završna polimerizacija intenziteta 600 – 800 mW/cm<sup>2</sup>.

Nedostatci halogenih uređaja su nepotrebne visoke i niske valne duljine koje zamaraju oko stomatologa, stvaranje visoke temperature te nedostatna polimerizacija u dubijim kavitetima i tamnim područjima.

## Laser

*Argonski laser* svjetlosno je polimerizacijski uređaj visokog intenziteta. Emitira plavo svjetlo vrlo uske valne duljine. Ovi uređaji koriste optičko vlakno za transmisiju svjetla. Nedostatak im je visoki intenzitet koji uzrokuje brzu polimerizaciju uz nastanak pukotine među svezanim površinama.

*Pulsni laser* kao izvor fotopolimerizirajuće monokromatske svjetlosti omogućuje visoki stupanj polimerizacije kompozitnih materijala uz njihovu smanjenu kontrakciju, za razliku od standardnih polimerizacijskih metoda kontinuiranog vala argonskog lasera. Takav učinak temelji se na nanopulsnom režimu rada. Uređaj emitira energiju u kratkim intervalima-

nanopulsevima. Laserska zraka optimalne valne duljine (468 nm) prodire dublje i učinkovitije, omogućavajući saturacijski učinak i jednakomjernu konverziju cijelom dubinom kompozitnog materijala. Vrijeme između nanopulseva osigurava opuštanje molekula i smanjenje stresa zbog polimerizacijskog skupljanja. Ukupan iznos energije koji osvjetljava površinu uzorka samo je jedna petina onog konvencionalnih metoda.

### Plazma uređaji

Plazma uređaji koriste se ksenonskim izvorom svjetla. Ioniziranjem čestica plina (plazma) proizvodi se jako svjetlo koje se filtrira da bi se dobilo plavo svjetlo. Plazma-lučni uređaj predstavljen je 1997. godine. Njegov spektar zračenja je između 420-490 nm s maksimumom na 455 nm. Izrazito visoki intenzitet (oko 1400 mW), trebao je osigurati adekvatnu polimerizaciju u vremenu od 3 sekunde bez kontrakcije ispuna. Neovisna istraživanja ubrzo su pokazala da predloženi polimerizacijski programi nepotpuno stvrđavaju materijal pa je reklamirana smanjena polimerizacijska kontrakcija posljedica nepotpune pretvorbe monomera. Kod duže ekspozicije, ovi uređaji stvaraju visoku temperaturu pa se ponašaju slično kao argonski laseri koji se kao izvor svjetla više ne rabe (67–70).

### Plave diode

Najnovija dostignuća su uređaji temeljeni na plavim diodama (LED-light emitting diode) koje pa svojim svjetlosnim karakteristikama predstavljavaju pravu revoluciju u fotopolimerizaciji materijala. Plave diode emitiraju vidljivo svjetlo uske valne duljine (450–490 nm s maksimumom na 460 nm), intenziteta 100–700 mW/cm<sup>2</sup>. To je idealno za materijale koji imaju kamforkinon kao fotoinicijator. Emitiranjem svjetla uske valne duljine zahtijevaju minimalnu snagu pa se mogu puniti, odnosno raditi uz napajanje energijom. Navedeno omogućava proizvodnju relativno malih bežičnih i prenosivih uređaja. Za oči stomatologa i asistenta važno je i manje bliještanje plavog svjetla bez štetnog djelovanja ljubičastog i ultraljubičastog svjetla. Budući da diodni polimerizatori emitiraju svjetlo uske valne duljine, važno je uočiti da materijali s apsorpcijskim spektrom fotoaktivatora izvan ovih intervala neće biti adekvatno polimerizirani. Nova, treća generacija tih uređaja ima tri programa polimerizacije primjenjiva za određene kliničke indikacije:



- HIP (visoki intenzitet) = 1100 mW/cm<sup>2</sup> (direktna i indirektna restoracija)
- LOP (niski intenzitet) = 650 mW/cm<sup>2</sup> (polimerizacija blizu pulpe)
- SOF (soft — start) = 650 mW/cm<sup>2</sup>-1100 mW/cm<sup>2</sup> (71–74).

#### **1.3.4. Biokompatibilnost kompozitnih materijala**

Za genotoksin se kaže da je kemikalija ili agens koji uzrokuje oštećenje DNK-a ili kromosoma. Mutacije zametne linije uzrokovane su ovom vrstom oštećenja zametne stanice. Somatska mutacija je posljedica oštećenja DNK-a u somatskoj stanici, što može dovesti do maligne transformacije. Nepotpuna reakcija polimerizacije dovodi do oslobađanja zaostalih monomera iz nadomjestaka na bazi smole koji su u interakciji s tkivima usne šupljine. Monomeri poput 2-hidroksietil metakrilata (HEMA) ili trietilen glikol dimetakrilata (TEGDMA) smatraju se citotoksičnima. Izazivaju genotoksične učinke i uzrokuju kašnjenje staničnog ciklusa. Monomeri također utječu na reakciju stanica nespecifične imunosti; inhibiraju funkcije stanica odontoblasta ili odgađaju procese odontogene diferencijacije i mineralizacije u stanicama dobivenim iz pulpe uključujući matične stanice. Navedeni događaji ukazuju na to da smolasti monomeri nepopustljivo mijenjaju regulatorne stanične mreže interferencijom s putevima prijenosa signala (75, 76). Citotoksičnost i genotoksičnost kompozita uglavnom ovisi o kemijskom sastavu organske komponente. Brojna istraživanja navode da se iz kompozita najčešće otpušta HEMA, a potom TEGDMA, UDMA i Bis-GMA (77). Rezultati nekih istraživanja ukazuju da su pojedini kemijski spojevi koje otpuštaju kompoziti jako citotoksični (Bis-GMA, UDMA, TEGDMA), neki su srednje (HEMA), a najmanje su citotoksični produkti njihove biorazgradnje (metakrilne kiseline) (78). Isti autori navode da Bis-GMA, UDMA, TEGDMA i HEMA mogu izazvati dvostruke lomove DNK-a u ljudskim gingivnim fibroblastima te su napravili poredak citotoksičnosti od Bis-GMA-e, monomera koji je najviše citotoksičan, do HEMA-e, koja je najmanje citotoksična (Bis-GMA >UDMA >TEGDMA >HEMA ). Ratanasathien i suradnici (79) navode slične rezultate na fibroblastima miševa. Poznato je kako endokrine aktivne tvari kao što je bisfenol A (BPA) i BPA-derivati mogu izazvati estrogenu aktivnost i time utjecati na zdravlje ljudi. Iako

stomatološki materijali obično ne sadrže čisti BPA, ovaj spoj može biti rezultat procesa proizvodnje ili nusprodukt razgradnje bisfenol A-glicidil metakrilata (bis-GMA) ili drugih komponenti kao što je etoksilirani bisfenol A dimetakrilat (BisEMA) (80-82). U intraoralnom okruženju ovi su materijali izloženi ekstremnim toplinskim promjenama, pH varijacijama, mehaničkoj eroziji i pojavi razgradnje bakterijskih i slinovnih enzima, što može uzrokovati otpuštanje BPA-e. Tijekom ili neposredno nakon postavljanja smole može doći i do njezinog otapanja zbog nepotpune polimerizacije monomera (83). BPA je prepoznat kao endokrini disruptor koji oponaša estrogen i mijenja hormonsku funkciju još 1930-ih. Povećani naglasak na otpuštanju BPA-e može se pripisati činjenici da on igra ulogu u patogenezi nekoliko endokrinih poremećaja, uključujući žensku i mušku neplodnost, tumore ovisne o hormonima kao što su rak dojke i prostate, sindrom policističnih jajnika, preuranjeni pubertet, nekoliko metaboličkih poremećaja uključujući pretilost, i teratogene učinke, čak i pri niskim dozama. Određene *in vivo* studije na životinjskim modelima pokazale su neke od ovih štetnih učinaka i potvrdile toksični učinak monomera kao što su TEGDMA i BisGMA na plodnost i reprodukciju ženki miševa (84,85). BisGMA je pokazao visok embriotoksični/teratogeni učinak, zbog strukture molekule i/ili višeg lipofilnog karaktera, dopuštajući prolazak kroz stanične membrane i stanične organele, pa je čak doveo do prekida jednog lanca DNA-e (86).

Organske komponente prisutne u matrici, prije svega monomeri izvedeni iz Bis-GMA, ali i trietilen glikol dimetakrilat (TEGDMA), uretan dimetakrilat (UDMA) i 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), mogu utjecati na biološku kompatibilnost, iako se obično koriste za poboljšanje klinički relevantnih svojstava (87,88). Potencijalna citotoksičnost organskih komponenti kompozitnog materijala uglavnom je posljedica ostataka slobodnih monomera metakrilata nakon faze polimerizacije, što može potaknuti proizvodnju prostaglandina E2 (PGE2), ekspresiju ciklooksigenaze 2 (COX2) i proupalni aktivaciju kroz povećanje interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 i dušikovog oksida (NO) (89,91). Pored toga, tijekom određenog razdoblja, na biokompatibilnost mogu dodatno utjecati drugi čimbenici kao što su erozija, degradacija i prisutnost bakterija na granici između restauracije i zubnog tkiva (78, 87, 92–96). Osim biološkog učinka monomera, velika je pozornost nedavno usmjerena na citotoksični potencijal nano-punila unutar nanopunjenih/nanohibridnih kompozita (97–100), za koje se čini da ovise o veličina čestica, a također na njih utječu i površina i struktura, kemijski sastav, topljivost, oblik i agregatno stanje. Kao odgovor na potencijalne opasnosti uslijed monomera, citotoksičnih tvari i/ili neaglomeriranih nanočestica, proizvođači su posljednjih godina uložili brojne napore kako bi osigurali alternativna rješenja koja bi mogla

smanjiti citotoksičnost kompozita. Međutim, svaki novi sastav kompozita koji se stavlja na tržište nije uvijek u potpunosti predvidiv i svakako su potrebna dodatna istraživanja tog materijala. Procjena citotoksičnosti i genotoksičnosti su iznimno važni testovi koji se koriste za procjenu biokompatibilnosti svih dentalnih, a tako i kompozitnih materijala (78, 87, 92–96, 101, 102).

HEMA ima nisku molekulske težinu, a zbog svoje hidrofilnosti lako može proći kroz dentin i pokazati toksičan učinak na odontoblaste. Difuzija HEMA-e *in vitro*, kroz jetkane dentinske diskove, zavisi o debljini dentinskog sloja, efikasnosti polimerizacije, koncentraciji i vremenu ekspozicije (103). Općenito, toksičnost HEMA-e zavisi o koncentraciji i vremenu djelovanja. *In vitro*, u koncentraciji 0.75 mmol/L inhibira proliferaciju makrofaga, povećava aktivnost mitohondrija, dok u koncentraciji od 10 mmol/L suprimira aktivnost mitohondrija. Prema nekim istraživanjima (104) oslobađanje HEMA-e iz polimeriziranih adheziva varira od 1,5 mmol/l do 8 mmol/l. HEMA je odgovorna za citotoksičnost koja se povezuje s oksidativnim stresom, pojačanom proizvodnjom ROS (reaktivnih kisikovih spojeva) i oksidacijom unutarstaničnog glutationa (105). U stanicama humanih fibroblasta gingive HEMA izaziva nekrozu (104). Obzirom na genotoksičnost, HEMA može imati klastogeni učinak (izaziva kromosomski lom) i povećati broj mikronuklea (106). Ako su fibroblasti duže izloženi HEMI može doći do prekida stvaranja normalnog kolagena te poremećaja u diferencijaciji fibroblasta pulpe u odontoblaste (105). Oslobođena HEMA se može razgraditi do metakrilne kiseline (MAA), a oba spoja imaju citotoksični i genotoksični učinak na humane gingivne fibroblaste te mogu izazvati DNK oštećenje koje se prepoznaje kao fragmentacija DNK u alkalnom komet testu. Postoje mišljenja da su HEMA i TEGDMA toksične jer su slobodni radikali te mogu aktivirati limfocite putem indukcije alergijskih procesa što može prouzročiti genotoksičnost. Naime, drži se da bi genotoksičnost bila posljedica oslobađanja reaktivnih vrsta kisika koji oštećuju molekule DNA. Pojedina istraživanja su dokazala da HEMA može izazvati dvostruke lomove koji, se ne poprave, mogu dovesti do preraspodjele kromosoma i delecije, a time i fuzije gena. Pored toga, dvostruki lomovi mogu inaktivirati tumor-supresorskih gene i aktivirati protoonkogene (107). Kompoziti kojima UDMA čini bazu organske matrice apsorbiraju značajno više vode nego drugi (npr. na bazi Bis-GMA), što može rezultirati hidrolitičkim oštećenjem i razgradnjom polimerne baze (108). Time se polimeri mehanički oslabljuju, a iz njih se u okolna tkiva, odnosno, u usnu šupljinu i oslobađaju slobodni zaostatni monomeri. Pojedina istraživanja su dokazala da se UDMA može inkorporirati u lipidne slojeve membrane i time izazvati oštećenje i smrt stanica (109). UDMA može mijenjati ciklus u stanicama oralnog karcinoma i

fibroblastima kože u ljudi, dok rezultati nekih drugih istraživanja (110) ukazuju na njezin suprimirajući utjecaj na funkciju stanica pulpe u štakora. Brojna istraživanja (56, 108, 111, 112) dokazuju kako UDMA izaziva apoptozu, odnosno staničnu smrt. Schweikl i sur. (113) dokazuju sposobnost UDMA-e da stvara mikronukleus, dok neki drugi autori (94, 114), pomoću komet testa, ukazuju da UDMA izaziva oštećenje DNK-a na humanim limfocitima i stanicama žlijezda slinovnica. Citotoksično i genotoksično djelovanje monomera UDMA-e i TEGDMA-e dokazano je i na stanicama ovarija kineskog hrčka (104). Genotoksičnost TEGDMA i UDMA povezana je s nastankom lezija DNA povezanih s homolognom rekombinacijom i mutacijom gena i kromosoma (60). Metabolički proizvodi TEGDMA-e, npr. epoksi spoja 2,3-epoksimetakrilne kiseline (2,3-EMA) uzrokuju slične citotoksične učinke (115). Kada su stanične kulture izložene niskim koncentracijama TEGDMA-e prevladava apoptoza, a ako su kulture izložene visokim koncentracijama ovog monomera, prevladava nekroza (115, 116). Pojedini autori (115) su pokazali da je apoptoza stanica žlijezda slinovnica povezana s oksidacijskim stresom uslijed oslobađanja reaktivnih kisikovih spojeva. Djelovanjem TEGDMA-e na humane fibroblaste gingive izazvala se inhibicija rasta stanice (117). Neka *ex vivo* istraživanja su dokazala da TEGDMA izaziva oštećenja DNK-a i nastanak mikronukleusa (106, 118), a pomoću komet testa dokazano je da izaziva oštećenje DNK-a u stanicama žlijezda slinovnica i limfocitima (94, 114). Dugotrajna izloženost niskim koncentracijama TEGDMA ometa diferencijaciju fibroblasta pulpe u odontoblaste, a time i mineralizaciju dentina (119). Kao što je rečeno, metakrilatni monomeri kao što je Bis-GMA i TEGDMA najčešće se koriste u proizvodnji kompozitnih materijala budući da omogućuju potrebne kliničke karakteristike kompozitnog materijala kao što su viskoznost, čvrstoća na savijanje, regulacija topivosti, odnosno, apsorpcije vode, volumetrijsko skupljanje (88).. Međutim, širok raspon štetnih učinaka povezan je s njihovom upotrebom. Nekoliko je *in vitro* istraživanja pokazalo da Bis-GMA može stimulirati proizvodnju PGE<sub>2</sub>, ekspresiju COX2 i proupalnu aktivaciju IL-1 $\beta$ , IL-6 i NO (89–91). Bis-GMA inducira pad reduciranog glutationa u fibroblastima gingive i nastanak apoptoze (120). Bis-GMA može ometati diferencijaciju fibroblasta pulpe (119, 121), mijenjati kretanje humanih fibroblasta gingive (122). Kao posljedica toga, pokušaj prelaska na kompozitne materijale bez Bis-GMA postao je od posebnog interesa za proizvođače kako bi smanjili citotoksični potencijal svojih proizvoda. Istraživanja su pokazala kako i drugi sastojci kompozita, pored monomera, mogu utjecati na njegovu biokompatibilnost, iako rezultati ukazuju kako kompoziti s manjim udjelom organske matrice pokazuju manji stupanj citotoksičnosti (123, 124). Istraživanja toksičnog učinka kamforkinona na humanim fibroblastima pulpe i gingive te stanicama

submandibularnog kanala ukazuju na njegovu citotoksičnost, no u usporedbi sa monomerima (Bis-GMA, UDMA, TEGDMA i HEMA), pokazuje slabiji stupanj toksičnosti (105). Uspoređujući rezultate citotoksičnog, odnosno, genotoksičnog učinka tekućih i standardnih kompozita uočavaju se rezultati koji ukazuju da je viši stupanj toksičnosti uočen kod tekućih oblika kompozita (1, 111), dok se prema nekim studijama zaključuje kako su, od istog proizvođača i istog naziva, kruti oblici toksičniji od tekućih (125). Vrsta polimerizacije, vrijeme i intenzitet osvjetljavanja te udaljenost materijala od izvora svjetlosti također utječu na citotoksičnost. Brojna istraživanja pokazuju kako je citotoksični stupanj kompozita polimeriziranih LED lampom bio veći u odnosu na one koji su polimerizirani halogenim lampama, dok su kompoziti polimerizirani plazma uređajima pokazali najviši stupanj toksičnosti (126, 127). Stupanj toksičnosti kompozita viši je u onih koji su polimerizirani lampama višeg intenziteta (128) i kod kompozita koji su kraće polimerizirani (15 i 20 sekundi) u odnosu na one polimerizirane 30 i 60 sekundi (1, 128).

Razmak između vrha polimerizacijske lampe i kompozitne površine također utječe na stupanj toksičnosti polimeriziranog kompozitnog materijala. Razmak mora biti što manji jer povećanje udaljenosti smanjenje stupnja konverzije monomera u polimer što rezultira i višim stupnjem toksičnosti kompozitnog materijala (127).

#### **1.4. Dentalni amalgam**

Kad se raspravlja o toksičnosti dentalnih amalgama, uglavnom se misli na živu (Hg). Njezini dominantni oblici uključuju elementarnu živu (Hg<sup>0</sup>); ionski oblik žive koji se naziva i anorganski [Hg (II) ili Hg<sup>2+</sup>] i organski oblik žive s metil-živom (MeHg) (129). Živa u organizmu može potjecati iz hrane, zraka, industrije, dentalne medicine, nekih lijekova i drugih proizvoda. Dentalni amalgam sadržava elementarnu živu koja je lipofina, no čim uđe u organizam, zbog djelovanja enzima vodikperoksidne katalaze prelazi u anorganski oblik koji nije lipofian i teže se resorbira u stanice (129, 130). Ako uđe u organizam, živa ima afinitet prema sulfidrilnim skupinama te oštećuje DNK (131), osobito kod osoba s pojedinim genetskim varijantama (132). Genotoksičnost žive i njezinih derivata uglavnom je posljedica njihova svojstva da stvaraju ROS vrste koje nastaju kada živa uđe u stanicu kroz plazmatsku

membranu ili putem proteinskih transportera (133, 134). U nekim radovima autori navode da je tripeptid glutation snižen u populaciji izloženoj živi (55, 134). Moguća toksičnost dentalnoga amalgama bila je razlog za stalne sumnje u njegovu opasnost kad je riječ o zdravlju nositelja amalgamskih ispuna, što je potaknulo mnogobrojna istraživanja u uvjetima *in vitro* i *in vivo* (135, 136) te objavu mnogih članaka u znanstvenim i popularnim časopisima (137, 138). Iako Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) i FDI, kao međunarodna dentalna organizacija, imaju plan za smanjenja i postupno povlačenje dentalnoga amalgama iz uporabe, (139) njegova primjena još uvijek nije potpuno zabranjena (140).

Prije pojave kompozitnih materijala u stomatologiji, odnosno, dentalnoj medicini, dentalni amalgam (DA) je bio najčešće korišten materijal za ispune na stražnjim zubima (59, 141). Prednosti DA jesu iznimna otpornost na djelovanje žvačnih sila, jednostavnost primjene u kliničkim uvjetima i pristupačnost cijene. Nedostatci DA su opsežnost brušenja zdravog tkiva, nedovoljna estetika i eventualna toksičnost zbog velikog udjela žive u sastavu DA. Upravo ta moguća toksičnost bila je temeljnim razlogom stalnih sumnji u opasnost DA po zdravlje nositelja amalgamskih ispuna, što je potaknulo brojna istraživanja u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (141, 144–146).

Dentalni amalgam je slitina žive s jednom ili više kovina i dosad najčešće korišten materijal za izradu ispuna na stražnjim zubima. Čini se da su zubni amalgam prvi upotrijebili Kinezi. Su Kung (659. po Kr.) spomenuo je upotrebu mješavine u „Materia Medica“. U Europi, Johannes Stokers, općinski liječnik u Ulmu, Njemačka, preporučio je amalgam kao materijal za punjenje 1528. godine. U Francuskoj je Taveau 1826. godine opisao materijal za ispune od "srebrne paste". Proizveo je amalgam miješanjem srebrnih novčića sa živom, a nastali spoj naziva »srebrna pasta«, ali je njezina kakvoća bila neprihvatljiva za ispune. Od uvođenja dentalnog amalgama u širu uporabu amalgam je stalno izazivao otpor u stomatološkim krugovima, upravo zbog velike količine žive koja čini njegov sastav. To je, kao što je poznato, rezultiralo time da je Američko dentalno udruženje (ADA) 1845. godine čak i zabranilo uporabu dentalnog amalgama, što je značilo gubitak licence i isključenje iz ADA-e svakog stomatologa koji bi primijenio amalgam za izradu zubnog ispuna. Ipak, pored tzv. "rata protiv amalgama", tadašnji nositelji struke su ga nastojali usavršiti. Naime, G.V. Black je uočio da je vrlo važno standardizirati sastav dentalnog amalgama (strogo točan omjer praha i žive) i način rukovanja njime. Budući da se do tada, zbog ručnog i proizvoljnog miješanja praha i žive, omjer sastojaka i način rukovanja amalgamom nisu kontrolirali, to je takav amalgam zaista bio opasan po zdravlje pacijenata i stomatološkog osoblja. Ta standardizacija

koju je uveo Black je povratila ugled i povjerenje u dentalni amalgam, tako da je sama ADA 1929. g. donijela svoju poznatu Specifikaciju br.1., prema kojoj se dentalni amalgam smatra prikladnim materijalom za stomatološke potrebe, pod uvjetom da svaki amalgam koji dolazi na tržište mora imati strogo kontrolirani standardizirani omjer svojih sastojaka i njime se mora rukovati isključivo prema strogo određenim pravilima. Usprkos tom općeprihvaćenom pozitivnom stavu o dentalnom amalgamu, literatura opisuje i tzv. “drugi amalgamski rat” i “treći amalgamski rat. No, svi napadi na dentalni amalgam imali su i svoje prednosti jer su stalno podsticali na usavršavanje njegove kakvoće. Jedan od velikih pomaka zbio se 1963. Godine kada su Innes i Youdelis koncipirali novu generaciju dentalnih amalgama, tzv. Non-gama<sub>2</sub> dentalne amalgame, koji u sebi ne sadrže tzv. gama<sub>2</sub> fazu (Sn<sub>8</sub>Hg). Naime, uočeno je da je gama<sub>2</sub> faza spoj koji je bio najviše podložan koroziji i odgovoran za manjak čvrstoće amalgama. Pri oštećenju amalgamskog ispuna gama<sub>2</sub> faza je bila najviše podložna elektrolitičkoj disocijaciji, pri čemu se kositar (Sn) spajao s oksidima i hidroksikloridima, pri čemu bi nastali korozijski produkti, a živa bi se oslobodila u usnu šupljinu. Znajući za taj nedostatak tadašnjih amalgama Innes i Youdelis su, uvođenjem veće količine bakra u obliku tzv. alfa faze (AgCu) postigli potpuno uklanjanje gama<sub>2</sub> faze u stvrdnutom amalgamu, čime se uklonila mogućnost oslobađanja žive. Nadalje, također veliki pomak bio je konstruiranje kapsuliranih dentalnih amalgama čime se onemogućila svaka improvizacija pri miješanju jer su sastojci strogo dozirani i njihov omjer kontroliran te se automatski miješaju. Iako je težnja potpuno ukloniti dentalni amalgam iz uporabe, kao isve druge proizvode koji sadrže živu, ipak se, u brojnim zemljama svijeta, još uvijek koristi kao dentalni materijal. Općenito se može reći da se preporuča što manje koristiti dentalni amalgam, te se preporuča ne stavljati trudnicama, djeci i osobama s oštećenjima bubrega. Dakle, kao i primjena svih drugih teških metala, tako se i primjena dentalnog amalgama želi svesti na najmanju moguću razinu, no, isključivo u svrhu daljnje zaštite pacijenata, odnosno, općenito spriječavanja daljnjeg ugrožavanja ljudi i okoliša, a ne na temelju rezultata dosadašnjih istraživanja. U tu svrhu svaka stomatološka ordinacija bi morala imati amalgamski separator koji automatski odvaja sve čestice dentalnog amalgama iz odvodnog sustava i tako spriječava nekontrolirano odlaganje amalgamskog otpada u okoliš (59, 139–141).

### 1.4.1. Sastav dentalnog amalgama

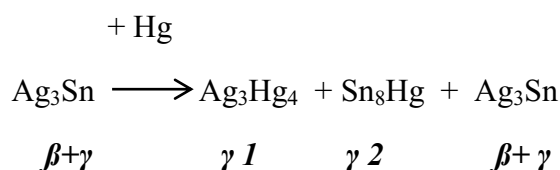
Dentalni amalgam je mješavina metala koja se sastoji od tekuće (elementarne) žive i praha sastavljenog od srebra, kositra i bakra. Otprilike polovica (41 – 51 %) zubnog amalgama je elementarna živa po težini. Kemijska svojstva elementarne žive dopuštaju joj da reagira i veže čestice legure srebra/bakra/kositra u amalgam. Udio srebra je 40 – 70 %, bakra 12 – 30 %, dok kositar čini 12–30 % legure. Prema broju kemijskih elemenata koje sadrže dentalni amalgami mogu biti binarni, ternarni i kvarterni.

#### Podjela dentalnih amalgama prema količinskom udjelu bakra

Amalgami se mogu grubo podijeliti u dvije skupine prema sadržaju bakra: konvencionalni s niskim udjelom Cu (tradicionalni) i amalgami s visokim udjelom Cu. Najvažnija prednost amalgama s visokim udjelom bakra je uklanjanje gama<sub>2</sub> faze (faza Sn<sub>8</sub>Hg), čija disocijacija u usnoj šupljini je bila glavni razlog korozije i trošenja amalgamskog ispuna te oslobađanja žive iz njega. Amalgami s visokim udjelom bakra, općenito imaju bolje karakteristike za kliničku primjenu, ali svi amalgami donekle korodiraju u ustima. Neka se korozija smatra pozitivnim čimbenikom jer taloženje proizvoda korozije smanjuje propusnost na rubovima zubnih ispuna, odnosno nastaje pečaćenje rubnih pukotina amalgama korozijskim produktima. Najvažnija prednost amalgama s visokim udjelom bakra uklanjanje gama<sub>2</sub> faze (faza Sn<sub>8</sub>Hg), čija disocijacija u usnoj šupljini je bila glavni razlog korozije i trošenja amalgamskog ispuna te oslobađanja žive iz njega. Tijekom miješanja kapsule u trituratoru, u kapsuli se odvija proces amalgamacije miješanjem žive i praha dentalnog amalgama.

#### Konvencionalni dentalni amalgami

Sadrže do 3 % bakra, a prema nekima i do 6 %. Proces amalgamacije konvencionalnih dentalnih amalgama odvija se prema slijedećoj formuli:





Amalgamacija se odvija miješanjem praha Ag i Sn, odnosno spoja  $Ag_3Sn$  (gama, odnosno gama + beta faza) i žive, pri čemu nastaje faza  $Ag_3Hg_4$  (gama<sub>1</sub> faza) i  $Sn_8Hg$  (gama<sub>2</sub> faza), koja je bila razlogom loše kakvoće amalgamskih ispuna i oslobađanja žive iz njega. Proces amalgamacije je trajao dok se nije potrošila sva živa, no za svaki slučaj, uvijek je u suvišk uostalo  $Ag_3Sn$  faze, kako bi, ako dođe do oslobađanja žive, odmah ušla s njom u proces amalgamacije i spriječila oslobodađanje u usnu šupljinu.

#### Dentalni amalgami s visokim udjelom bakra

Prema udjelu bakra dijele se na miješane, koji imaju 9 %, odnosno 12 % Cu i kod kojih se gama 2 faza stvara privremeno, no u konačno stvrdnutom dentalnom amalgamu je više nema i na one s vrlo visokim udjelom Cu (oko 30 %), kod kojih se gama<sub>2</sub> uopće ne stvara. Temeljno svojstvo tih amalgama je gotovo potpuno uklanjanje gama<sub>2</sub> faze. Naime, dijelimo ih, ovisno o udjelu bakra, na miješane amalgamske slitine i dentalne amalgame s vrlo visokim udjelom bakra. Miješane amalgamske slitine sadrže oko 9 % bakra. Reakcija stvrdnjivanja također se odvijau dvije faze prema formuli:

Reakcija amalgamacije miješanih dentalnih amalgama (udio Cu oko 12 %):



**$\gamma_1$  $\gamma_1$   $\gamma_2$  $\alpha_1$  $\gamma$**

Reakcija amalgamacije dentalnih amalgama s vrlo visokim udjelom Cu (oko 30 %):



**$\gamma_1$  $\gamma_1$  $\gamma$   $\alpha_1$**

#### Podjela dentalnih amalgama prema obliku čestica

Prema obliku čestica amalgamskog praha dentalne amalgami se dijele na: krhotinaste (strugotine), kuglaste (sferične), miješane (blend) i ovalne (sferoidne) (59, 141).

### 1.4.2. Svojstva dentalnog amalgama

Amalgam je smjesa srebra, kositra, bakra dva i drugih metala sa živom koja je prethodno pročišćena destilacijom kako bi se uklonile nečistoće. Sastav praha legure kontroliran je ISO standardom za slitinu dentalnog amalgama (ISO 1559) za kontrolu svojstava amalgama (1).

Najvažnija fizikalna svojstva amalgama su tečenje i puzanje, promjena dimenzija i otpornost na tlak.

#### 1. Tečenje i puzanje (*creep*).

Tečenje i puzanje karakteristike su koje se odnose na deformaciju amalgama pod pritiskom, u određenom vremenu. Što je niža vrijednost puzanja amalgama, bolji je rubni integritet ispuna. Legure s visokim sadržajem bakra obično imaju niže vrijednosti puzanja od konvencionalne legure srebra i kositra. Dozvoljeno tečenje je 3 %.

#### 2. Promjena dimenzija.

Amalgam se može proširiti ili skupiti ovisno o upotrebi. Promjena dimenzija može se svesti na minimum pravilnom upotrebom legure i žive. Promjena dimenzija unutar 24 sata smije biti -10 i +20  $\mu\text{m}/\text{cm}$ .

#### 3. Tlačna otpornost

Dovoljna čvrstoća za otpornost na lom važan je zahtjev za svaki restaurativni materijal. Čvrstoća amalgama prvenstveno je određena sastavom legure, količinom zaostale žive nakon kondenzacije i stupnjem poroznosti u amalgamskoj restauraciji. Zahtijeva se da otpornost na tlak nakon 1 sat iznosi 80 MPa (59, 141).

### 1.4.3. Toksičnost dentalnog amalgama

Kad govorimo o toksičnosti dentalnih amalgama, uglavnom mislimo na citotoksičnost žive, koju je još 300. god. pr. Krista opisao Teofrast. Živa (Hg) je vrlo opasan onečišćivač

okoliša, a mnoga su istraživanja procijenila aktivnost Hg spojeva u različitim testnim sustavima sa širokim spektrom biomarkera. Ipak, ono što je zapanjujuće je njezin mogući genotoksični učinak u ljudskoj populaciji, čak i pri niskim koncentracijama. Ljudska bića mogu biti profesionalno ili u okolišu izložena Hg ili njezinim anorganskim i organskim derivatima. Neki od njih, osim što su postojani, spadaju u najotrovnije do sada poznate tvari. Dominantni toksični oblici Hg uključuju: elementarnu Hg ( $\text{Hg}^0$ ); ionski Hg koji se naziva i anorganski (i)Hg (II) ili  $\text{Hg}^{2+}$ ; i organska (o)Hg, kao što je metil živa (MeHg), klasificirana kao najotrovnija među njima (134). Do danas je poznata većina akutnih i kroničnih otrovanja živom (59, 130, 134, 141, 147–155). Živa koja je u organizmu može potjecati iz hrane, zraka, industrije, zubarstva i nekih lijekova. Zubni ispuni osiguravaju značajnu iatrogeno izloženost ksenobiotičkim spojevima. Eksperimentalni podaci pokazuju da amalgami, koji sadrže Hg, uzrokuju pogoršanje pro-antioksidativne stanične redoks ravnoteže. Glavni mehanizam koji leži u osnovi genotoksičnosti pripisuje se sposobnosti amalgama da potaknu stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), sposobnih uzrokovati oštećenje DNA (133, 134). Genotoksično oštećenje stanica oralne sluznice ispitanika sa zubnim nadomjescima na bazi Hg (amalgamima) procijenjeno je mikronuklus testom, testom nuklearnih abnormalnosti (NA) i drugim testovima kao markerima stanične smrti. Rezultati su pokazali da amalgami mogu izazvati genetsko oštećenje povećanjem učestalosti MN. Relevantnost ovog istraživanja leži u činjenici da su ispitanici s restorativnim materijalima na bazi Hg kontinuirano i dugo izloženi ovom metalu. Dentalni amalgam ima dugu povijest naizgled sigurne uporabe, međutim, neke studije sugeriraju da može uzrokovati oštećenje DNK-a, osobito kod osoba s uobičajenim genetskim varijantama (134). Ova i druge studije pokazuju da se osjetljivost na toksičnost Hg razlikuje među pojedincima na temelju više gena, tako da razine izloženosti parama Hg iz zubnih amalgama mogu biti opasne za određene subpopulacije. Iz tog razloga se ulažu naponi da se smanji ili eliminira uporaba zubnog amalgama na bazi Hg. Najveći doprinos genotoksičnosti Hg i njezinih derivata je njihova sposobnost stvaranja ROS vrsta, popraćen smanjenjem zaštitnih rezervi glutaciona. Genotoksični kapaciteti različitih vrsta kvalitativno su usporedivi, što može sugerirati različitu bioraspoloživost i sudjelovanje zajedničkog genotoksičnog entiteta. ROS nastaju kada Hg uđe u stanicu izravno kroz plazma membranu ili putem proteinskih transportera (132–134). Oštećenje može biti izravno, oksidacijom dušikovih baza, ili neizravno, interakcijom s drugim biološki važnim molekulama, kao što su masne kiseline, DNA polimeraze i mikrotubuli. Zabilježeno je da su razine glutaciona, važnog u zaštiti od slobodnih radikala i sredstva za keliranje metala, smanjene u populaciji izloženoj Hg (55, 134). Genotoksične promjene, kao što je nalaz MN, otkrivene su u populaciji

kronično izloženoj razinama Hg ispod sigurnosnih vrijednosti koje je definirao SZO, koristeći se uglavnom kulturama periferne krvi i, u nekim slučajevima, epitelnim stanicama oralne sluznice. Pored toga, nalazi nekoliko istraživanja usmjerenih na biomonitoring citogenetskih učinaka kod ljudi izloženih Hg i njegovim spojevima iz slučajnih, profesionalnih ili prehrambenih izvora bili su negativni, kontroverzni, dvojbeni ili nesigurni u pogledu stvarne uloge Hg u nekim pozitivnim rezultatima (55, 131–135). Pronađena odstupanja mogu biti posljedica različite jačine derivata iHg i oHg, kao i različitih protokola koji se primjenjuju u smislu vremena izloženosti, bioloških testova i biomarkera, zbog njihove različite osjetljivosti. Bilo bi primjereno standardizirati testove genotoksičnosti, kako bi se dobili pouzdaniji rezultati (134). Pojedini autori (146) svojim radovima upozoravaju da Cu, Zn i Hg pokazuju visoku citotoksičnost, Ag srednju, a Sn i prah dentalnog amalgama nisu citotoksični. U znanstvenim i popularnim časopisima brojni su članci o štetnom djelovanju amalgamskih ispuna na cijeli organizam (130–136). Povećana genotoksičnost primijećena je kod ljudi koji su bili izloženi živi putem prehrane, radnog okruženja ili kroz zubne restauracije. Kao i drugi metali, Hg oštećuje DNK kroz više mehanizama, posebno koristeći vezanje na sulfhidrilne skupine. Postavljene su različite hipoteze o mogućim molekularnim mehanizmima genotoksičnosti Hg, uključujući četiri glavna procesa koji dovode do genotoksičnosti: stvaranje slobodnih radikala i oksidativnog stresa, djelovanje na mikrotubule, utjecaj na mehanizme popravka DNA-e i izravnu interakciju s molekulama DNA-e. Budući da je u suvremenoj konzervativnoj stomatologiji prisutna stalna dvojba o prednostima i nedostacima kompozitnih i amalgamskih materijala za ispune stražnjih zubi, Američko dentalno udruženje dalo je određene stavove o uporabi amalgama i kompozita. Ukoliko ne postoji klinička osjetljivost bolesnika na amalgam, utoliko se ne preporučuje zamjena ispuna. Jednako tako FDA, kao krovna svjetska stomatološka organizacija, nikome ne preporučuje uklanjanje ili zamjenu postojećih amalgamskih ispuna u dobrom stanju, osim ako zdravstveni djelatnik to smatra medicinski nužnim (na primjer, dokumentirana preosjetljivost na amalgamski materijal). Uklanjanje intaktnih amalgamskih ispuna rezultira nepotrebnim gubitkom zdrave strukture zuba i privremenim povećanjem izloženosti zbog dodatnih živinih para koje se oslobađaju tijekom procesa uklanjanja. Podaci koje je FDA pregledala u posljednja dva desetljeća ukazuju na nesigurnosti u vezi s učincima izloženosti živi iz zubnog amalgama, upitnim razinama izloženosti živinim parama, mogućnosti nakupljanja žive u tijelu i nedovoljno potvrđenom spoznajom nastaju li nepovoljni zdravstveni ishodi po nositelja amalgamskih ispuna uslijed oslobađanja žive iz tih ispuna. Većina dokaza pokazuje da izloženost živi iz zubnog amalgama ne dovodi do negativnih zdravstvenih učinaka u općoj

populaciji. Izloženost živi može predstavljati veći zdravstveni rizik za određene skupine ljudi, koji mogu biti osjetljiviji na potencijalne štetne učinke općenito povezane sa živom. Ove visokorizične skupine populacije uključuju:

- trudnice i plod u razvoju;
- žene koje planiraju trudnoću;
- dojilje i njihovu novorođenčad i dojenčad;
- djecu, posebno onu mlađu od šest godina;
- osobe s već postojećom neurološkom bolešću;
- osobe s oštećenom funkcijom bubrega;
- osobe s poznatom povećanom osjetljivošću (alergijom) na živu ili druge komponente (srebro, bakar, kositar) zubnog amalgama.

Ako bilo koja osoba pripada u neku od navedenih skupina većeg rizika, FDA preporučuje i zahtijeva primjenu drugih dentalnih materijala (neamalgamskih) kao što su kompozitne smole i staklenoionomerni cementi ako doktor dentalne medicine zaključi da su navedeni materijali prikladni za strukturu i položaj zuba koji je potrebno sanirati i ako osoba nikada nije imala alergijske reakcije, odnosno preosjetljivost na te materijale (134, 140, 141).

## **2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

### **Ciljevi istraživanja:**

Svrha ovog istraživanja je utvrditi koliko su suvremeni kompozitni materijali i dentalni amalgami biokompatibilni i sigurni za kliničku uporabu. U uvjetima *in vivo*, na stanicama bukalne sluznice mladih pacijenata, gledali smo citotoksični i genotoksični potencijal kompozitnog materijala i dentalnog amalgama, ovisno o broju ploha kompozitnih i amalgamskih ispuna te njihove starosti u usnoj šupljini.

### **Radne hipoteze:**

- kompozitni ispuni neće pokazati citotoksičan potencijal dok je moguće očekivati ograničenu genotoksičnost,
- amalgamski ispuni će pokazati citotoksični i genotoksični učinak
- veći genotoksičan učinak na stanice bukalne sluznice biti će dokazan kod pacijenata koji imaju više kompozitnih i amalgamskih ispuna u usnoj šupljini.

### **3. MATERIJALI I POSTUPCI / ISPITANICI I POSTUPCI**



### **3.1. Materijali**

Kompozitni materijali koji su se koristili u ovom radu:

- Filtek Z 550

Dentalni amalgam koji su se koristili u ovom radu:

- Amalgam ANA 2000

U izradi ispuna uz kompozitni materijal Filtek Z 550, korišten je i odgovarajući adhezivni sustav istog proizvođača (Adper Single Bond, Scotchbond). Za jetkanje tvrdih zubnih tkiva koristila se 37% ortofosforna kiselina (Total Etch, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein).

### **3.2. Ispitanici**

Istraživanje se provelo na 150 dobrovoljnih ispitanika starosne dobi između 10 i 20 g., koji su pacijenti Stomatološke ordinacije mr. sc. Milene Trutine Gavran, dr. med. dent., Doma zdravlja Vrgorac te Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Nakon pacijentovog ili roditeljevog/skrbnikovog pristanka, na svakom pacijentu se, u svrhu procjene biokompatibilnosti suvremenih restaurativnih materijala, uzimao bris bukalne sluznice. Ispitanike za uzimanje brisa bukalne sluznice podijelilo se prema broju ploha ispuna i prema starosti ispuna.

Skupinu 1. činilo je 50 ispitanika u dobi između 10 - 20 g., koji imaju amalgamske ispune i koji su stari od 6 do 12 mjeseci te se svakom pacijentu izbrojao broj amalgamskih ploha.

Skupinu 2. činilo je 50 ispitanika u dobi između 10 - 20 g., koji imaju samo kompozitne ispune čija je starost između 6 i 12 mjeseci te se svakom pacijentu izbrojao broj kompozitnih ploha.

Skupinu 3. činilo je 50 ispitanika u dobi između 10 – 20 g., koji imaju zdrave zube te nemaju niti jedan zubni ispun.

### 3.3. Uzorkovanje stanica

Svakog se pacijenta zamolilo da 1 sat prije uzorkovanja ne pije alkohol, ne puši i ne jede. Prije samog uzimanja brisa, ispitanici su tri puta isprali usta vodom, zatim se sterilnom gazom uklonio površinski, odumrli sloj stanica te se, nježno, sterilnom citološkom četkicom (Cytobrush Plus, GmbH, Dietramszell-Linden, Njemačka), uzimao bris bukalnih stanica. Stanična suspenzija pažljivo se nanijela na predmetno stakalce, potom se fiksirala metanolom (80% v/v) temperature 4 °C tijekom 20 minuta i osušila na zraku. Nakon toga stanice su bojane otopinom Giemsa-e (Sigma) u trajanju od 10 minuta, isprane destiliranom vodom i osušena na zraku te analizirana svjetlosnim mikroskopom. Kako bi se procijenio citotoksični i genotoksični učinak materijala koristio se prošireni mikronukleus test (cytomeassay). Pratila se promjena broja MN i morfološke promjene jezgre među pojedinim uzorcima. U svrhu utvrđivanja učestalosti pojave MN za svako uzorkovanje analiziralo se 1000 stanica.

### 3.4. Mikronukleus test

Stanična suspenzija nanesa je na predmetno stakalce, a potom fiksirana metanolom (80 % v/v) na 4 °C kroz vrijeme od 5 minuta 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. Za svakog ispitanika analizirano je 1000 epitelnih stanica za svako vrijeme uzorkovanja. Učestalost pojavljivanja pojedinih parametara mikronukleus testa (broj mikronuklea, pupova, morfoloških promjena tipa *broken egg*,

binuklearnih stanica, nukleoplazmatskih mostova, piknoza, karioliza, karioreksija i morfoloških promjena tipa kondenzirani kromatin) procijenjena je i sistematizirana prema Tolbert i sur. (42).

### 3.5. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati obrađeni su Shapiro-Wilkovim i Kolmogorov-Smirnovljevim testom za procjenu normalnosti distribucije podataka, dok se statistička analiza dobivenih podataka provela Kruskal-Wallis neparametrijskom analizom pomoću Kruskal-Wallisove jednosmjerne analize varijance (ANOVA) uz Bonferroni prilagodbu za višestruke usporedbe. Za ovisnost parametara mikronukleus testa provela se multivarijatna regresijska analiza. Statistička analiza provela se u softverskom paketu SPSS 25.0 (IBM, Armonk, NY, SAD) uz razinu značajnosti od 0,05.

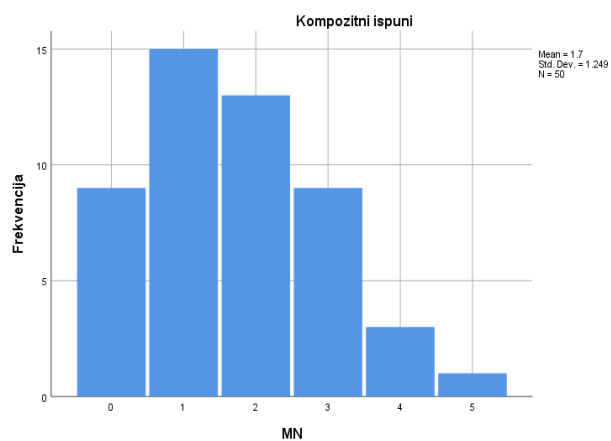
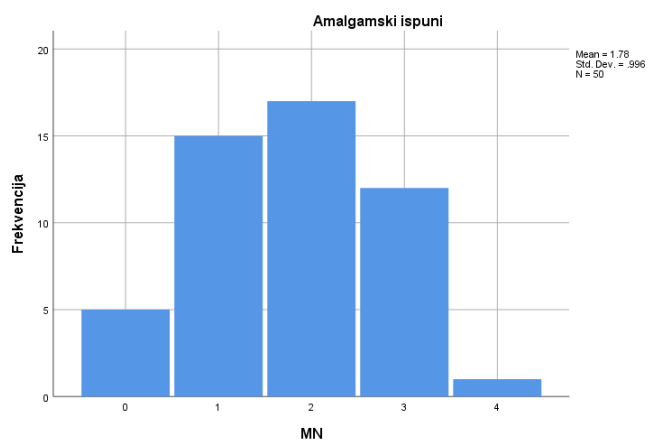
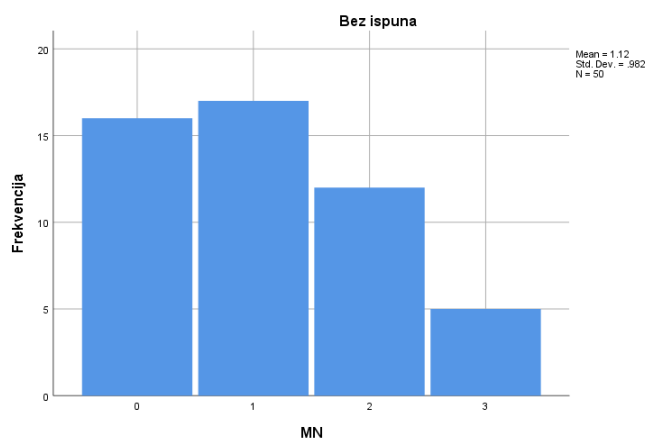
Multivarijatna regresijska analiza provedena je za ovisnost parametara mikronukleus testa (broja mikronuklea, pupova, morfoloških promjena tipa *broken egg*, binuklearnih stanica, nukleoplazmatskih mostova, piknoza, karioliza, karioreksija i morfoloških promjena tipa kondenzirani kromatin) o prediktorskim varijablama: dijagnostičko zračenje (rtg), lijekovi, konzumacija suhomesnate hrane, konzumacija kuhane hrane, konzumacija pečene hrane, učestalost konzumacije mesa, učestalost konzumacije pečenog mesa, učestalost konzumacije suhomesnate hrane, konzumacija povrća, učestalost konzumacije povrća, učestalost konzumacije voća, učestalost konzumacije kave, učestalost konzumacije čaja i učestalost konzumacije gaziranih pića. Za svaku prediktorsku varijablu izračunati su standardizirani koeficijenti ( $\beta$ ) i pripadajuće p-vrijednosti. Utjecaje prediktorskih varijabli smatrao se statistički značajnim za regresijski model u koliko je p-vrijednost bila niža od 0,05. Relativni utjecaji prediktorskih varijabli na parametre mikronukleus testa u regresijskim modelima prikazan je pomoću Pareto dijagrama za t-vrijednosti.



Parametri mikronukleus testa (broj mikronuklea, pupova, morfoloških promjena tipa *broken egg*, binuklearnih stanica, nukleoplazmatskih mostova, piknoza, karioliza, karioreksija i morfoloških promjena tipa kondenzirani kromatin) prikazani su pomoću deskriptivne statistike (srednja vrijednost, 95 % interval pouzdanosti, medijan, standardna devijacija, minimum, maksimum, raspon, interkvartilni raspon). Distribucije parametara mikronukleus testa predstavljene su pomoću histograma na kojima je na x-osi prikazan raspon vrijednosti određenog parametra, a na y-osi učestalost pojavljivanja vrijednosti tog parametra u pojedinoj skupini ispitanika. Normalnost distribucije formalno je ispitana pomoću Shapiro-Wilkovih i Kolmogorov-Smirnovih testova. S obzirom na to da su histogrami i formalni testovi normalnosti pokazali statistički značajna odstupanja od normalne distribucije, testiranje hipoteza za parametre mikronukleus testa (broj mikronuklea, pupova, morfoloških promjena tipa *broken egg*, binuklearnih stanica, nukleoplazmatskih mostova, piknoza, karioliza, karioreksija i morfoloških promjena tipa kondenzirani kromatin) provedeno je neparametrijskom analizom pomoću Kruskal-Wallisove jednosmjerne analize varijance (ANOVA) uz Bonferroni prilagodbu za višestruke usporedbe. U skladu s odstupanjima od normalne distribucije, rezultati su prikazani pomoću okvirnih dijagrama (*boxplots*) kojima se bolje ističu značajke nenormalnih distribucija u usporedbi s prikazom srednjih vrijednosti i standardnih devijacija. Multivarijatna regresijska analiza provedena je za ovisnost parametara mikronukleus testa (broj mikronuklea, pupova, morfoloških promjena tipa *broken egg*, binuklearnih stanica, nukleoplazmatskih mostova, piknoza, karioliza, karioreksija i morfoloških promjena tipa kondenzirani kromatin) kao nezavisnih varijabli i broja amalgamskih, odnosno kompozitnih ploha kao prediktorskih varijabli. Statistička analiza provedena je u softverskom paketu SPSS 25.0 (IBM, Armonk, NY, SAD) uz razinu značajnosti od 0,05.

Tablica 1. Deskriptivna statistika za broj amalgamskih ploha, broj kompozitnih ploha i broj mikronuklea prema skupinama ispitanika „bez ispuna“, „amalgamski ispuni“ i „kompozitni ispuni“.

Varijabla		Skupina			
		Bez ispuna	Amalgamski ispuni	Kompozitni ispuni	
Broj amalgamskih ploha	Srednja vrijednost	0,00	2,64	0,00	
	95 % Interval pouzdanosti	Donja granica	0,00	2,37	0,00
		Gornja granica	0,00	2,91	0,00
	Medijan	0,00	2,50	0,00	
	Standardna devijacija	0,000	0,964	0,000	
	Minimum	0	1	0	
	Maksimum	0	5	0	
	Raspon	0	4	0	
	Interkvartilni raspon	0	1	0	
Broj kompozitnih ploha	Srednja vrijednost	0,00	3,70	4,14	
	95 % Interval pouzdanosti	Donja granica	0,00	3,08	3,28
		Gornja granica	0,00	4,32	5,00
	Medijan	0,00	4,00	4,00	
	Standardna devijacija	0,000	2,188	3,037	
	Minimum	0	0	1	
	Maksimum	0	8	12	
	Raspon	0	8	11	
	Interkvartilni raspon	0	3	5	
MN	Srednja vrijednost	1,12	1,78	1,70	
	95 % Interval pouzdanosti	Donja granica	0,84	1,50	1,34
		Gornja granica	1,40	2,06	2,06
	Medijan	1,00	2,00	2,00	
	Standardna devijacija	0,982	0,996	1,249	
	Minimum	0	0	0	
	Maksimum	3	4	5	
	Raspon	3	4	5	
	Interkvartilni raspon	2	2	2	

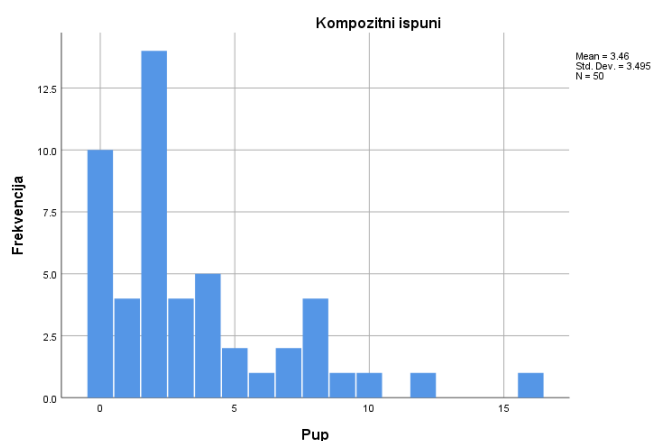
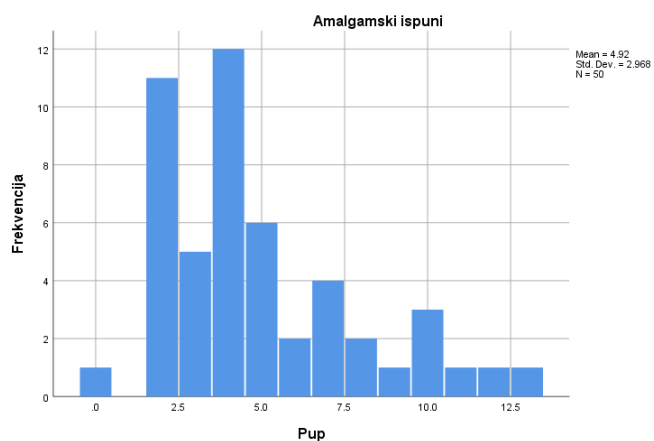
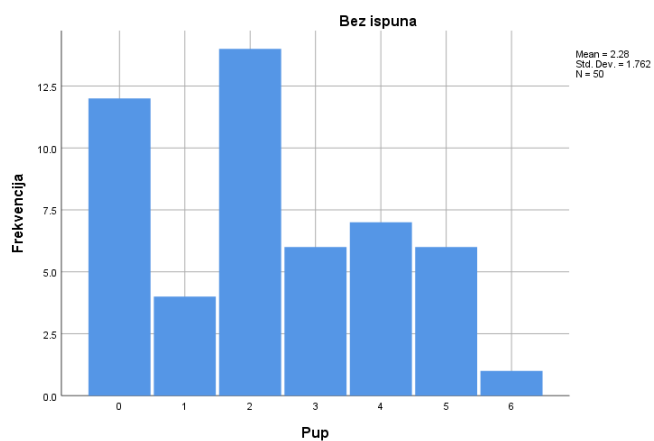


Slika 2. Histogrami za broj mikronuklea u skupinama ispitanika „bez ispuna“, „amalgamski ispuni“ i „kompozitni ispuni“.

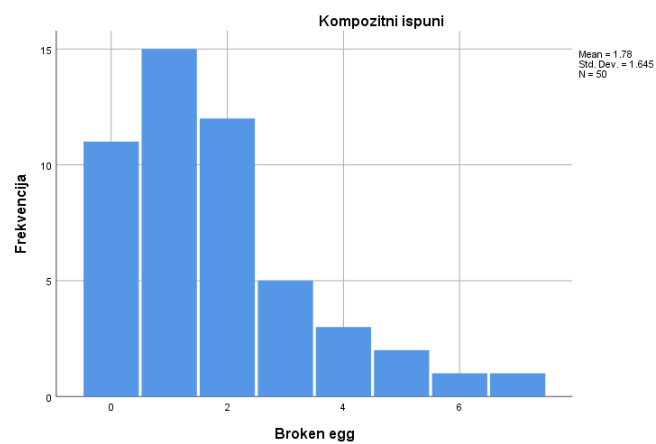
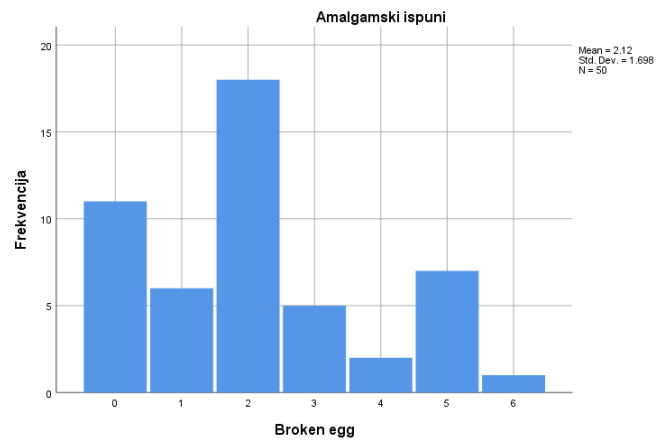
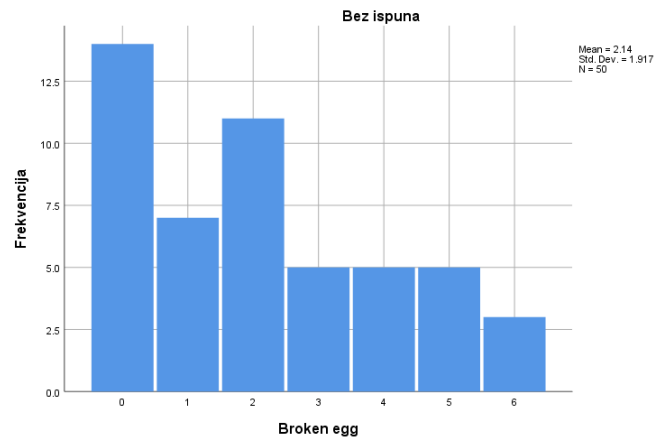
Tablica 2. Deskriptivna statistika za broj pupova, morfoloških promjena tipa *broken egg* i binuklearnih stanica prema skupinama ispitanika „bez ispuna“, „amalgamski ispuni“ i „kompozitni ispuni“.

Varijabla	Skupina				
		Bez ispuna	Amalgamski ispuni	Kompozitni ispuni	
Pup	Srednja vrijednost	2,28	4,92	3,46	
	95 % Interval pouzdanosti	Donja granica	1,78	4,08	2,47
		Gornja granica	2,78	5,76	4,45
	Medijan	2,00	4,00	2,00	
	Standardna devijacija	1,762	2,968	3,495	
	Minimum	0	0	0	
	Maksimum	6	13	16	
	Raspon	6	13	16	
	Interkvartilni raspon	3	4	4	
Broken egg	Srednja vrijednost	2,14	2,12	1,78	
	95 % Interval pouzdanosti	Donja granica	1,60	1,64	1,31
		Gornja granica	2,68	2,60	2,25
	Medijan	2,00	2,00	1,00	
	Standardna devijacija	1,917	1,698	1,645	
	Minimum	0	0	0	
	Maksimum	6	6	7	
	Raspon	6	6	7	
Interkvartilni raspon	4	2	1		
Binuklearni	Srednja vrijednost	4,02	6,72	2,80	
	95% Interval pouzdanosti	Donja granica	3,42	6,03	1,78
		Gornja granica	4,62	7,41	3,82
	Medijan	4,00	6,50	1,00	
	Standardna devijacija	2,124	2,416	3,586	
	Minimum	0	2	0	
	Maksimum	10	12	15	
	Raspon	10	10	15	
Interkvartilni raspon	3	3	4		

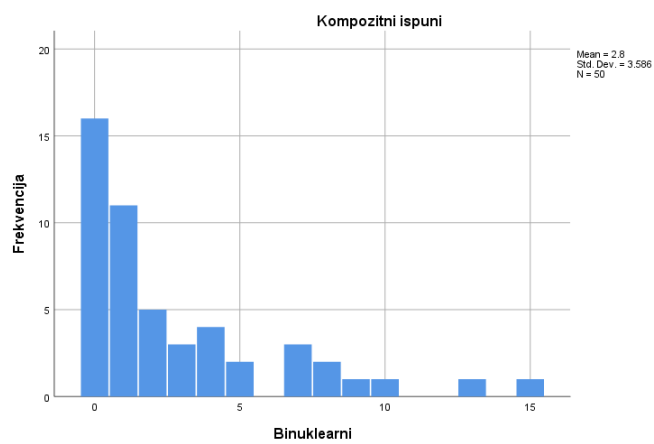
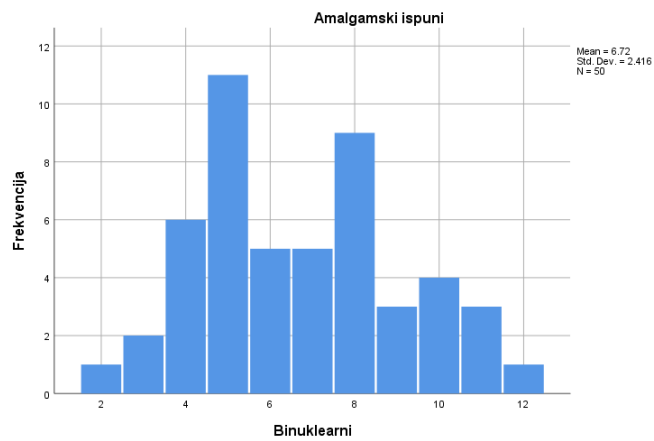
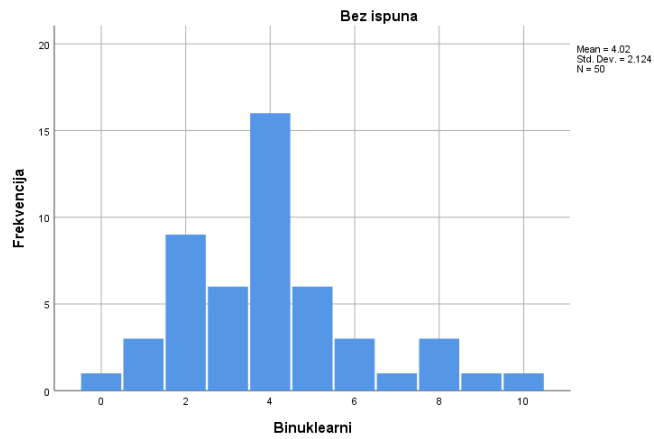




Slika 3. Histogrami za broj pupova u skupinama ispitanika „bez ispuna“, „amalgamski ispuni“ i „kompozitni ispuni“.



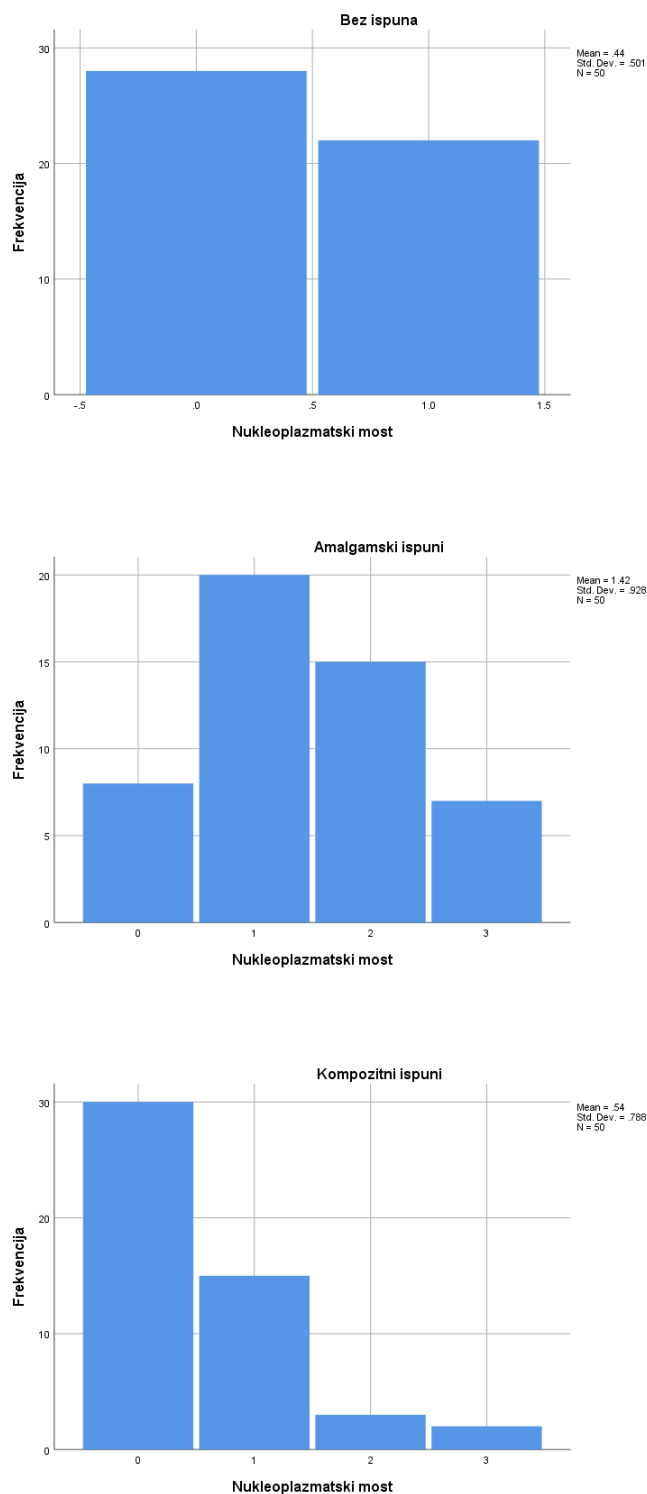
Slika 4. Histogrami za broj morfoloških promjena tipa *broken egg* u skupinama ispitanika „bez ispuna“, „amalgamski ispuni“ i „kompozitni ispuni“.



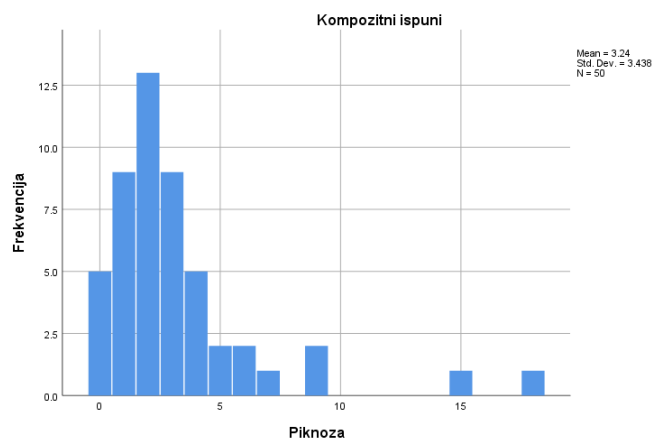
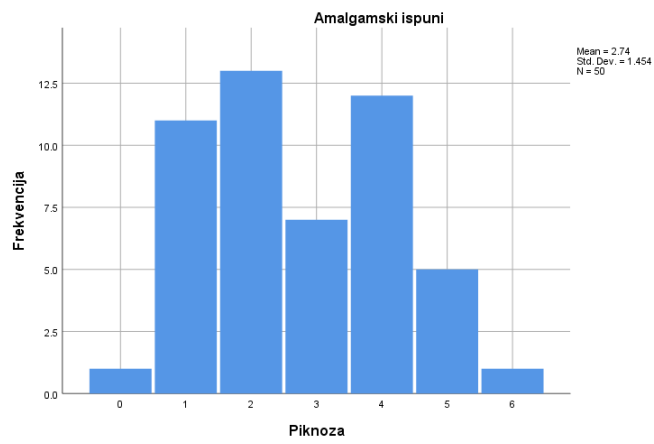
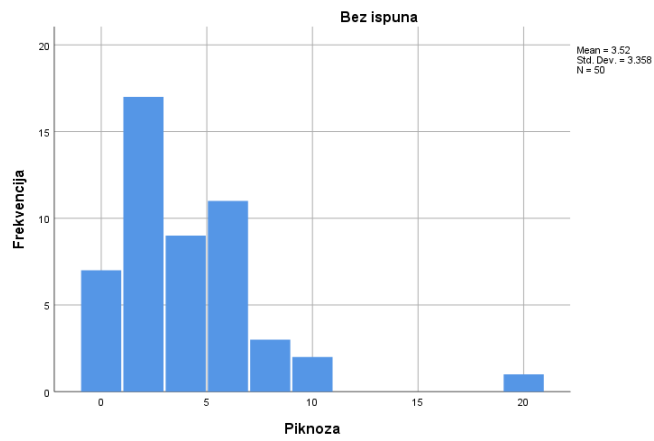
Slika 5. Histogrami za broj binuklearnih stanica u skupinama ispitanika „bez ispuna“, „amalgamski ispuni“ i „kompozitni ispuni“.

Tablica 3. Deskriptivna statistika za broj nukleoplazmatskih mostova, piknoze i kariolize prema skupinama ispitanika „bez ispuna“, „amalgamski ispuni“ i „kompozitni ispuni“.

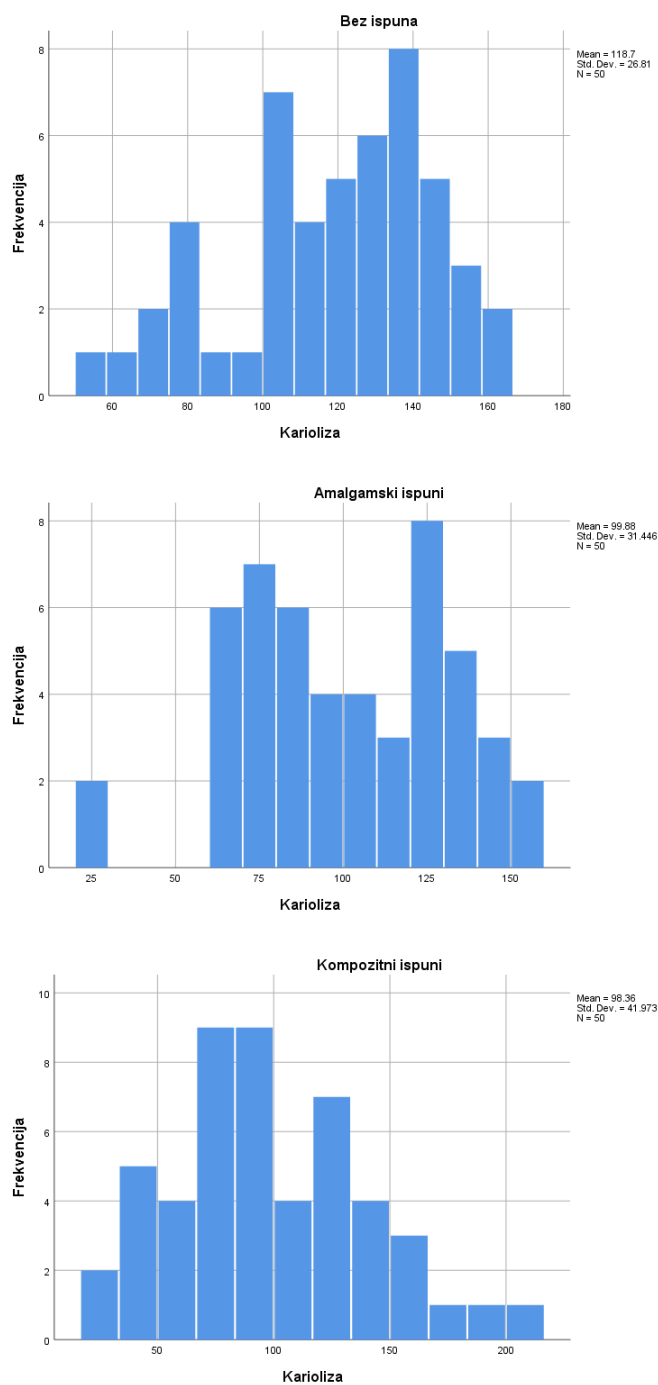
Varijabla	Skupina				
		Bez ispuna	Amalgamski ispuni	Kompozitni ispuni	
Nukleoplazmatski most	Srednja vrijednost	0,44	1,42	0,54	
	95 % Interval pouzdanosti	Donja granica	0,30	1,16	0,32
		Gornja granica	0,58	1,68	0,76
	Medijan	0,00	1,00	0,00	
	Standardna devijacija	0,501	0,928	0,788	
	Minimum	0	0	0	
	Maksimum	1	3	3	
	Raspon	1	3	3	
	Interkvartilni raspon	1	1	1	
Piknoza	Srednja vrijednost	3,52	2,74	3,24	
	95 % Interval pouzdanosti	Donja granica	2,57	2,33	2,26
		Gornja granica	4,47	3,15	4,22
	Medijan	3,00	2,50	2,00	
	Standardna devijacija	3,358	1,454	3,438	
	Minimum	0	0	0	
	Maksimum	19	6	18	
	Raspon	19	6	18	
	Interkvartilni raspon	4	2	3	
Karioliza	Srednja vrijednost	118,70	99,88	98,36	
	95 % Interval pouzdanosti	Donja granica	111,08	90,94	86,43
		Gornja granica	126,32	108,82	110,29
	Medijan	122,00	97,50	89,50	
	Standardna devijacija	26,810	31,446	41,973	
	Minimum	58	23	20	
	Maksimum	160	151	201	
	Raspon	102	128	181	
	Interkvartilni raspon	37	54	54	



Slika 6. Histogrami za broj nukleoplazmatskih mostova u skupinama ispitanika „bez ispuna“, „amalgamski ispuni“ i „kompozitni ispuni“.



Slika 7. Histogrami za broj piknoza u skupinama ispitanika „bez ispuna“, „amalgamski ispuni“ i „kompozitni ispuni“.

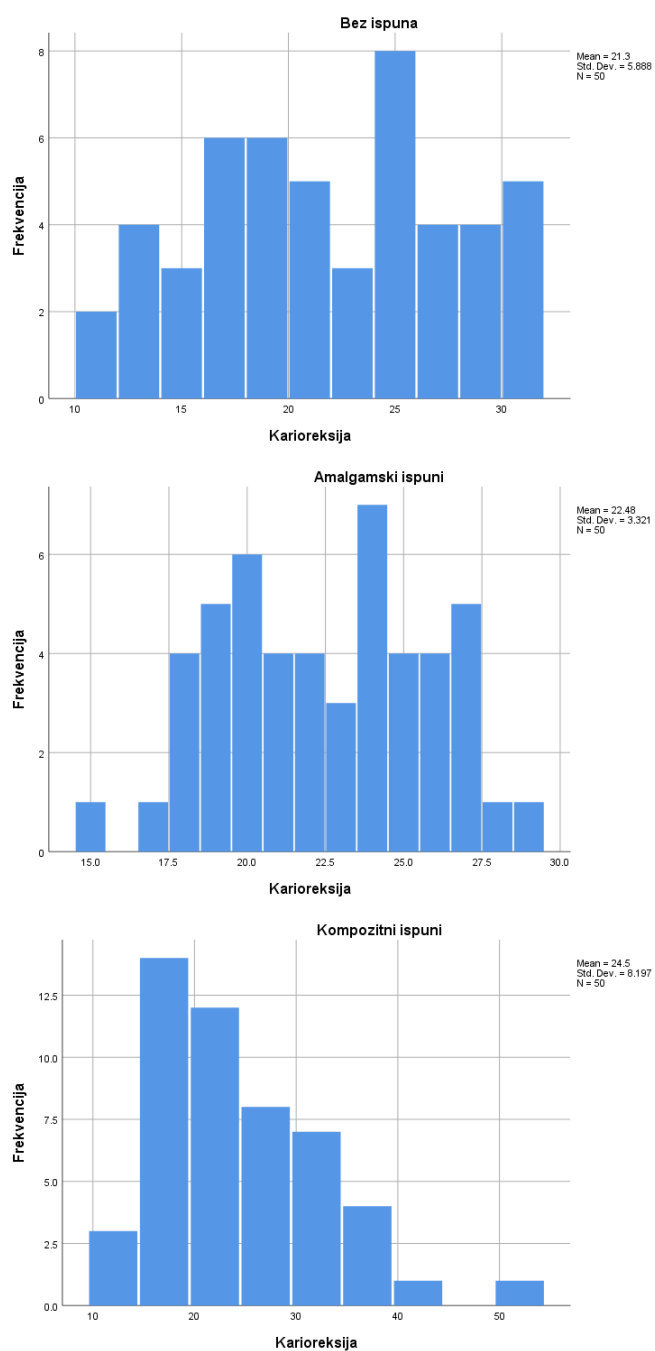


Slika 8. Histogrami za broj karioliza u skupinama ispitanika „bez ispuna“, „amalgamski ispuni“ i „kompozitni ispuni“.

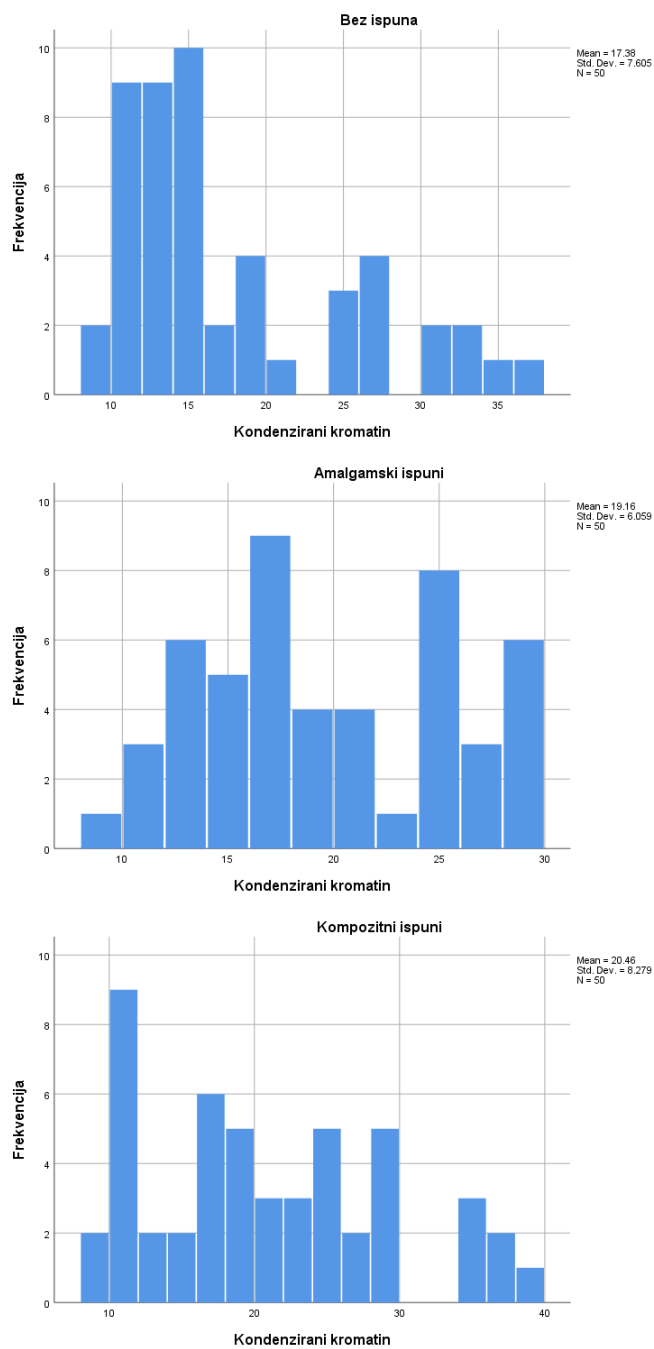
Tablica 4. Deskriptivna statistika za broj karioreksija i morfoloških promjena tipa kondenzirani kromatin prema skupinama ispitanika „bez ispuna“, „amalgamski ispuni“ i „kompozitni ispuni“.

Varijabla	Skupina				
		Bez ispuna	Amalgamski ispuni	Kompozitni ispuni	
Karioreksija	Srednja vrijednost	21,30	22,48	24,50	
	95 % Interval pouzdanosti	Donja granica	19,63	21,54	22,17
		Gornja granica	22,97	23,42	26,83
	Medijan	21,00	22,50	23,50	
	Standardna devijacija	5,888	3,321	8,197	
	Minimum	11	15	12	
	Maksimum	31	29	52	
	Raspon	20	14	40	
	Interkvartilni raspon	10	5	13	
Kondenzirani kromatin	Srednja vrijednost	17,38	19,16	20,46	
	95 % Interval pouzdanosti	Donja granica	15,22	17,44	18,11
		Gornja granica	19,54	20,88	22,81
	Medijan	14,00	18,50	19,00	
	Standardna devijacija	7,605	6,059	8,279	
	Minimum	9	9	9	
	Maksimum	36	29	38	
	Raspon	27	20	29	
	Interkvartilni raspon	12	11	14	





Slika 9. Histogrami za broj karioreksija u skupinama ispitanika „bez ispuna“, „amalgamski ispuni“ i „kompozitni ispuni“.



Slika 10. Histogrami za broj morfoloških promjena tipa kondenzirani kromatin u skupinama ispitanika „bez ispuna“, „amalgamski ispuni“ i „kompozitni ispuni“.

Tablica 5. Rezultati testova normalnosti za parametre mikronukleus testa. Vrijednosti manje od 0,05 označavaju statistički značajna odstupanja od normalne distribucije.

	Skupina	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
		Test statistika	Stupnjevi slobode	p-vrijednost	Test statistika	Stupnjevi slobode	p-vrijednost
Broj amalgamskih ploha	Bez ispuna	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Amalgamski ispuni	0,247	50	<0,001	0,886	50	<0,001
	Kompozitni ispuni	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Broj kompozitnih ploha	Bez ispuna	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Amalgamski ispuni	0,115	50	0,099	0,961	50	0,095
	Kompozitni ispuni	0,198	50	<0,001	0,873	50	<0,001
MN	Bez ispuna	0,209	50	<0,001	0,857	50	<0,001
	Amalgamski ispuni	0,187	50	<0,001	0,902	50	0,001
	Kompozitni ispuni	0,192	50	<0,001	0,917	50	0,002
Pup	Bez ispuna	0,163	50	0,002	0,911	50	0,001
	Amalgamski ispuni	0,202	50	<0,001	0,897	50	<0,001
	Kompozitni ispuni	0,222	50	<0,001	0,840	50	<0,001
Broken egg	Bez ispuna	0,169	50	0,001	0,890	50	<0,001
	Amalgamski ispuni	0,228	50	<0,001	0,888	50	<0,001
	Kompozitni ispuni	0,207	50	<0,001	0,865	50	<0,001
Binuklearni	Bez ispuna	0,204	50	<0,001	0,930	50	0,006
	Amalgamski ispuni	0,162	50	0,002	0,959	50	0,080
	Kompozitni ispuni	0,232	50	<0,001	0,777	50	<0,001
Nukleoplazmatski most	Bez ispuna	0,370	50	<0,001	0,632	50	<0,001
	Amalgamski ispuni	0,235	50	<0,001	0,878	50	<0,001
	Kompozitni ispuni	0,353	50	<0,001	0,693	50	<0,001
Piknoza	Bez ispuna	0,155	50	0,004	0,813	50	<0,001
	Amalgamski ispuni	0,195	50	<0,001	0,924	50	0,003
	Kompozitni ispuni	0,248	50	<0,001	0,715	50	<0,001
Karioliza	Bez ispuna	0,093	50	0,200	0,955	50	0,053
	Amalgamski ispuni	0,099	50	0,200	0,958	50	0,071
	Kompozitni ispuni	0,107	50	0,200	0,977	50	0,442
Karioreksija	Bez ispuna	0,097	50	0,200	0,959	50	0,083
	Amalgamski ispuni	0,116	50	0,088	0,970	50	0,224
	Kompozitni ispuni	0,145	50	0,010	0,926	50	0,004
Kondenzirani kromatin	Bez ispuna	0,223	50	<0,001	0,855	50	<0,001
	Amalgamski ispuni	0,128	50	0,040	0,941	50	0,014
	Kompozitni ispuni	0,107	50	0,200	0,941	50	0,014

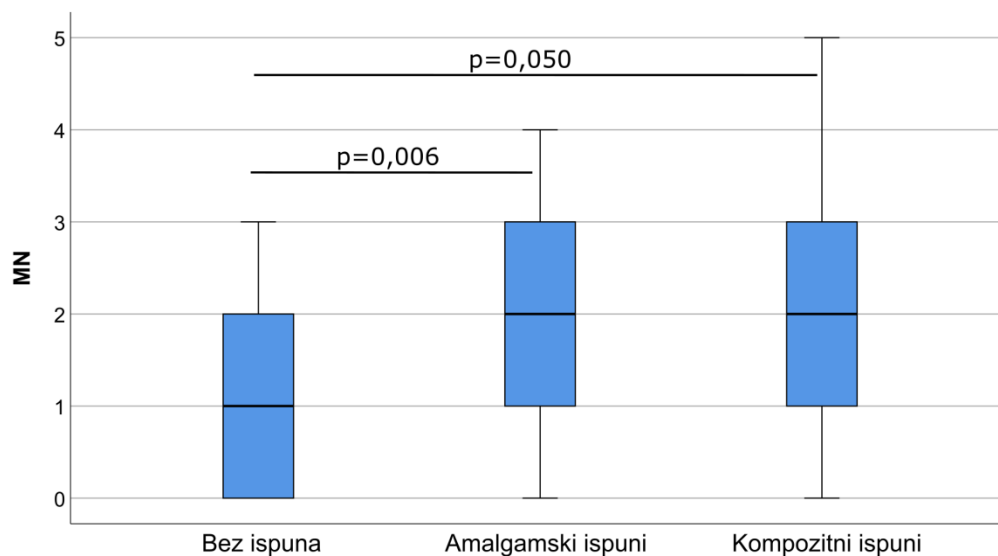
Tablica 6. Rezultati Kruskal-Wallis jednosmjerne ANOVA-e među skupinama.

<b>Varijabla</b>	<b>Stupnjevi slobode</b>	<b>Test statistika</b>	<b>p-vrijednost</b>
MN	2	10,404	0,006
Pup	2	22,003	<0,001
Broken egg	2	1,355	0,508
Binuklearni	2	48,905	<0,001
Nukleoplazmatski most	2	36,488	<0,001
Piknoza	2	0,643	0,725
Karioliza	2	11,669	0,003
Karioreksija	2	2,723	0,256
Kondenzirani kromatin	2	4,802	0,091

Tablica 7. Rezultati višestrukih usporedbi provedenih uz Bonferroni prilagodbu nakon Kruskal-Wallis jednosmjerne ANOVA.

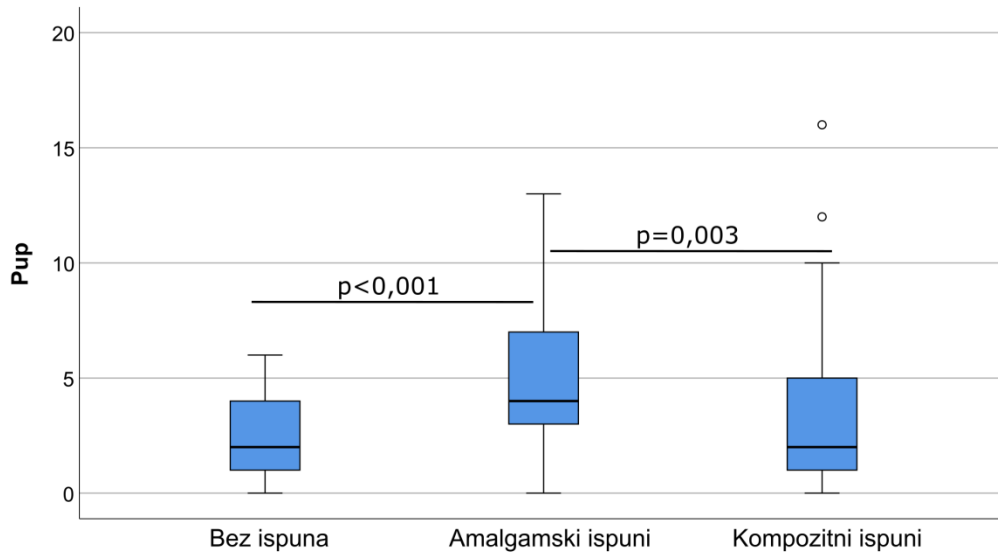
Varijabla	Usporedba	Test statistika	Standardna pogreška	Standardizirana test statistika	P-vrijednost
MN	Bez ispuna - Kompozitni ispuni	-20,09	8,398	-2,392	0,050
	Bez ispuna - Amalgamski ispuni	-25,78	8,398	-3,070	0,006
	Kompozitni ispuni - Amalgamski ispuni	5,69	8,398	0,678	1,000
Pup	Bez ispuna - Kompozitni ispuni	-10,95	8,569	-1,278	0,604
	Bez ispuna - Amalgamski ispuni	-38,97	8,569	-4,548	<0,001
	Kompozitni ispuni - Amalgamski ispuni	28,202	8,569	3,291	0,003
Broken egg	Bez ispuna - Kompozitni ispuni	N/A	N/A	N/A	N/A
	Bez ispuna - Amalgamski ispuni	N/A	N/A	N/A	N/A
	Kompozitni ispuni - Amalgamski ispuni	N/A	N/A	N/A	N/A
Binuklearni	Bez ispuna - Kompozitni ispuni	-22,32	8,636	-2,585	0,029
	Bez ispuna - Amalgamski ispuni	-37,44	8,636	-4,335	<0,001
	Kompozitni ispuni - Amalgamski ispuni	59,76	8,636	6,920	<0,001
Nukleoplazmatski most	Bez ispuna - Kompozitni ispuni	-1,83	8,049	-0,227	1,000
	Bez ispuna - Amalgamski ispuni	-42,99	8,049	-5,341	<0,001
	Kompozitni ispuni - Amalgamski ispuni	41,16	8,049	5,114	<0,001
Piknoza	Bez ispuna - Kompozitni ispuni	N/A	N/A	N/A	N/A
	Bez ispuna - Amalgamski ispuni	N/A	N/A	N/A	N/A
	Kompozitni ispuni - Amalgamski ispuni	N/A	N/A	N/A	N/A
Karioliza	Bez ispuna - Kompozitni ispuni	-26,81	8,688	-3,086	0,006
	Bez ispuna - Amalgamski ispuni	-24,43	8,688	-2,812	0,015
	Kompozitni ispuni - Amalgamski ispuni	2,38	8,688	0,274	1,000
Karioreksija	Bez ispuna - Kompozitni ispuni	N/A	N/A	N/A	N/A
	Bez ispuna - Amalgamski ispuni	N/A	N/A	N/A	N/A
	Kompozitni ispuni - Amalgamski ispuni	N/A	N/A	N/A	N/A
Kondenzirani kromatin	Bez ispuna - Kompozitni ispuni	N/A	N/A	N/A	N/A
	Bez ispuna - Amalgamski ispuni	N/A	N/A	N/A	N/A
	Kompozitni ispuni - Amalgamski ispuni	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A - analiza za višestruke usporedbe nije provedena u slučajevima kada *omnibus* rezultat Kruskal-Wallisove jednosmjerne ANOVA-e nije bio statistički značajan.



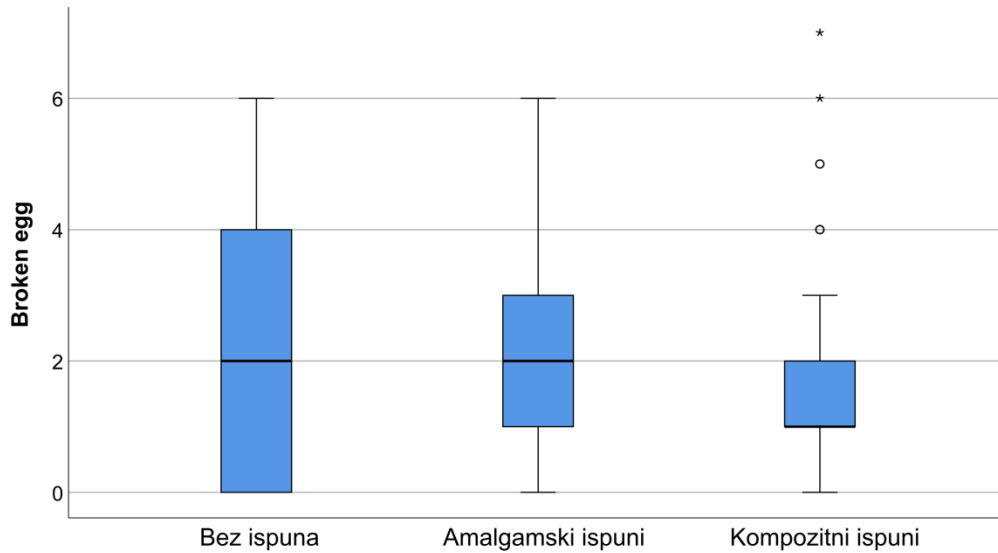
Slika 11. Okvirni dijagrami (*boxplots*) za broj mikronuklea. Okviri predstavljaju 25 % i 75 % kvartile, crne linije u okvirima predstavljaju medijane, a gornje i donje horizontalne linije predstavljaju 1,5 x interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike i pripadajuće p-vrijednosti prikazane su horizontalnim crtama iznad okvira.

Iz rezultata na Slici 11. vidljivo je da je broj mikronuklea bio statistički značajno veći u skupini ispitanika s amalgamskim ispunima u usporedbi sa skupinom bez ispuna ( $p=0,006$ ). Marginalno značajno povišenje broja mikronuklea također je opaženo u skupini s kompozitnim ispunima u usporedbi sa skupinom bez ispuna ( $p=0,050$ ). Pritom se skupine s amalgamskim ispunima i kompozitnim ispunima međusobno nisu statistički značajno razlikovale. Skupina s kompozitnim ispunima pokazala je najveću varijabilnost rezultata među ispitanicima unutar skupine, što se opaža usporedbom njezinog interkvartilnog raspona s interkvartilnim rasponima preostalih dviju skupina. Tako velika varijabilnost unutar skupine s kompozitnim ispunima također je razlog marginalno značajnog rezultata ( $p=0,050$ ) u usporedbi sa skupinom bez ispuna. Visoka varijabilnost rezultata mikronukelus testa uobičajena je u kliničkim okolnostima, s obzirom na visoku osjetljivost testa i nemogućnosti potpune kontrole navika pacijenata koje se mogu odraziti na rezultate. Međutim, potrebno je naglasiti kako su unatoč visokoj varijabilnosti unutar skupina rezultati pokazali statistički značajne učinke amalgamskim i kompozitnih ispuna na morfološke promjene stanica oralne sluznice.



Slika 12. Okvirni dijagrami (*boxplots*) za broj pupova. Okviri predstavljaju 25 % i 75 % kvartile, crne linije u okvirima predstavljaju medijane, a gornje i donje horizontalne linije predstavljaju 1,5 x interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike i pripadajuće p-vrijednosti prikazane su horizontalnim crtama iznad okvira.

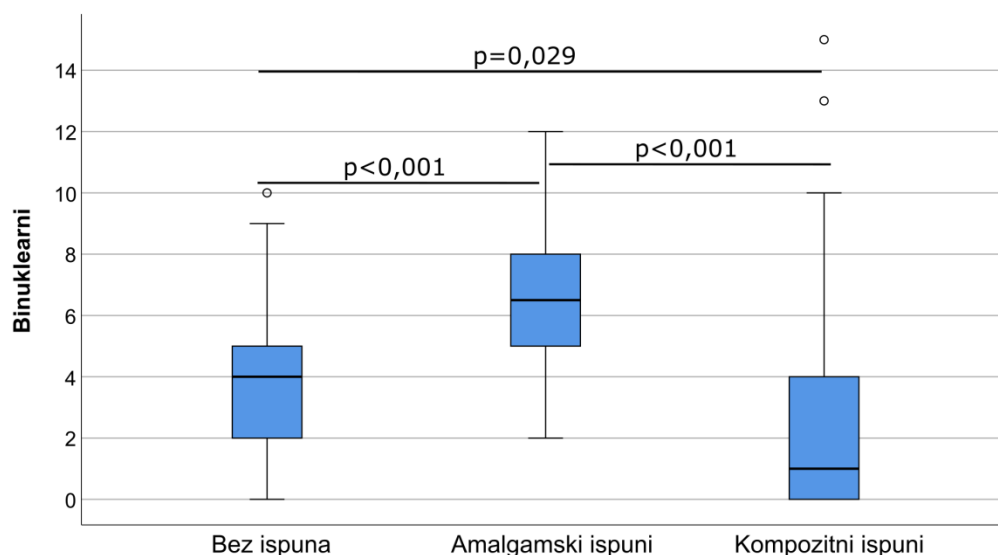
Rezultati za jezgrene pupove na Slici 12. pokazuju da je skupina s amalgamskim ispunima imala statistički značajno veći broj ove morfološke promjene u usporedbi sa skupinom bez ispuna ( $p < 0,001$ ) i skupinom s kompozitnim ispunima ( $p = 0,003$ ). Međutim, skupina s kompozitnim ispunima nije se statistički značajno razlikovala od skupine bez ispuna. Ispitanici s ispunima (amalgamskim i kompozitnim) imali su veće interkvartilne raspone od skupine bez ispuna.



Slika 13. Okvirni dijagrami (*boxplots*) za broj morfoloških promjena tipa *broken egg*. Okviri predstavljaju 25 % i 75 % kvartile, crne linije u okvirima predstavljaju medijane, a gornje i donje horizontalne linije predstavljaju 1,5 x interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike i pripadajuće p-vrijednosti prikazane su horizontalnim crtama iznad okvira.

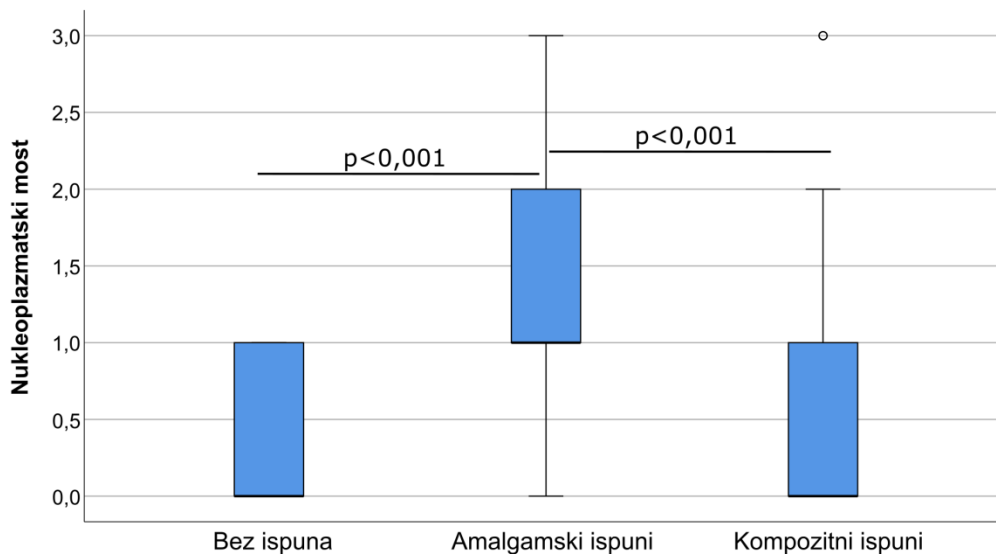
Za morfološku promjenu tipa *broken egg* nisu opažene statistički značajne razlike među skupinama ispitanika bez ispuna, s amalgamskim ispunima i s kompozitnim ispunima (Slika 13), stoga nisu provedene naknadne *post-hoc* usporedbe.





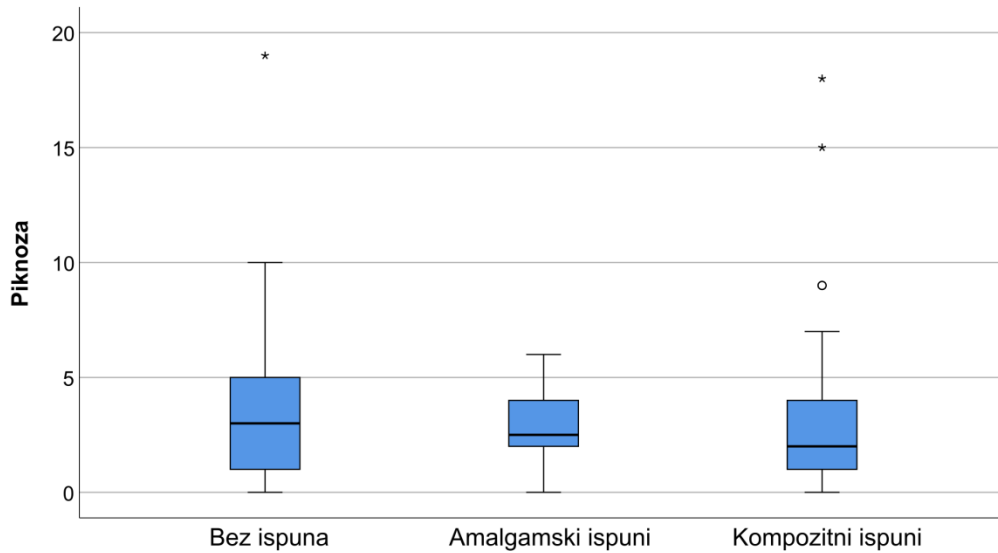
Slika 14. Okvirni dijagrami (*boxplots*) za broj binuklearnih stanica. Okviri predstavljaju 25% i 75% kvartile, crne linije u okvirima predstavljaju medijane, a gornje i donje horizontalne linije predstavljaju 1,5 x interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike i pripadajuće p-vrijednosti prikazane su horizontalnim crtama iznad okvira.

Rezultati broja binuklearnih stanica prikazani na Slici 14. pokazali su statistički značajne razlike između sve tri skupine ispitanika. Može se napomenuti i kako je ovaj parametar mikronukleus testa pokazao najveću statističku snagu u višestrukim usporedbama i stoga je jedini kod kojeg su značajne razlike detektirane između svih skupina ispitanika. Dobivene p-vrijednosti bile su visoko značajne za usporedbu skupine s amalgamskim ispunima i skupine bez ispuna ( $p < 0,001$ ), odnosno za usporedbu skupine s amalgamskim ispunima i skupine s kompozitnim ispunima ( $p < 0,001$ ). Značajna razlika opažena je i između skupine bez ispuna i skupine s kompozitnim ispunima ( $p = 0,029$ ).



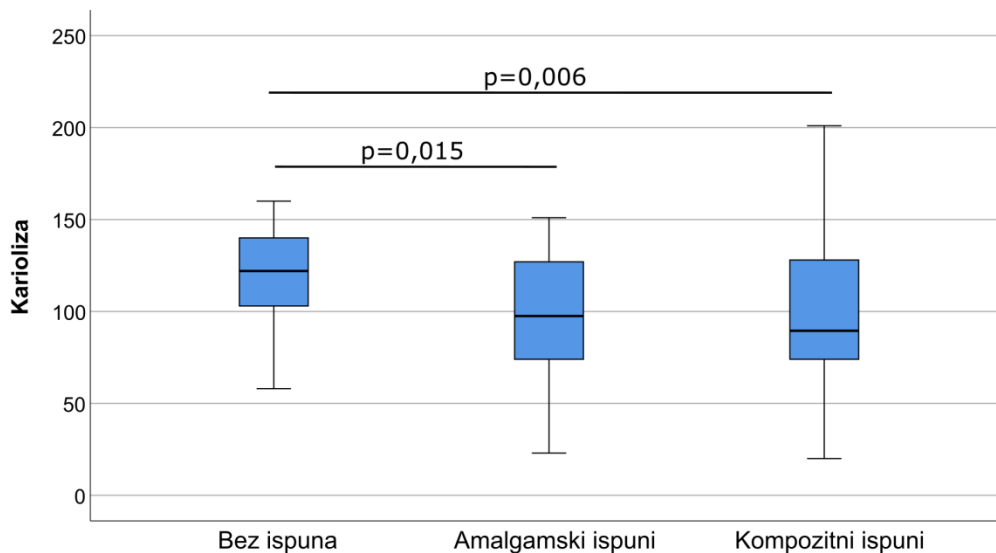
Slika 15. Okvirni dijagrami (*boxplots*) za broj nukleoplazmatskih mostova. Okviri predstavljaju 25 % i 75 % kvartile, crne linije u okvirima predstavljaju medijane, a gornje i donje horizontalne linije predstavljaju 1,5 x interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike i pripadajuće p-vrijednosti prikazane su horizontalnim crtama iznad okvira.

Slika 15. prikazuje statistički značajno veći broj nukleoplazmatskih mostova u skupini ispitanika s amalgamskim ispunima u usporedbi sa skupinom bez ispuna ( $p < 0,001$ ) i skupinom s kompozitnim ispunima ( $p < 0,001$ ).



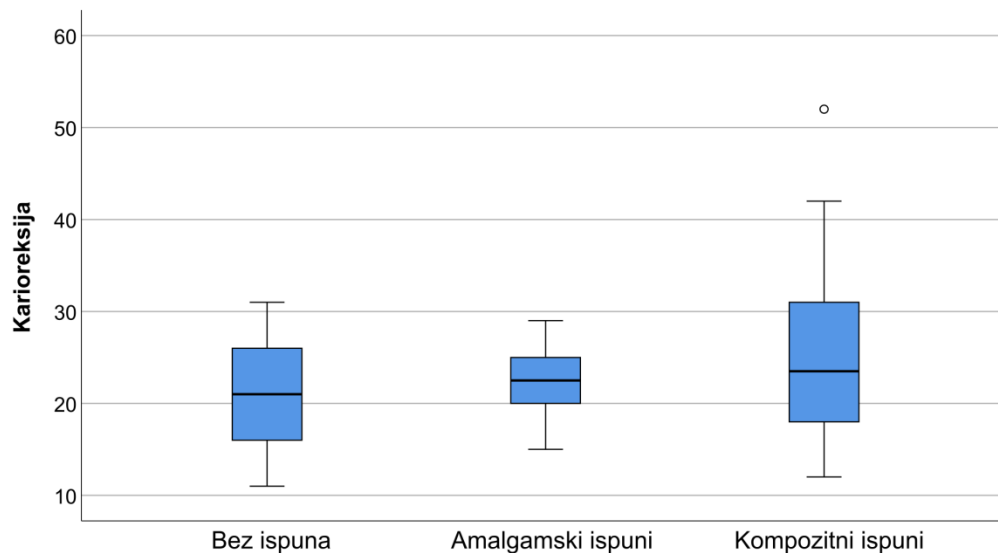
Slika 16. Okvirni dijagrami (*boxplots*) za broj piknoza. Okviri predstavljaju 25 % i 75 % kvartile, crne linije u okvirima predstavljaju medijane, a gornje i donje horizontalne linije predstavljaju 1,5 x interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike i pripadajuće p-vrijednosti prikazane su horizontalnim crtama iznad okvira.

Rezultati za piknozu prikazani na Slici 16. nisu pokazali statistički značajne razlike među skupinama ispitanika bez ispuna, s amalgamskim ispunima i s kompozitnim ispunima.



Slika 17. Okvirni dijagrami (*boxplots*) za broj karioliza. Okviri predstavljaju 25 % i 75 % kvartile, crne linije u okvirima predstavljaju medijane, a gornje i donje horizontalne linije predstavljaju 1,5 x interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike i pripadajuće p-vrijednosti prikazane su horizontalnim crtama iznad okvira.

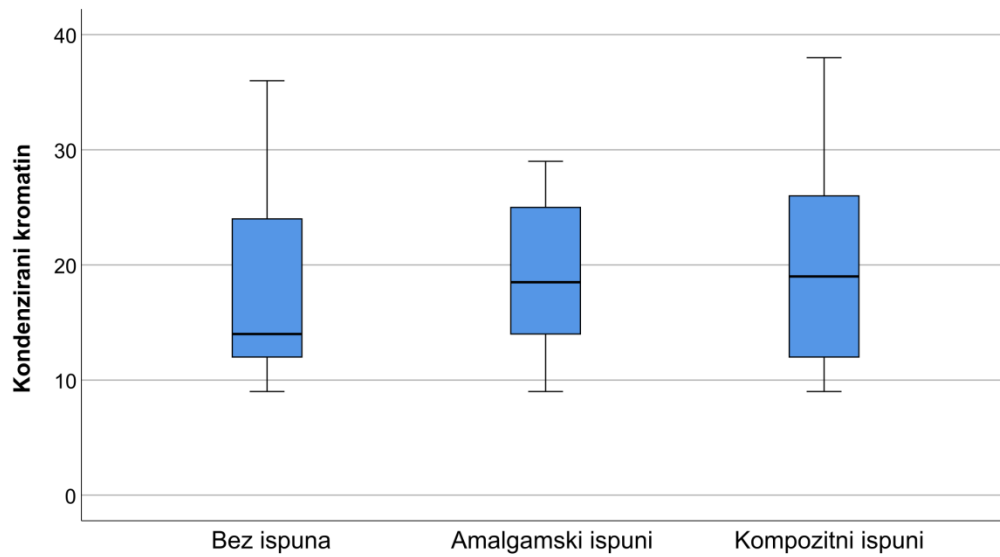
Rezultati predstavljeni na Slici 17. pokazuju kako je broj karioliza u skupini bez ispuna bio statistički značajno veći nego u skupini s amalgamskim ispunima ( $p=0,015$ ) i skupini s kompozitnim ispunima ( $p=0,006$ ), uz nepostojanje statistički značajne razlike između dviju skupina s ispunima.



Slika 18. Okvirni dijagrami (*boxplots*) za broj karioreksija. Okviri predstavljaju 25 % i 75 % kvartile, crne linije u okvirima predstavljaju medijane, a gornje i donje horizontalne linije predstavljaju 1,5 x interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike i pripadajuće p-vrijednosti prikazane su horizontalnim crtama iznad okvira.

Broj karioreksija predstavljen na Slici 18. nije pokazao statistički značajne razlike između skupina ispitanika bez ispuna, s amalgamskim ispunima i s kompozitnim ispunima.

Sličan izostanak statistički značajnih razlika među skupinama ispitanika opaža se na Slici 20. koja predstavlja rezultate za morfološku promjenu tipa kondenzirani kromatin.



Slika 19. Okvirni dijagrami (*boxplots*) za broj morfoloških promjena tipa kondenzirani kromatin. Okviri predstavljaju 25 % i 75 % kvartile, crne linije u okvirima predstavljaju medijane, a gornje i donje horizontalne linije predstavljaju 1,5 x interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike i pripadajuće p-vrijednosti prikazane su horizontalnim crtama iznad okvira.

Tablica 8. Rezultati regresijske analize ovisnosti parametara mikronukleus testa kao nezavisne varijable i broja amalgamskih te kompozitnih ploha kao prediktorskih varijabli.

Nezavisna varijabla	R <sup>2</sup>	Prediktorske varijable	β	t	p-vrijednost
MN	0,066	Broj amalgamskih ploha	0,113	1,396	0,165
		Broj kompozitnih ploha	0,233	2,864	0,005
Pup	0,117	Broj amalgamskih ploha	0,237	2,996	0,003
		Broj kompozitnih ploha	0,221	2,803	0,006
Broken egg	0,007	Broj amalgamskih ploha	0,068	0,803	0,423
		Broj kompozitnih ploha	0,038	0,455	0,650
Binuklearni	0,183	Broj amalgamskih ploha	0,394	5,181	<0,001
		Broj kompozitnih ploha	0,127	1,675	0,096
Nukleoplazmatski most	0,199	Broj amalgamskih ploha	0,451	6,000	<0,001
		Broj kompozitnih ploha	0,026	0,352	0,726
Piknoza	0,004	Broj amalgamskih ploha	-0,124	-1,483	0,140
		Broj kompozitnih ploha	0,078	0,932	0,353
Karioliza	0,013	Broj amalgamskih ploha	-0,060	-0,714	0,476
		Broj kompozitnih ploha	-0,086	-1,028	0,306
Karioreksija	0,033	Broj amalgamskih ploha	-0,035	-0,427	0,670
		Broj kompozitnih ploha	0,219	2,647	0,009
Kondenzirani kromatin	0,034	Broj amalgamskih ploha	-0,016	-0,198	0,843
		Broj kompozitnih ploha	0,220	2,659	0,009

Rezultati regresijske analize povezanosti parametara mikronukleus testa kao nezavisne varijable i broja amalgamskih te kompozitnih ploha kao prediktorskih varijabli prikazani u Tablici 8 općenito su pokazali niske vrijednosti R<sup>2</sup> što ukazuje na činjenicu da se razmjerno mali udio ukupne varijance može objasniti prediktorskim varijablama, odnosno brojem amalgamskih/kompozitnih ploha. Unatoč niskim vrijednostima R<sup>2</sup>, regresijski rezultati su bili statistički značajni za pojedine parametre mikronukleus testa. Među svim ispitivanim parametrima, ističe se broj pupova za koji je regresija pokazala statističku značajnost s brojem ploha za obje vrste ispuna, tj. amalgamske (p=0,003) i kompozitne (p=0,006) s beta-koeficijentima od 0,237 i 0,221. Preostali parametri mikronukleus testa pokazali su statistički značajnu povezanost s brojem ploha samo jedne vrste ispuna (ili amalgamskih ili kompozitnih), kako slijedi: broj mikronuklea s brojem kompozitnih ploha (p=0,005, beta=0,233), broj binuklearnih stanica s brojem amalgamskih ploha (p<0,001, beta=0,394), broj nukleoplazmatskih mostova s brojem amalgamskih ploha (p<0,001, beta=0,451), broj karioreksija s brojem kompozitnih ploha (p=0,009, beta =0,219) i kondenzirani kromatin s brojem kompozitnih ploha (p=0,009, beta=0,220).

Tablica 9. Rezultati regresijske analize za ovisnost broja mikronuklea o prediktorskim varijablama.

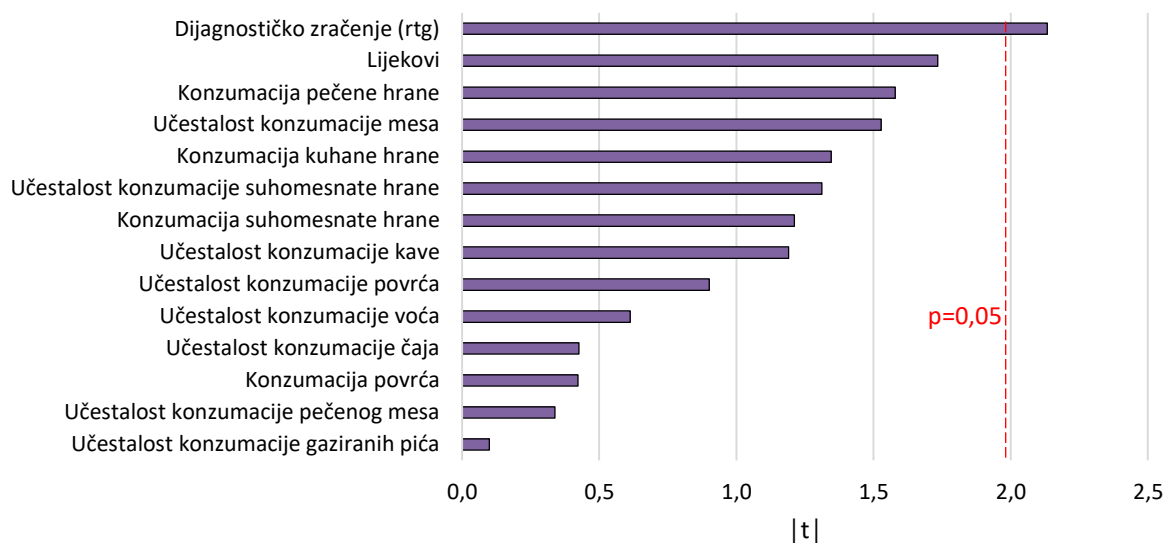
	$\beta$	t	p-vrijednost
Dijagnostičko zračenje (rtg)	0,205	2,133	0,035
Lijekovi	-0,168	-1,734	0,086
Konsumacija suhomesnate hrane	0,232	1,211	0,228
Konsumacija kuhane hrane	0,382	1,346	0,181
Konsumacija pečene hrane	0,422	1,579	0,117
Učestalost konzumacije mesa	-0,151	-1,528	0,129
Učestalost konzumacije pečenog mesa	-0,043	-0,338	0,736
Učestalost konzumacije suhomesnate hrane	0,138	1,312	0,192
Konsumacija povrća	-0,041	-0,422	0,673
Učestalost konzumacije povrća	-0,084	-0,900	0,370
Učestalost konzumacije voća	-0,058	-0,612	0,542
Učestalost konzumacije kave	0,132	1,191	0,236
Učestalost konzumacije čaja	-0,041	-0,427	0,670
Učestalost konzumacije gaziranih pića	0,009	0,099	0,921

Multivarijatna regresijska analiza provedena je kako bi se utvrdile povezanosti potencijalnih genotoksičnih čimbenika vezanih za životni stil pacijenata i parametara mikronukleus testa. Podaci o životnom stilu i navikama pacijenata prije svega vezani su za konzumaciju hrane i pića i prikupljeni su pomoću upitnika za samoprocjenu i upotrijebljeni su kao mogući prediktori pokazatelja genotoksičnosti (broja mikronuklea, pupova, morfoloških promjena tipa *broken egg*, binuklearnih stanica, nukleoplazmatskih mostova, piknoza, karioliza, karioreksija i morfoloških promjena tipa kondenzirani kromatin). Unatoč ograničenjima vezanim za distribuciju podataka regresijska analiza provedena je eksploratorno u skladu s prethodnim istraživanjem.

Podaci prikupljeni upitnicima za samoprocjenu koji su bili pseudo-intervalni, odnosno kategorijski s međusobno isključivim i jasno razgraničenim kategorijama upotrijebljeni su za kao prediktorske varijable. Na taj način su za svaki od devet parametara mikronukleus testa kao prediktori ispitani sljedeći podaci iz upitnika: dijagnostičko zračenje (rtg), lijekovi, konzumacija suhomesnate hrane, konzumacija kuhane hrane, konzumacija pečene hrane, učestalost konzumacije mesa, učestalost konzumacije pečenog mesa, učestalost konzumacije suhomesnate hrane, konzumacija povrća, učestalost konzumacije povrća, učestalost konzumacije voća, učestalost konzumacije kave, učestalost konzumacije čaja i učestalost konzumacije gaziranih pića.



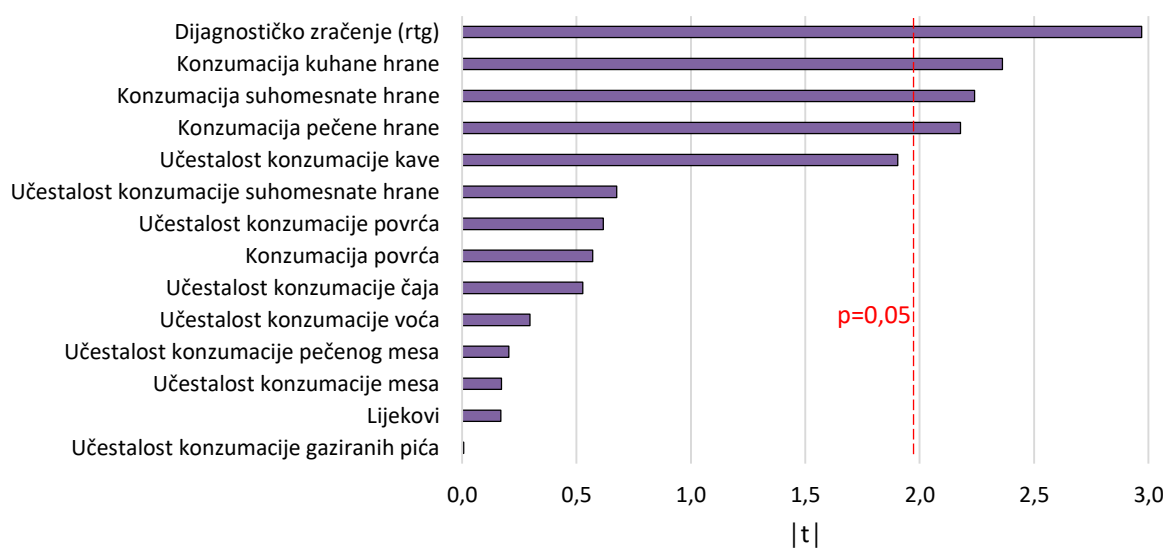
Glavni rezultati regresijskih analiza, odnosno standardizirani koeficijenti  $\beta$ , t-vrijednosti i p-vrijednosti prikazani su za regresijske modele sa sljedećim zavisnim varijablama: broj mikronuklea (Tablica 9.), broj pupova (Tablica 10.), broj morfoloških promjena tipa *broken egg* (Tablica 11.), broj binuklearnih stanica (Tablica 12.), broj nukleoplazmatskih mostova (Tablica 13.), broj piknoza (Tablica 14.), broj karioliza (Tablica 15.), broj karioreksija (Tablica 16.) i broj morfoloških promjena tipa kondenzirani kromatin (Tablica 17.). Reorganizacijom redoslijeda pojedinih prediktora prema padajućim vrijednostima test-statistike t, odnosno odgovarajućim porastom p-vrijednosti, dobiveni su Pareto dijagrami koji olakšavaju vizualizaciju relativnih utjecaja prediktorskih varijabli na parametre mikronukleus testa. Pri tome se statistički značajnim mogu smatrati samo prediktori s t-vrijednostima većim od graničnih vrijednosti definiranih na razini značajnosti od 0,05, a koje su na Pareto dijagramima prikazane kao isprekidane crvene okomite crte. Na taj se način na Pareto dijagramu za broj mikronuklea (Slika 20.) opaža statistički značajan učinak dijagnostičkog zračenja, dok ostali prediktori nisu pokazali značajan učinak.



Slika 20. Pareto dijagram ovisnosti broja mikronuklea o prediktorskim varijablama. Isprekidana crvena crta označava granicu značajnosti. Prediktorske varijable s t-vrijednostima većim od te granice imaju statistički značajan učinak u regresijskom modelu.

Tablica 10. Rezultati regresijske analize za ovisnost broja pupova o prediktorskim varijablama.

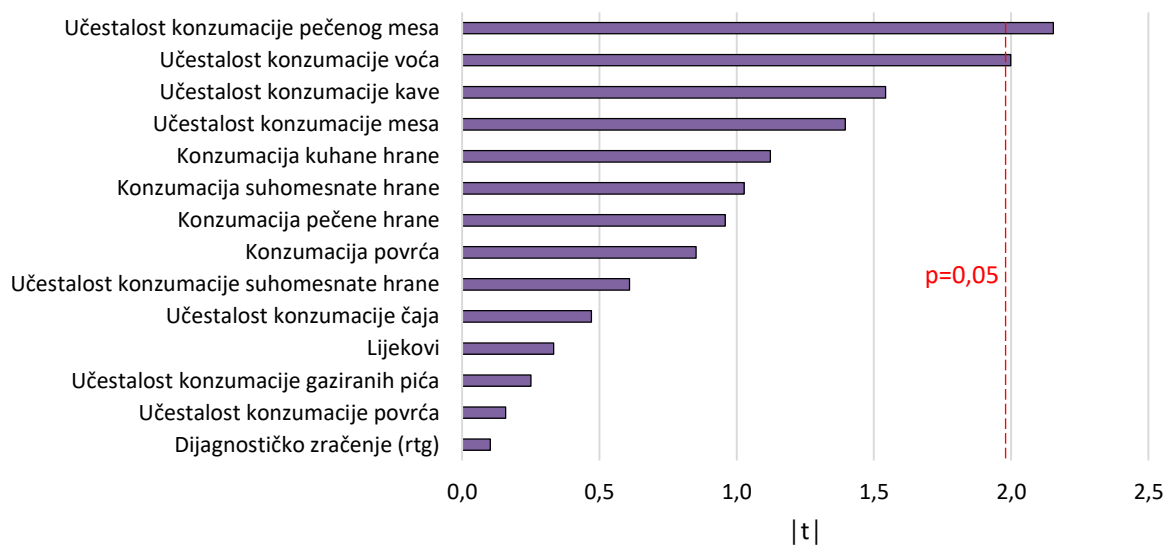
	$\beta$	t	p-vrijednost
Dijagnostičko zračenje (rtg)	0,287	2,970	0,004
Lijekovi	-0,017	-0,169	0,866
Konзумacija suhomesnate hrane	0,433	2,240	0,027
Konзумacija kuhane hrane	0,676	2,361	0,020
Konзумacija pečene hrane	0,587	2,179	0,031
Učestalost konzumacije mesa	-0,017	-0,172	0,864
Učestalost konzumacije pečenog mesa	-0,026	-0,204	0,839
Učestalost konzumacije suhomesnate hrane	0,072	0,675	0,501
Konзумacija povrća	-0,056	-0,571	0,569
Učestalost konzumacije povrća	0,058	0,617	0,538
Učestalost konzumacije voća	0,028	0,297	0,767
Učestalost konzumacije kave	0,214	1,904	0,059
Učestalost konzumacije čaja	-0,051	-0,528	0,599
Učestalost konzumacije gaziranih pića	-0,001	-0,007	0,994



Slika 21. Pareto dijagram ovisnosti broja pupova o prediktorskim varijablama. Isprekidana crvena crta označava granicu značajnosti. Prediktorske varijable s t-vrijednostima većim od te granice imaju statistički značajan učinak u regresijskom modelu.

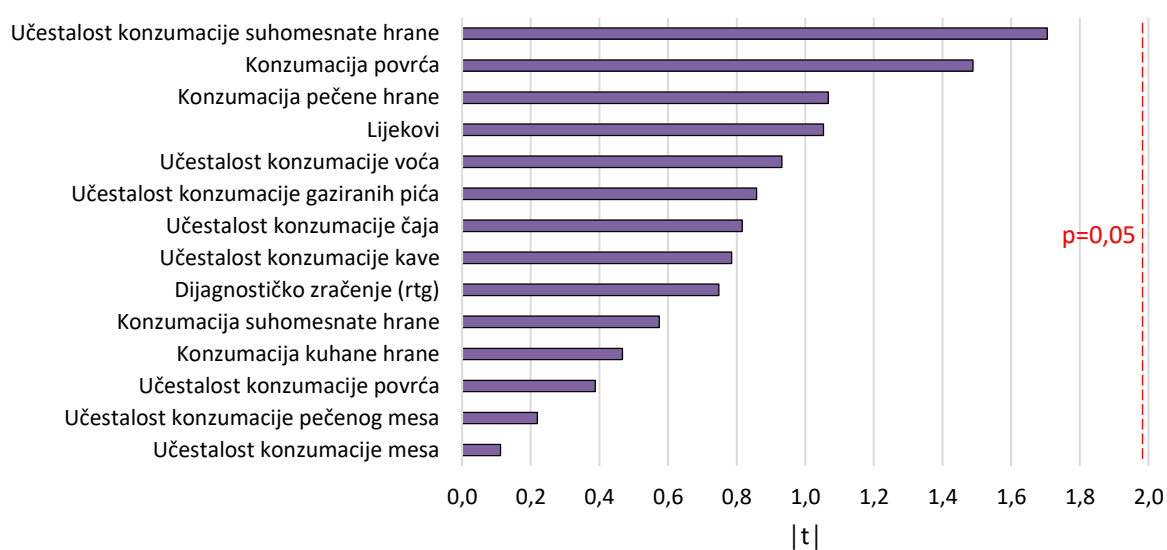
Tablica 11. Rezultati regresijske analize za ovisnost morfoloških promjena tipa *broken egg* o prediktorskim varijablama.

	$\beta$	t	p-vrijednost
Dijagnostičko zračenje (rtg)	-0,010	-0,102	0,919
Lijekovi	0,033	0,333	0,739
Konзумacija suhomesnate hrane	-0,199	-1,027	0,307
Konзумacija kuhane hrane	-0,323	-1,123	0,264
Konзумacija pečene hrane	-0,259	-0,959	0,340
Učestalost konzumacije mesa	-0,140	-1,396	0,165
Učestalost konzumacije pečenog mesa	0,275	2,154	0,033
Učestalost konzumacije suhomesnate hrane	0,065	0,610	0,543
Konзумacija povrća	0,083	0,853	0,396
Učestalost konzumacije povrća	0,015	0,159	0,874
Učestalost konzumacije voća	-0,191	-1,998	0,048
Učestalost konzumacije kave	0,174	1,543	0,126
Učestalost konzumacije čaja	0,046	0,471	0,638
Učestalost konzumacije gaziranih pića	0,023	0,250	0,803

Slika 22. Pareto dijagram ovisnosti morfoloških promjena tipa *broken egg* o prediktorskim varijablama. Isprekidana crvena crta označava granicu značajnosti. Prediktorske varijable s t-vrijednostima većim od te granice imaju statistički značajan učinak u regresijskom modelu.

Tablica 12. Rezultati regresijske analize za ovisnost broja binuklearnih stanica o prediktorskim varijablama.

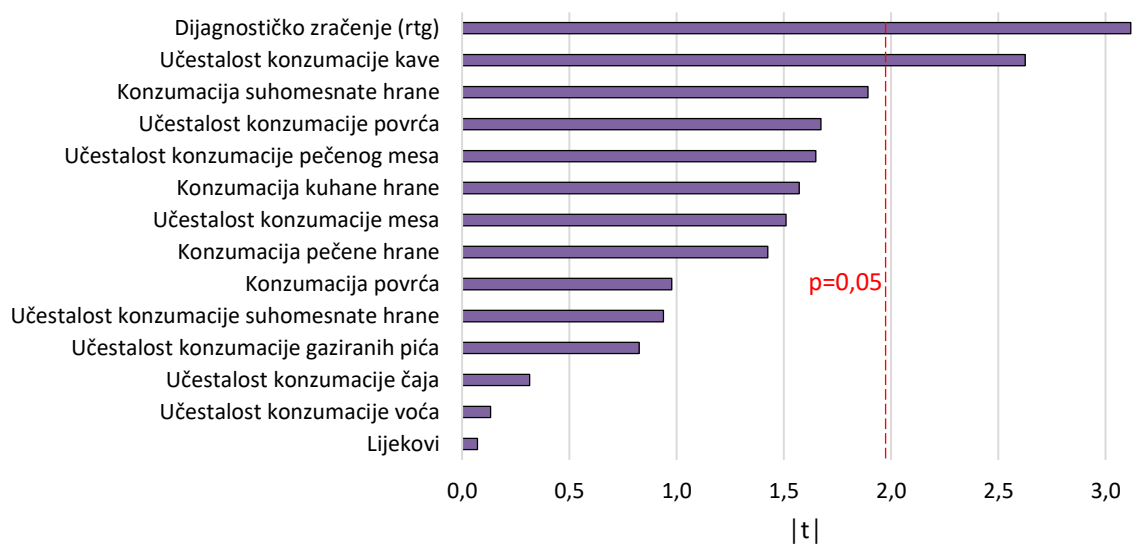
	$\beta$	t	p-vrijednost
Dijagnostičko zračenje (rtg)	0,071	0,748	0,456
Lijekovi	0,101	1,053	0,294
Konзумacija suhomesnate hrane	0,109	0,575	0,566
Konзумacija kuhane hrane	0,131	0,467	0,641
Konзумacija pečene hrane	0,282	1,067	0,288
Učestalost konzumacije mesa	0,011	0,112	0,911
Učestalost konzumacije pečenog mesa	-0,027	-0,219	0,827
Učestalost konzumacije suhomesnate hrane	-0,178	-1,705	0,091
Konзумacija povrća	-0,143	-1,489	0,139
Učestalost konzumacije povrća	-0,036	-0,389	0,698
Učestalost konzumacije voća	-0,087	-0,932	0,353
Učestalost konzumacije kave	0,087	0,786	0,434
Učestalost konzumacije čaja	0,078	0,816	0,416
Učestalost konzumacije gaziranih pića	-0,079	-0,858	0,393



Slika 23. Pareto dijagram ovisnosti broja binuklearnih stanica o prediktorskim varijablama. Isprekidana crvena crta označava granicu značajnosti. Prediktorske varijable s t-vrijednostima većim od te granice imaju statistički značajan učinak u regresijskom modelu.

Tablica 13. Rezultati regresijske analize za ovisnost broja nukleoplazmatskih mostova o prediktorskim varijablama.

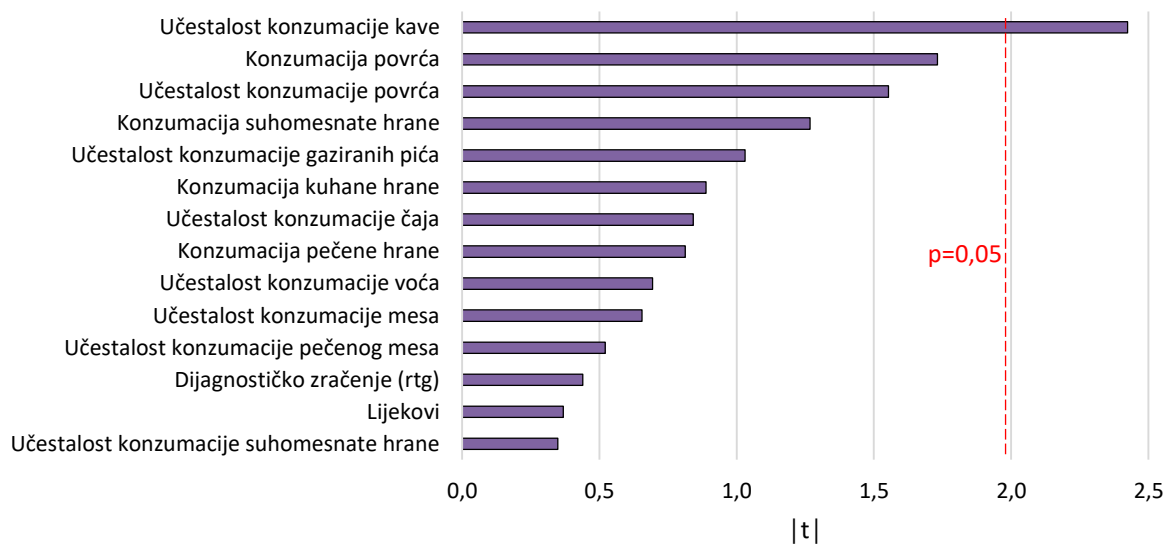
	$\beta$	t	p-vrijednost
Dijagnostičko zračenje (rtg)	0,291	3,118	0,002
Lijekovi	0,007	0,072	0,943
Konзумacija suhomesnate hrane	0,353	1,892	0,061
Konзумacija kuhane hrane	0,434	1,572	0,119
Konзумacija pečene hrane	0,370	1,425	0,157
Učestalost konzumacije mesa	-0,145	-1,511	0,133
Učestalost konzumacije pečenog mesa	0,202	1,649	0,102
Učestalost konzumacije suhomesnate hrane	0,096	0,939	0,350
Konзумacija povrća	0,092	0,978	0,330
Učestalost konzumacije povrća	-0,152	-1,674	0,097
Učestalost konzumacije voća	0,012	0,132	0,895
Učestalost konzumacije kave	0,284	2,625	0,010
Učestalost konzumacije čaja	0,029	0,315	0,753
Učestalost konzumacije gaziranih pića	-0,074	-0,825	0,411



Slika 24. Pareto dijagram ovisnosti broja nukleoplazmatskih mostova o prediktorskim varijablama. Isprekidana crvena crta označava granicu značajnosti. Prediktorske varijable s t-vrijednostima većim od te granice imaju statistički značajan učinak u regresijskom modelu.

Tablica 14. Rezultati regresijske analize za ovisnost broja piknoza o prediktorskim varijablama.

	$\beta$	t	p-vrijednost
Dijagnostičko zračenje (rtg)	0,043	0,439	0,661
Lijekovi	0,036	0,369	0,713
Konsumacija suhomesnate hrane	0,246	1,267	0,208
Konsumacija kuhane hrane	0,256	0,889	0,376
Konsumacija pečene hrane	0,220	0,813	0,418
Učestalost konzumacije mesa	0,066	0,655	0,514
Učestalost konzumacije pečenog mesa	0,067	0,521	0,603
Učestalost konzumacije suhomesnate hrane	-0,037	-0,349	0,728
Konsumacija povrća	0,170	1,732	0,086
Učestalost konzumacije povrća	-0,147	-1,553	0,123
Učestalost konzumacije voća	-0,067	-0,694	0,489
Učestalost konzumacije kave	0,273	2,424	0,017
Učestalost konzumacije čaja	-0,082	-0,841	0,402
Učestalost konzumacije gaziranih pića	0,097	1,031	0,305



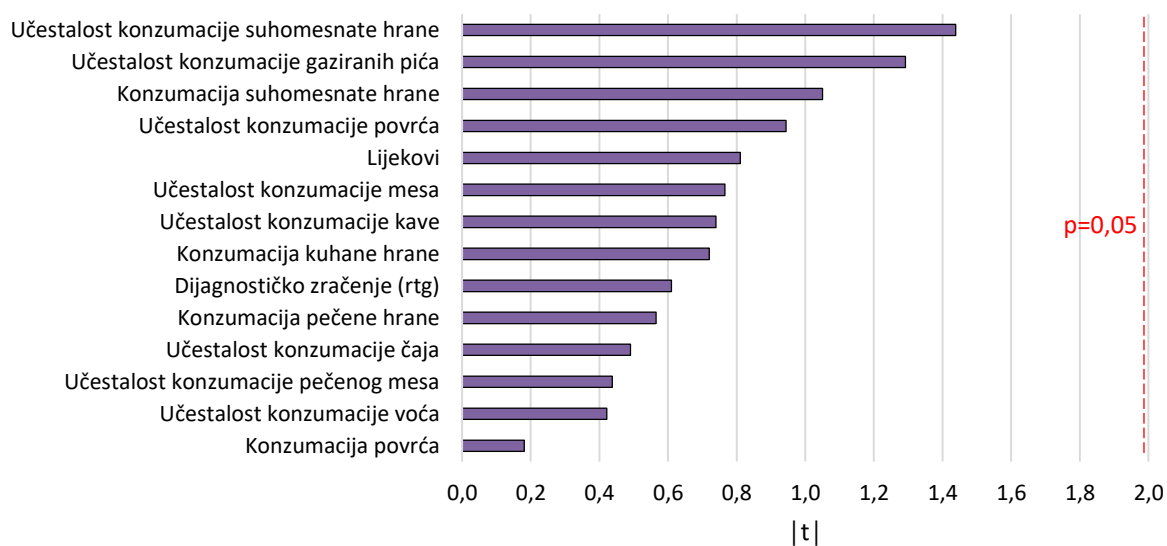
Slika 25. Pareto dijagram ovisnosti broja piknoza o prediktorskim varijablama. Isprekidana crvena crta označava granicu značajnosti. Prediktorske varijable s t-vrijednostima većim od te granice imaju statistički značajan učinak u regresijskom modelu.

Regresijski model za broj pupova (Slika 21.) pokazao je statistički značajan učinak većeg broja prediktora, naime, u tom su modelu osim dijagnostičkog zračenja značajni prediktori bili i konzumacija kuhane hrane, konzumacija suhomesnate hrane i konzumacija pečene hrane.

Broj nukleoplazmatskih mostova prema rezultatima regresijskog modela prikazanim na Slici 24. pokazao je statistički značajan učinak prediktora dijagnostičko zračenje i učestalost konzumacije kave. Učestalost konzumacije kave također je bio statistički značajni prediktor u regresijskom modelu za broj piknoza (Slika 25.). Dobiveni rezultati pokazuju da se genotoksični učinak konzumacije kave odrazio na dva parametra mikronukleus testa. Jedini čimbenik stila života ispitanika koji je statistički značajno utjecao na veći broj parametara od učestalosti konzumacije kave bilo je izlaganje dijagnostičkom zračenju (Rtg), koje je bilo značajni prediktor kod tri parametra mikronukleus testa: broj mikronuklea, broj pupova i broj nukleoplazmatskih mostova. Shodno tomu, konzumacija kave i dijagnostičko zračenje, ističu se, između svih ostalih potencijalno genotoksičnih navika ispitanih pomoću upitnika samoprocjene, kao najistaknutiji čimbenici jer su se odrazili na više od jednog od pokazatelja genotoksičnosti.

Tablica 15. Rezultati regresijske analize za ovisnost broja karioliza o prediktorskim varijablama.

	$\beta$	t	p-vrijednost
Dijagnostičko zračenje (rtg)	-0,060	-0,610	0,543
Lijekovi	0,081	0,810	0,419
Konзумacija suhomesnate hrane	-0,207	-1,050	0,296
Konзумacija kuhane hrane	-0,210	-0,721	0,473
Konзумacija pečene hrane	-0,155	-0,565	0,573
Učestalost konzumacije mesa	0,078	0,766	0,445
Učestalost konzumacije pečenog mesa	-0,057	-0,437	0,663
Učestalost konzumacije suhomesnate hrane	-0,156	-1,439	0,153
Konзумacija povrća	-0,018	-0,181	0,857
Učestalost konzumacije povrća	0,090	0,944	0,347
Učestalost konzumacije voća	-0,041	-0,421	0,674
Učestalost konzumacije kave	-0,084	-0,739	0,461
Učestalost konzumacije čaja	0,048	0,491	0,624
Učestalost konzumacije gaziranih pića	-0,122	-1,292	0,199

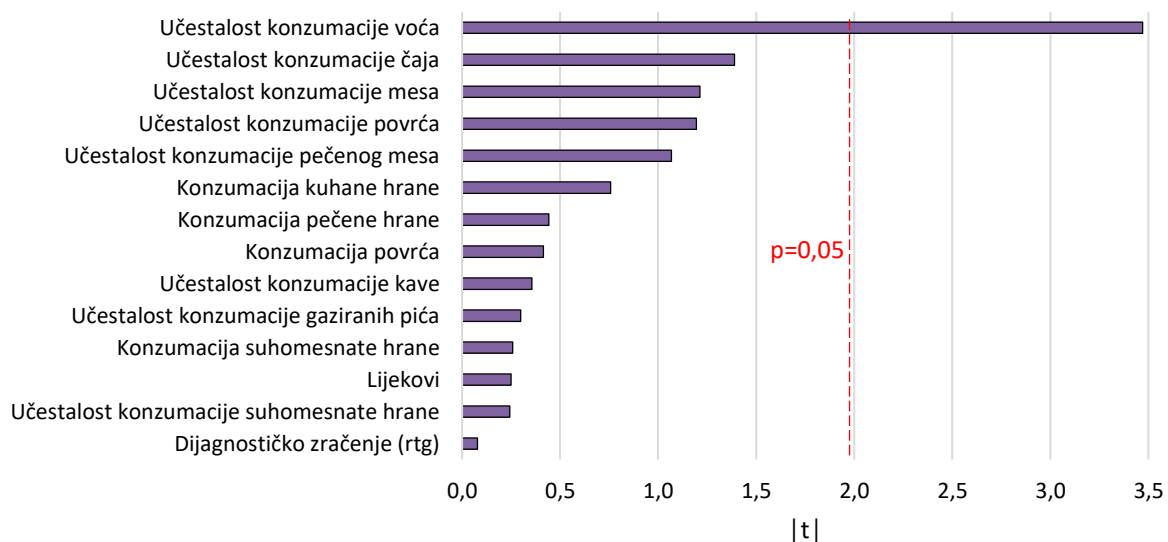


Slika 26. Pareto dijagram ovisnosti broja karioliza o prediktorskim varijablama. Isprekidana crvena crta označava granicu značajnosti. Prediktorske varijable s t-vrijednostima većim od te granice imaju statistički značajan učinak u regresijskom modelu.



Tablica 16. Rezultati regresijske analize za ovisnost broja karioreksija o prediktorskim varijablama.

	$\beta$	t	p-vrijednost
Dijagnostičko zračenje (rtg)	0,008	0,078	0,938
Lijekovi	0,024	0,250	0,803
Konзумacija suhomesnate hrane	-0,050	-0,259	0,796
Konзумacija kuhane hrane	-0,215	-0,758	0,450
Konзумacija pečene hrane	-0,118	-0,442	0,659
Učestalost konzumacije mesa	0,120	1,213	0,227
Učestalost konzumacije pečenog mesa	-0,134	-1,068	0,288
Učestalost konzumacije suhomesnate hrane	0,026	0,243	0,808
Konзумacija povrća	-0,040	-0,415	0,679
Učestalost konzumacije povrća	0,111	1,195	0,235
Učestalost konzumacije voća	-0,327	-3,470	0,001
Učestalost konzumacije kave	-0,040	-0,356	0,722
Učestalost konzumacije čaja	0,133	1,389	0,167
Učestalost konzumacije gaziranih pića	0,028	0,300	0,765

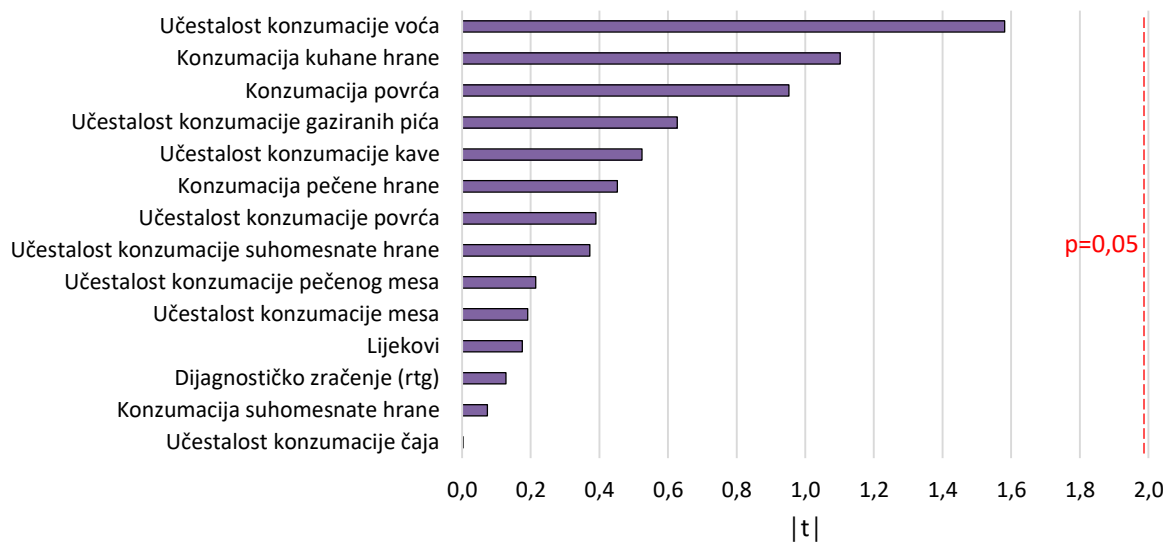


Slika 27. Pareto dijagram ovisnosti broja karioreksija o prediktorskim varijablama. Isprekidana crvena crta označava granicu značajnosti. Prediktorske varijable s t-vrijednostima većim od te granice imaju statistički značajan učinak u regresijskom modelu.

Za razliku od većine parametara, kod modela za karioreksiju učestalost konzumacije voća pokazala je protektivni učinak (Slika 27.) s negativnim koeficijentom beta od -0.327.

Tablica 17. Rezultati regresijske analize za ovisnost morfoloških promjena tipa kondenzirani kromatin o prediktorskim varijablama.

	$\beta$	t	p-vrijednost
Dijagnostičko zračenje (rtg)	-0,013	-0,128	0,898
Lijekovi	0,018	0,175	0,861
Konзумacija suhomesnate hrane	0,015	0,074	0,941
Konзумacija kuhane hrane	0,323	1,102	0,273
Konзумacija pečene hrane	0,125	0,453	0,652
Učestalost konzumacije mesa	0,020	0,192	0,848
Učestalost konzumacije pečenog mesa	0,028	0,214	0,831
Učestalost konzumacije suhomesnate hrane	-0,040	-0,372	0,711
Konзумacija povrća	-0,095	-0,953	0,343
Učestalost konzumacije povrća	-0,037	-0,390	0,697
Učestalost konzumacije voća	-0,154	-1,582	0,116
Učestalost konzumacije kave	0,060	0,524	0,601
Učestalost konzumacije čaja	0,000	0,003	0,998



Slika 28. Pareto dijagram ovisnosti morfoloških promjena tipa kondenzirani kromatin o prediktorskim varijablama. Isprekidana crvena crta označava granicu značajnosti. Prediktorske varijable s t-vrijednostima većim od te granice imaju statistički značajan učinak u regresijskom modelu.



Svrha ovog istraživanja bila je procjena genotoksičnog učinka amalgamskih i kompozitnih ispuna na stanice bukalne sluznice u neposrednoj blizini dentalne restauracije pomoću mikronukleus testa, koji otkriva oštećenja na kromosomskoj razini, a koja se dovode u vezu s patološkim promjenama u organizmu. Navedeno je istraživanje provedeno kako bi se promatrao i usporedio test mikronukleusa među ispitanicima s amalgamskim i kompozitnim ispunima i onih bez ispuna u usnoj šupljini.

Mikronukleusi (MN) se smatraju fragmentima ili cijelim kromosomima koji tijekom mitoze nisu dosegli pol vretena i ostali su inkapsulirani u telofazi u zasebnoj jezgri. Test kromosomskih aberacija detektira samo oštećenje genoma, dok mikronukleus test dodatno otkriva gubitak kromosoma ili poremećaj mitotskog vretena uzrokovan aneugenim mehanizmima. Boller, Schmidt i Heddle prvi su predložili izraz mikronukleus test ranih 1970-ih, koji su pokazali da ovaj test pruža jednostavan postupak za otkrivanje genotoksičnog potencijala mutagena nakon *in vivo* izlaganja životinja korištenjem eritrocita koštane srži. MN analiza bukalnih stanica potencijalno je izvrstan biomarker za genetsko oštećenje te je MN test vrlo važan za praćenje, dijagnostiku i pravovremeno liječenje bolesti nastalih uslijed genetskih oštećenja jer može otkriti aktivnost klastogenenih (kromosomski lom) i aneugenih (gubitak kromosoma) genotoksičnih čimbenika (2). Porast broja MN u oljuštenim stanicama ukazuje na povećanu stopu genotoksičnosti (41).

Kompozitni materijali i dentalni amalgami, kao materijali primjenjeni za izradu zubnih ispuna, dolaze u izravan dodir s oralnim tkivima te uslijed tog bliskog i trajnog kontakta moraju imati visok stupanj biokompatibilnosti. Biokompatibilnost se definira kao sposobnost materijala da, nakon primjene unutar organizma domaćina, obavlja određenu funkciju, a da pri tome ne izaziva patološke promjene domaćina (1).

Usna šupljina (lat. *cavum oris*) je početni dio probavnoga sustava. Obložena je sluznicom koja u kontinuitetu prelazi sa sluznice usana i obraza na sluznicu vanjske strane gingive zubi gornje i donje čeljusti. Budući da u u usnoj šupljini nalazimo kompleksan sastav, kao što su slina u kojoj nalazimo brojne enzime, proteine, hormone, deskvamirane epitelne stanice, krvne elemente, mikroorganizme, a također i različite elektrokemijske, termičke, fizikalne utjecaje te promjene pH, dentalni materijali u usnoj šupljini su izloženi stalnoj degradaciji, što može dovesti do oslobađanja njihovih sastojaka (78, 87, 92–96). Shodno tomu, stanice usne šupljine neprestano su izložene topljivim komponentama dentalnih materijala te su potrebna stalna *ex vivo* i *in vivo* istraživanja biokompatibilnosti svih dentalnih materijala koji se primjenjuju u usnoj šupljini, pri čemu je, pogotovo *in vivo*, iznimno teško standardizirati uvjete istraživanja (1, 115, 118–121, 134–138). Pojedini autori (38, 41) opisuju brojne

biološke, demografske i ekološke čimbenike te čimbenike vezane za stil života, a koji mogu ometati analizu toksičnosti genotoksina. Među njima se posebno naglašava utjecaj nekih medicinskih učinaka (zračenje, medikamenti i ostale kemikalije), nedostatak nekih mikronutrijenata te pored genetskih čimbenika i različiti drugi čimbenici (alkohol, pušenje, prehrana i dr.).

Mjerenje pojavnosti mikronukleusa vrlo je često korišten test u procjeni citotoksičnih i genotoksičnih učinaka pojedinih biomaterijala. Za razliku od primarnog oštećenja koji registrira komet test, prisutnost mikronukleusa pokazuje nepopravljivu genomsku nestabilnost. Ključne prednosti mikronukleus testa su njegova jednostavnost bodovanja, ograničeni troškovi te ono što je najviše bitno, vrijednost rezultata dobivenog iz bodovanja velikog broja stanica (41, 62, 68). Do sada su mnoga istraživanja u svom radu koristila mikronukleus testom kako bi procijenila genotoksičnost dentalnih materijala (44–57). Mikronukleus test na oljuštenim bukalnim epitelnim stanicama omogućuje procjenu citotoksičnog i genotoksičnog učinka amalgamskih i kompozitnih materijala izravno u ciljnom tkivu (56). Prema regulaciji Europske Unije od srpnja 2018. godine zubni amalgam ne bi se smio primjenjivati kod djece mlađe od 15 godina, trudnica i dojilja te kod osoba koji imaju određenih zdravstvenih tegoba na koje bi mogao utjecati unos dentalnog amalgama u njihov organizam. Za kompozitne materijale još nema posebnih preporuka iako su već u tijeku znanstvene rasprave o biokompatibilnosti ovog materijala, no još ne postoje kliničke preporuke (139, 140). Različite *in vitro* i *ex vivo* studije pokazuju da i amalgamske restauracije koje sadrže živu i zubni materijali na bazi kompozitnih smola uzrokuju pogoršanje stanične pro i antioksidativne redoks ravnoteže. Sposobnost restorativnih zubnih ispuna da izazovu genotoksičnost procijenjena je primjenom različitih testova (1, 41, 24). Budući da su stanice oralne sluznice izravno izložene dentalnim materijalima, one su na udaru prvog prolaza potencijalnih štetnih učinaka ovih iatrogenih ksenobiotika. Oralna sluznica izložena je visokoj razini dentalnih restorativnih materijala kao rezultat utjecaja pH sline, sile četkanja, navika žvakanja i drugih čimbenika, kao što su bakterijska korozija i termičke promjene. Pored toga, genotoksični učinak u epitelnim stanicama može uključivati veći rizik budući da njihov visok indeks replikacije potiče proces karcinogeneze (41, 78, 87, 94–96).

Kompozitni materijali sadrže anorganske i organske komponente u različitim omjerima, ovisno o proizvođaču. Biokompatibilnost kompozita, uglavnom, ovisi o kemijskom sastavu smolaste matrice. Organska matrica kompozita izvor je komponenti koje se otpuštaju u okolinu te pokazuju biološku aktivnost u organizmu. Mnoga istraživanja su pokazale da se u

usnu šupljinu otpušta preko trideset različitih kemikalija iz ispuna, čak i nakon završene polimerizacije (1, 92–96). Kompozitni materijali mogu otpustiti monomere, različite spojeve dodane radi postizanja karakteristika kompozitnih materijala te čestice punila i za vrijeme postavljanja ispuna i nakon toga. U kliničkim uvjetima kompoziti nikada nisu u potpunosti polimerizirani (77, 156). Monomeri mogu biti otpušteni iz kompozitnih ispuna djelovanjem mehaničkog stresa, žvakanjem, erozijom te uslijed starenja jer starenjem kompozitni ispun postaje porozan i podložan apsorpciji vode i kemijsko/enzimatskoj razgradnji. Citotoksičnost i genotoksičnost kompozita, uglavnom, ovisi o kemijskom sastavu organske komponente. Brojna istraživanja navode da se iz kompozita najčešće otpušta HEMA, a potom TEGDMA, UDMA i Bis-GMA (63). Dentalni amalgam slitina je žive s jednom ili više kovina, čiji je sastav strogo određen i kontroliran. Dentalni amalgam je mješavina metala koja se sastoji od tekuće (elementarne) žive i praha sastavljenog od srebra, kositra i bakra, kojima se može dodati cink, zlato, platina, paladij, nikal i dr. Amalgamski ispuni, kao i svi drugi dentalni materijali, sudjeluju u zbivanjima u usnoj šupljini, pri čemu su izloženi kemijskim, biološkim, mehaničkim, električkim i toplinskim silama. Uslijed toga dolazi do trošenja i pucanja korozijom oštećenog ispuna, što može dovesti do oslobađanja žive. Do izloženosti Hg<sup>0</sup> ili iHg može doći udisanjem tijekom radnih aktivnosti, kada se Hg ili njegovi spojevi proizvode, koriste u procesima ili ugrađuju u proizvode. Ranije je profesionalna izloženost mogla biti i u stomatološkim klinikama s neučinkovitim rukovanjem i skladištenjem proizvoda na bazi Hg (uglavnom se misli na dentalni amalgam) (59, 76, 134, 141).

Do izlaganja živi može doći i zbog prisutnosti zubnih amalgama u usnoj šupljini, no, literatura navodi da se puno više žive unosi u organizam iz hrane, nekih lijekova, kozmetike te udisanjem iz atmosfere (134, 141). Brojna istraživanja navode da amalgamski ispun može imati utjecaj na okolna tkiva (pulpu, sluznicu usne šupljine i parodont) i udaljene organe i sustave (bubrege, živčani sustav, krvožilni sustav, imunološki sustav i probavni sustav) (59,134,141). Dakle, kao što je rečeno, kompozitni materijali i dentalni amalgami, kao i svi biomaterijali moraju biti biokompatibilni. Biokompatibilnost je sposobnost materijala da izazove odgovarajući biološki odgovor nakon specifične primjene. To je složen i dinamičan proces koji se može mijenjati tijekom vremena zbog interakcije između okoline domaćina (pacijenta), materijala i funkcije koju treba obavljati no, podrazumijeva se da nakon primjene unutar organizma domaćina, obavlja određenu funkciju te stimulira povoljan odgovor domaćina. Biokompatibilnost se mjeri *ex vivo*, odnosno *in vitro* testovima, pokusima na životinjama i *in vivo* ispitivanjima (1–3, 24). U svrhu kliničkih *in vivo* testova vrlo često se

primjenjuju komet test i mikronukleus test. Analiza mikronukleusa u oljuštenim bukalnim stanicama koristan je i minimalno invazivan postupak za praćenje genetskih oštećenja kod ljudi. Mikronukleus testom se na bukalnim stanicama od 1980-ih godina procjenjuje citotoksični i genotoksični utjecaj okoliša, profesionalne izloženosti, različitih životnih čimbenika, prehrambenih navika, raznih bolesti, kao i utjecaj raznih vrsta dentalnih materijala. Genomska šteta je vjerojatno najvažnija osnova i uzrok razvojnih i degenerativnih bolesti, stoga je neophodno imati pouzdane i relevantne minimalno invazivne biomarkere za poboljšanje provedbe biomonitoringa, dijagnostiku i liječenje bolesti izazvanih ili povezanih s genetskim oštećenjem. Mikronukleus analiza oljuštenih bukalnih stanica je potencijalno izvrstan kandidat kao takav biomarker. Sakupljanje bukalnih stanica vjerojatno je najmanje invazivno dostupna metoda za mjerenje oštećenja DNK-a kod ljudi, posebno u usporedbi s uzimanjem uzoraka krvi za analizu limfocita i eritrocita ili biopsije tkiva. Oralni epitel sastoji se od četiriju slojeva koji uključuju laminu propriu, bazalni stanični sloj, sloj trnastih stanica te keratinizirani sloj na površini. Oralni epitel održava se neprestanim obnavljanjem stanica pri čemu nove stanice proizvedene u bazalnom sloju mitozom migriraju na površinu zamjenjujući one koje su odljuštene. Bazalni sloj sadrži stanice koje mogu izraziti genetsko oštećenje (lom kromosoma ili njegov gubitak) kao mikronukleusi (male kromatinske tvorbe slične jezgri smještene u citoplazmi) i tijekom nuklearne diobe. Stanice kćeri, koje mogu ili ne moraju sadržavati MN, na kraju se diferenciraju u trnasti dio staničnog sloja i preko keratiniziranog površinskog sloja se ljušte u usnu šupljinu. Neke od tih stanica mogu degenerirati u stanice s kondenziranim kromatinom, fragmentiranim jezgrama (kariorektni stanice), piknotičke jezgre ili potpuno gube svoj nuklearni material (kariolitičke ili "duh" stanice). U rijetkim slučajevima, neke stanice mogu biti blokirane kao binuklearne ili mogu pokazivati jezgrene pupoljke (također poznat kao "slomljena jajašca"/ "broken eggs" u bukalnim stanicama. Ovi biomarkeri oštećenja genoma (npr. mikronuklei, nuklearni pupoljci) i stanična smrt (npr. apoptoza, karioliza) mogu biti opaženi na limfocitima i bukalnim stanicama, te stoga mogu pružiti sveobuhvatniju procjenu oštećenja genoma u kontekstu citotoksičnosti i citostatskih učinaka različitih materijala i čimbenika. Prisutnost mikronuklea u stanici pokazatelj je postojanja aberacija u prethodnoj diobi stanice. U uvjetima *in vitro* i *in vivo*, učestalost mikronukleusa se može koristiti kao kvantitativna mjera strukturnih i numeričkih aberacija kromosoma u stanicama pod utjecajem različitih genotoksičnih tvari. Budući oralne epitelne često stanice predstavljaju ciljne stanice za rane genotoksične događaje izazvane kancerogenim agensima koji ulaze u tijelo udisanjem i gutanjem, te za one koje se primjenjuju u terapijske svrhe unutar usne šupljine, za njih je vrlo pogodan mikronukleusni

test jer je jedan od najmanje invazivnih testova kojim se mogu mjeriti oštećenja DNK-a kod ljudi (1–3, 24, 41). Kao što je već spomenuti, u suvremenoj dentalnoj medicini pomoću *in vivo* mikronukleus testova na epitelnim stanicama usne šupljine SE vrlo često procjenjuje utjecaj različitih dentalnih sredstava, materijala te dijagnostičkih i terapijskih postupaka koji se primjenjuju tijekom preventivnih i terapijskih postupaka u dentalnih pacijenata (44–57).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su statistički značajne razlike između skupina ispitanika bez ispuna, s amalgamskim ispunima i s kompozitnim ispunima za sljedeće parametre mikronukelus testa: broj mikronuklea ( $p=0,006$ ), broj pupova ( $p<0,001$ ), broj binuklearnih stanica ( $p<0,001$ ), broj nukleoplazmatskih mostova ( $p<0,001$ ) i broj karioliza ( $p=0,003$ ). Za ostale parametre mikronukleus testa (morfološke promjene tipa *broken egg*, piknoza, karioreksija, kondenzirani kromatin) nisu opažene statistički značajne razlike među skupinama.

Za parametre mikronukleus testa kod kojih je Kruskal-Wallis *omnibus* test pokazao statistički značajne rezultate na ukupnoj razini značajnosti od 0,05, provedeni su *post-hoc* testovi višestrukih usporedbi uz Bonferroni prilagodbu, a statistički značajne razlike spomenutih višestrukih usporedbi prikazane su odgovarajućim okvirnim dijagramima (*boxplots*). Ovi dijagrami predstavljaju rezultate parametara mikronukleus testa za usporedbe između triju skupina ispitanika (bez ispuna, s amalgamskim ispunima i s kompozitnim ispunima).

Iz rezultata je vidljivo da je broj mikronuklea bio statistički značajno veći u skupini ispitanika s amalgamskim ispunima u usporedbi sa skupinom bez ispuna ( $p=0,006$ ). Marginalno značajno povišenje broja mikronuklea također je opaženo u skupini s kompozitnim ispunima u usporedbi sa skupinom bez ispuna ( $p=0,050$ ). Pritom se skupine s amalgamskim ispunima i kompozitnim ispunima međusobno nisu statistički značajno razlikovale. Skupina s kompozitnim ispunima pokazala je najveću varijabilnosti rezultata među ispitanicima unutar skupine, što se opaža usporedbom njezinog interkvartilnog raspona s interkvartilnim rasponima preostalih dviju skupina. Tako velika varijabilnost unutar skupine s kompozitnim ispunima također je razlog marginalno značajnog rezultata ( $p=0,050$ ) u usporedbi sa skupinom bez ispuna. Visoka varijabilnost rezultata mikronukelus testa uobičajena je u kliničkim okolnostima, s obzirom na visoku osjetljivost testa i nemogućnosti potpune kontrole navika pacijenata koje se mogu odraziti na rezultate. Međutim, potrebno je naglasiti kako su unatoč visokoj varijabilnosti unutar skupina rezultati pokazali statistički značajne učinke amalgamskih i kompozitnih ispuna na morfološke promjene stanica oralne sluznice indikativne za oštećenje genoma.



Jezgreni pupovi su morfološka promjena koja služi kao indikator oštećenja genetskog materijala koji je zbog težih oštećenja izdvojen iz genoma jezgre i putem egzocitoze se izbacuje iz stanice. Vezikula s tako izdvojenim genetskim materijalom prvo se spaja s jezgrenom membranom kako bi se izbacila iz citoplazme i u toj fazi se opaža se kao jezgreni pup. Rezultati ovog istraživanja za jezgrene pupove pokazuju da je skupina s amalgamskim ispunima imala statistički značajno veći broj ove morfološke promjene u usporedbi sa skupinom bez ispuna ( $p < 0,001$ ) i skupinom s kompozitnim ispunima ( $p = 0,003$ ). Međutim, skupina s kompozitnim ispunima nije se statistički značajno razlikovala od skupine bez ispuna. Ispitanici s ispunima (amalgamskim i kompozitnim) imali su veće interkvartilne raspone od skupine bez ispuna, što je posljedica varijabilnosti odgovora stanica na izlaganje genotoksičnim čimbenicima, ali i činjenice da su među ispitanicima unutar iste skupine postojale razlike u intenzitetu izloženosti genotoksičnih čimbenika, odnosno postojali su različiti brojevi ploha ispuna koje se mogu smatrati „reaktivnom površinom“ zaslužnom za pretpostavljeni genotoksični učinak. Za morfološku promjenu tipa *broken egg* nisu opažene statistički značajne razlike među skupinama ispitanika bez ispuna, s amalgamskim ispunima i s kompozitnim ispunima. Nedostatak statistički značajnog učinka može se pripisati razmjerno visokoj varijabilnosti vrijednosti morfološke promjene tipa *broken egg* unutar svake skupine ispitanika te malih razlika među skupinama. Za razliku od prethodno diskutiranih promjena mikronukleus testa (broj mikronuklea i jezgrenih pupova) kod kojih je varijabilnost podataka bila veća u skupinama ispitanika s ispunima (bilo amalgamskim, bilo kompozitnim) nego kod ispitanika bez ispuna, kod morfološke promjene tipa *broken egg* varijabilnost unutar skupine predstavljena interkvartilnim rasponom bila je najviša u skupini ispitanika bez ispuna. U okviru podataka prikupljenih u ovom istraživanju i s obzirom na ograničenja vezana uz nemogućnost stroge kontrole navika pacijenata u kliničkom istraživanju, nije moguće dublje razmatrati moguće uzroke ove pojave.

Binuklearne stanice su morfološka anomalija do koje dolazi zbog oštećenja citoskeleta i posljedično nepravilnog odvijanja citokineze zbog poremećaja mikrotubula diobenog vretena. Rezultati broja binuklearnih stanica pokazali su statistički značajne razlike između sve tri skupine ispitanika. Može se napomenuti i kako je ovaj parametar mikronukleus testa pokazao najveću statističku snagu u višestrukim usporedbama i stoga je jedini kod kojeg su značajne razlike detektirane između svih skupina ispitanika. Dobivene p-vrijednosti bile su visoko značajne za usporedbu skupine s amalgamskim ispunima i skupine bez ispuna ( $p < 0,001$ ), odnosno za usporedbu skupine s amalgamskim ispunima i skupine s kompozitnim ispunima ( $p < 0,001$ ). Značajna razlika opažena je i između skupine bez ispuna i skupine s kompozitnim

ispunima ( $p=0,029$ ). U ovom istraživanju statistički značajno veći broj nukleoplazmatskih mostova bio je u skupini ispitanika s amalgamskim ispunima u usporedbi sa skupinom bez ispuna ( $p<0,001$ ) i skupinom s kompozitnim ispunima ( $p<0,001$ ). Nukleoplazmatski mostovi su morfološka promjena povezana s oštećenjima telomera koje dovodi do poremećaja u strukturi kromosoma i njihovoj organizaciji tijekom anafaze. Pojava ove morfološke karakteristike ukazuje na značajnija oštećenja genoma. Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti kako su takva oštećenja bila statistički značajno učestalija kod ispitanika s amalgamskim ispunima nego kod ispitanika s kompozitnim ispunima. Također, nepostojanje statistički značajne razlike između negativne kontrolne skupine bez ispuna i skupine s kompozitnim ispunima sugerira da prisutnost kompozitnih ispuna nije dovelo do opsežnijih oštećenja genoma.

Rezultati za piknozu, koja predstavlja morfološku manifestaciju kondenzacije kromatina u jezgri stanice u kojoj je u tijeku stanična smrt mehanizmom nekroze ili apoptoze, nisu pokazali statistički značajne razlike među skupinama ispitanika bez ispuna, s amalgamskim ispunima i s kompozitnim ispunima. Statistički slične vrijednosti u svim skupinama pokazuju kako prisutnost amalgamskih i kompozitnih ispuna nije dovela do mjerljivog porasta ove morfološke anomalije.

Parametri koji ukazuju na citotoksičnost stanica (broj piknoza, broj karioliza, broj karioreksija i broj morfoloških promjena tipa kondenzirani kromatin) pokazuju kako prisutnost amalgamskih i kompozitnih ispuna nije dovela do mjerljivog porasta ovih morfoloških anomalija.

Rezultati za kariolizu pokazuju kako je broj karioliza u skupini bez ispuna bio statistički značajno veći nego u skupini s amalgamskim ispunima ( $p=0,015$ ) i skupini s kompozitnim ispunima ( $p=0,006$ ), uz nepostojanje statistički značajne razlike između dviju skupina s ispunima. Karioliza se smatra morfološkom manifestacijom stanične smrti mehanizmom nekroze, stoga dobiveni rezultati ukazuju da je nekroza bila značajno učestalija u negativnoj kontrolnoj skupini. Ovakav neočekivani rezultat može predstavljati eksperimentalni artefakt, prije svega uzrokovan uzorkovanjem stanica u kliničkim uvjetima s obzirom da se nekroza može potaknuti mehaničkom traumom do koje neizbježno dolazi prikupljanjem stanica s površine sluznice.

Broj karioreksija nije pokazao statistički značajne razlike između skupina ispitanika bez ispuna, s amalgamskim ispunima i s kompozitnim ispunima. Karioreksija je morfološka manifestacija apoptoze, koja je prema rezultatima bila jednako učestala kod sve tri skupine ispitanika bez obzira na prisustvo ili odsustvo ispuna, odnosno materijala od kojeg su ispuni

bili izrađeni. Sličan izostanak statistički značajnih razlika među skupinama ispitanika bio je i za morfološku promjenu tipa kondenzirani kromatin.

U studiji koju su proveli Visalli i sur. (55) procijenili su genotoksično oštećenje stanica oralne sluznice ispitanika koji su nosili i amalgamske i kompozitne ispune. Uočili su da je učestalost MN u stanicama oralne sluznice značajno i dosljedno viša u ispitanika s restorativnim ispunom nego u ispitanika bez ispuna. Međutim, u njihovom istraživanju, na povećanje učestalosti MN u stanicama oralne sluznice nije utjecala vrsta restorativnog materijala.

Reichl i sur. (56) su na temelju svoje *in vitro* studije o citotoksičnosti dentalnih kompozitnih monomera i amalgamske komponente  $Hg^{2+}$  u ljudskim gingivalnim fibroblastima zaključili da je živa iz amalgama toksičnija od kompozitnih komponenti.

Ahmed i sur. (157), na temelju rezultata svojih istraživanja navode kako kod ispitanika s kompozitnim ispunima citotoksične promjene na humanim bukalnim i labijalnim stanicama postaju izražajnije što je ispun dulje u usnoj šupljini, dok su se na istim stanicama nositelja amalgamskih ispuna najveća toksična oštećenja uočila u prvih nekoliko sati nakon postavljanja ispuna

Mary i sur. (76) su u svom istraživanju pomoću MN testa procjenjivali genotoksični utjecaj amalgamskih i kompozitnih ispuna na oralne epitelne stanice nositelja navedenih zubnih ispuna. Autori navode kako je u njihovom istraživanju prosječan broj MN u stanicama ispitanika s amalgamskim ispunima bio statistički značajno viši u usporedbi sa stanicama ispitanika s kompozitnim ispunima. Prosječni broj MN u stanicama ispitanika s amalgamskim i kompozitnim ispunima bio je statistički značajno viši u odnosu na stanice ispitanika kontrolne skupine, koji su bili bez ispuna.

Rezultati regresijske analize povezanosti parametara mikronukleus testa kao nezavisne varijable i broja amalgamskih te kompozitnih ploha kao prediktorskih varijabli općenito su pokazali niske vrijednosti  $R^2$  što ukazuje na činjenicu da se razmjerno mali udio ukupne varijance može objasniti prediktorskim varijablama, odnosno brojem amalgamskih/kompozitnih ploha. Unatoč niskim vrijednostima  $R^2$ , regresijski rezultati su bili statistički značajni za pojedine parametre mikronukleus testa. Među svim ispitivanim parametrima, ističe se broj pupova za koji je regresija pokazala statističku značajnost s brojem ploha za obje vrste ispuna, tj. amalgamske ( $p=0,003$ ) i kompozitne ( $p=0,006$ ) s beta-koeficijentima od 0,237 i 0,221. Preostali parametri mikronukleus testa pokazali su statistički značajnu povezanost s brojem ploha samo jedne vrste ispuna (ili amalgamskih ili kompozitnih), kako slijedi: broj mikronuklea s brojem kompozitnih ploha ( $p=0,005$ ,  $\beta=0,233$ ), broj binuklearnih stanica s brojem amalgamskih ploha ( $p<0,001$ ,  $\beta=0,394$ ),

broj nukleoplazmatskih mostova s brojem amalgamskih ploha ( $p < 0,001$ ,  $\beta = 0,451$ ), broj karioreksija s brojem kompozitnih ploha ( $p = 0,009$ ,  $\beta = 0,219$ ) i kondenzirani kromatin s brojem kompozitnih ploha ( $p = 0,009$ ,  $\beta = 0,220$ ). Ovakvi rezultati pokazuju kako je učestalost morfoloških promjena koje se procjenjuju mikronukleus testom povezana s intenzitetom izloženosti restaurativnim materijalima kvantificiranim pomoću broja ploha ispuna, pri čemu su određeni parametri bili osjetljivi od drugih. Valja napomenuti kako je broj ploha ispuna razmjerno grub i neprecizan kvantitativni parametar, odnosno kako bi se preciznijim mjerenjem površine ispuna kao mjere izloženosti potencijalno genotoksičnim čimbenicima vjerojatno opazile izraženije povezanosti.

Navedeni rezultati sukladni su nalazima prethodnih istraživanja (55, 76, 157,) koji navode kako je veća razina oštećenja DNA-e u stanicama bila u korelaciji s većim brojem ispuna.

Multivarijatna regresijska analiza provedena je kako bi se utvrdile povezanosti potencijalnih genotoksičnih čimbenika vezanih uz životni stil pacijenata i parametara mikronukleus testa. Cilj takve analize bio je ispitati koje su od prehrambenih i drugih navika ispitanika mogle utjecati na ishode mikronukleus testa, pored utjecaja prethodno diskutiranih glavnih čimbenika vezanih uz prisustvo amalgamskih i kompozitnih ispuna. Brojni biološki, ekološki i demografskih čimbenici mogu ometati *in vivo* istraživanje. Čimbenici načina života koji se najčešće povezuju s genetskim oštećenjima uključuju pušenje, konzumaciju alkohola, način prehrane, nedostatak vitamina i suplemenata (41).

Učinak nekih navika poput pušenja i konzumacije alkohola nije mogao biti procijenjen regresijskim modelom jer velika većina ispitanika nije pušila (147 od 150 ispitanika, tj. 98 %), niti je konzumirala alkohol (144 od 150 ispitanika, tj. 96 %), stoga podaci o pušenju i konzumaciji alkohola nisu bili primjenjivi za uključivanje u regresijsku analizu.

Iako rezultati većeg broja istraživanja (17, 18, 41, 55) o utjecaju pušenja i alkohola na učestalost pojavljivanja stanica s mikronukleusom nisu otkrili značajan učinak pušenja i alkohola na pojavu mikronuklea u stanicama sluznice usne šupljine, ipak pojedina istraživanja (158) opisuju utjecaj sinergističke interakcije konzumacije alkohola i pušenja na oštećenje bukalnih stanica.

U ovom istraživanju pojedini podaci o kojima su ispitanici davali opisne odgovore s nejasno definiranim i međusobno preklapajućim kategorijama nisu uključeni u regresijski model, dok su preostali podaci prikupljeni upitnicima za samoprocjenu koji su bili pseudo-intervalni, odnosno kategorijski s međusobno isključivim i jasno razgraničenim kategorijama

upotrijebljeni za kao prediktorske varijable. Na taj način su za svaki od devet parametara mikronukleus testa kao prediktori ispitani sljedeći podaci iz upitnika: dijagnostičko zračenje (rtg), lijekovi, konzumacija suhomesnate hrane, konzumacija kuhane hrane, konzumacija pečene hrane, učestalost konzumacije mesa, učestalost konzumacije pečenog mesa, učestalost konzumacije suhomesnate hrane, konzumacija povrća, učestalost konzumacije povrća, učestalost konzumacije voća, učestalost konzumacije kave, učestalost konzumacije čaja i učestalost konzumacije gaziranih pića.

Glavni rezultati regresijskih analiza, odnosno standardizirani koeficijenti  $\beta$ , t-vrijednosti i p-vrijednosti prikazani su za regresijske modele sa sljedećim zavisnim varijablama: broj mikronuklea, broj pupova, broj morfoloških promjena tipa *broken egg*, broj binuklearnih stanica, broj nukleoplazmatskih mostova, broj piknoza, broj karioliza, broj karioreksija i broj morfoloških promjena tipa kondenzirani kromatin. Reorganizacijom redoslijeda pojedinih prediktora prema padajućim vrijednostima test-statistike t, odnosno odgovarajućim porastom p-vrijednosti, dobiveni su Pareto dijagrami koji olakšavaju vizualizaciju relativnih utjecaja prediktorskih varijabli na parametre mikronukleus testa. Pri tome se statistički značajnim mogu smatrati samo prediktori s t-vrijednostima većim od graničnih vrijednosti definiranih na razini značajnosti od 0,05, a koje su na Pareto dijagramima prikazane kao isprekidane crvene okomite crte. Tako se na Pareto dijagramu za broj mikronuklea opaža statistički značajan učinak dijagnostičkog zračenja, dok ostali prediktori nisu pokazali značajan učinak. Regresijski model za broj pupova pokazao je statistički značajan učinak većeg broja prediktora, naime, u tom su modelu osim dijagnostičkog zračenja značajni prediktori bili i konzumacija kuhane hrane, konzumacija suhomesnate hrane i konzumacija pečene hrane. Sa četiri statistički značajna prediktora, broj pupova se u regresijskim modelima pokazao kao parametar mikronukleus testa koji je bio najosjetljiviji na navike ispitanika.

Regresijski model za morfološke promjene tipa *broken egg* pokazao je učestalost konzumacije pečenog mesa i učestalost konzumacije voća kao statistički značajne prediktore za pojavu ove morfološke anomalije. Suprotni predznaci koeficijenata beta (0.275 za učestalost konzumacije pečenog mesa, odnosno -0.191 za učestalost konzumacije voća) označavaju da su ova dva čimbenika djelovala u suprotnim smjerovima. Pozitivan predznak koeficijenta beta za učestalost konzumacije pečenog mesa u skladu je s poznatim genotoksičnim učinkom ove vrste hrane, dok negativni predznak koeficijenta beta za učestalost konzumacije voća ukazuje na mogući protektivni učinak, vjerojatno posredovan antioksidansima iz voća koji štite od oštećenja genoma.

Pozitivan predznak koeficijenta beta za učestalost konzumacije pečenog mesa u skladu je s poznatim genotoksičnim učinkom ove vrste hrane, dok negativni predznak koeficijenta beta za učestalost konzumacije voća ukazuje na mogući protektivni učinak, vjerojatno posredovan antioksidansima iz voća koji štite od oštećenja genoma. Pojedina istraživanja (41, 159, 160) ukazuju kako niz mikronutrijenata, uključujući beta-karoten i neke druge vitamine te N-acetilcistein značajno smanjuju razine MN u zdravih pušača, kao i u osoba s prekanceroznim lezijama.

Regresijski model za ovisnost broja binuklearnih stanica o navikama ispitanika nije pokazao statističku značajnost niti za jednu prediktorsku varijablu. S obzirom da se broj binuklearnih stanica pokazao kao najosjetljiviji među svim drugim parametrima mikronukleus na genotoksične čimbenike porijeklom iz amalgamskih i kompozitnih ispuna u prethodno opisanim analizama za usporedbe između skupina ispitanika s različitim vrstama ispuna, zanimljivo je primijetiti kako uopće nije bio osjetljiv na navike ispitanika. Visoka diskriminatorna vrijednost broja binuklearnih stanica na izloženost potencijalnim štetnim tvarima iz restaurativnih materijala i istovremeno relativna neosjetljivost na varijabilnost u navikama i stilu života ispitanika mogli bi omogućiti visoku osjetljivost i specifičnost ovog parametra u budućim istraživanjima genotoksičnosti restaurativnih materijala.

Broj nukleoplazmatskih mostova prema rezultatima regresijskog modela pokazao je statistički značajan učinak prediktora dijagnostičko zračenje i učestalost konzumacije kave. Učestalost konzumacije kave također je bio statistički značajni prediktor u regresijskom modelu za broj piknoza. Dobiveni rezultati pokazuju da se genotoksični učinak konzumacije kave odrazio na dva parametra mikronukleus testa. Jedini čimbenik stila života ispitanika koji je statistički značajno utjecao na veći broj parametara od učestalosti konzumacije kave bilo je izlaganje dijagnostičkom zračenju, koje je bilo značajni prediktor kod tri parametra mikronukleus testa: broj mikronuklea, broj pupova i broj nukleoplazmatskih mostova. Ionizirajuće zračenje ima važnu ulogu u dijagnostici i liječenju, no može prouzročiti i oštećenja DNA. Pojedina istraživanja (51) ne nalaze statistički značajno povećanje MN kod pacijenata izloženih X zrakama i CBCT (Cone-beam computed tomography) uz efektivnu dozu od 12mSv, međutim, navode povećanje MN parametara koji ukazuju na citotoksičnost (karioreksija, piknoza, karioliza).

U regresijskom modelu za broj karioliza ni jedna od prediktorskih varijabli nije pokazala statistički značajan učinak, dok je kod modela za karioreksiju učestalost konzumacije voća

pokazalo protektivni učinak s negativnim koeficijentom beta od -0.327. Uz prethodno spomenuti pozitivni učinak konzumacije voća na smanjenje učestalosti morfološke promjene tipa *broken egg*, ovakav nalaz dodatno potvrđuje protektivni učinak konzumacije voća.

Regresijski model za morfološke promjene tipa kondenzirani kromatin nije pokazao statistički značajan učinak ni za jednu prediktorsku varijablu. Dobiveni rezultati odgovaraju rezultatima sličnih istraživanja (17, 41).





Na temelju dobivenih rezultata, mogu se donijeti slijedeći zaključci:

Dobiveni rezultati ukazuju da je broj mikronuklea bio je statistički značajno veći u skupini ispitanika s amalgamskim ispunima i kompozitnim ispunima u usporedbi sa skupinom bez ispuna. Rezultati za jezgrene pupove, za broj binuklearnih stanica i broj nukleoplazmatskih mostova pokazuju da je skupina s amalgamskim ispunima imala statistički značajno veći broj ovih promjena u usporedbi sa ostalim skupinama. Broj karioliza u skupini bez ispuna bio je statistički značajno veći nego u skupini s amalgamskim ispunima i skupini s kompozitnim ispunima.

Na temelju rezultata regresijske analize povezanosti parametara mikronukleus testa i broja amalgamskih te kompozitnih ploha može se zaključiti da je pregledom bukalnih stanice kod svih ispitanika uočen određeni stupanj genotoksičnosti. Pritom su bukalne stanice ispitanika s amalgamskim ispunima pokazali najviši stupanj genotoksičnosti, potom onih s kompozitnim ispunima i najmanje bukalne stanice pacijenata bez ispuna.

Parametri koji ukazuju na citotoksičnost stanica nisu bili povišeni ni kod ispitanika s kompozitnim niti amalgamskim ispunima.

Na temelju multivarijatne regresijske analize, koja je provedena kako bi se utvrdile povezanosti potencijalnih genotoksičnih čimbenika vezanih za životni stil pacijenata i parametara mikronukleus testa, može se zaključiti da su određene dijagnostičke pretrage, te prehrambene i druge navike ispitanika mogle utjecati na ishode mikronukleus testa, pored utjecaja amalgamskih i kompozitnih ispuna. Regresijski model za broj pupova pokazao je da je, s četiri statistički značajna prediktora, kao parametar mikronukleus testa, broj pupova bio najosjetljiviji na navike ispitanika. Dijagnostičko zračenje se odrazilo na tri, a pijenje kave na dva pokazatelja genotoksičnosti.

Zaključno se može reći kako su na stanice bukalne sluznice amalgamski ispuni pokazali genotoksični učinak, kompozitni ispuni su pokazali ograničeni genotoksični učinak, dok stupanj genotoksičnosti nije bio značajno povezan sa brojem ploha amalgamskih i kompozitnih ispuna u usnoj šupljini. Citotoksični učinak nije dokazan ni za amalgamske niti za kompozitne ispune.

Zbog ograničenog broja ispitanika koji su dobrovoljni sudjelovali u ovom istraživanju, dobiveni učinci materijala su indikativne vrijednosti te ih treba potvrditi na većoj studijskoj grupi tijekom dužeg vremenskog razdoblja.

Na temelju ovog istraživanja može se zaključiti da analiza mikronukleusa u oljuštenim bukalnim stanicama služi kao specifični biomarker genotoksičnosti za proučavanje genotoksičnih učinaka na stanice oralne sluznice. Dobiveni *in vivo* podaci upućuju na zaključak da restaurativni zubni ispuni, kojima je velik broj ljudi neprestano izložen tijekom dugog trajanja, uzrokuju oštećenje DNK-a lokalno, u usnoj šupljini, uslijed otpuštanja ili žive ili metakrilata. Naime, kompozitni i amalgamski ispuni ostaju dugo vremena u bliskom dodiru s tkivima usne šupljine (gingiva, pulpa, oralna sluznica) pri čemu može doći do degradacije materijala i otpuštanja aktivnih supstanci, stoga su buduća istraživanja njihove moguće citotoksičnosti i genotoksičnosti u uvjetima *in vivo* neophodna. Navedene činjenice sugeriraju da su potrebna dodatna istraživanja velikih razmjera u svrhu procjene citotoksičnih i genotoksičnih učinaka žive i metakrilata iz amalgamskih i kompozitnih ispuna na usnu šupljinu.



1. Schmalz GA-B, D. Biocompatibility of Dental Materials: Springer-Verlang Berlin Heidelberg; 2009.
2. Anusavice KJ. Phillips' science of dental materials. Philadelphia: Saunders; 2003.
3. Ratner BD. The Biocompatibility Manifesto: Biocompatibility for the twenty-first century. J Cardiovasc Transl Res. 2011;4:523-7.
4. Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. Materials. 2009;2(2):514-48.
5. Williams DF. Definitions in biomaterials. Amsterdam: Elsevier; 1987.
6. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. Int End J. 2003 Feb;36(2):75-85.
7. Schmalz G. Materials science: biological aspects. J Dent Res. 2002 Oct;81(10):660-3.
8. Elshahaw W. Biocompatibility. 2011. In: Advances in Ceramics - Electric and Magnetic Ceramics, Bioceramics, Ceramics and Environment [Internet]. InTech.
9. Schmalz G. Use of Cell-Cultures for Toxicity Testing of Dental Materials Advantages and Limitations. J Dent. 1994;22:S6-S11.
10. Franz A, Konig F, Anglmayer M, Rausch-Fan X, Gille G, Rausch WD, et al. Cytotoxic effects of packable and nonpackable dental composites. Dental Materials. 2003 Jul;19(5):382-92.
11. 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. Dental Materials:official publication of the Academy of Dental Materials. 1998 Nov;14(6):429-40.
12. Wataha JC, Lockwood PE, Bouillaguet S, Noda M. *In vitro* biological response to core and flowable dental restorative materials. Dental materials:official publication of the Academy of Dental Materials. 2003 Jan;19(1):25-31.
13. Hanks CT, Anderson M, Craig RG. Cytotoxic effects of dental cements on two cell culture systems. J Oral Pathol. 1981 Apr;10(2):101-12.
14. 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. Journal of Biomedical Materials Research. 1998Sep 5;41(3):474-80.

15. Prica D, Galić N, Želježić D, Prica A, Šegović S. Genotoksični potencijal dentinskih adheziva. *Acta Stomatol Croat.* 2007; 41(2):104-14.
16. Galić N, Prpić-Mehićić G, Prester LJ, Krnić Ž, Blanuša M, Erceg D. Elimination of mercury from amalgam in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2001; 15:1-4.
17. Tadin A, Galić N, Mladinić M, Marović D, Kovačić I, Želježić D. Genotoxicity in gingival cells of patients undergoing tooth restoration with two different dental composite materials. *Clin Oral Investig.* 2014; 18(1):87-96.
18. Tadin A, Marović D, Galić N, Kovačić I, Želježić D. Composite-induced toxicity in human gingival and pulp fibroblast cells. *Acta Odontol Scand.* 2014; 72(4):304-11.
19. 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. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics:official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics.* 2003 Dec;124(6):687-93.
20. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
21. Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG. Flow cytometry in the study of cell death. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2000 May-Jun;95(3):429-33.
22. Žlender V. Apoptosis-programmed cell death. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2003 Dec;54(4):267-74.
23. 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 Oct;32(7):645-52.
24. Saks M, Upreti S, Rajendra SV, Dang R. Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods. *Glob J Pharmaceut Sci.* 2017; 555575:1-6.
25. Rajić V. Biološka svojstva monomera u kompozitnim materijalima [dissertation]. Zagreb: Stomatološki fakultet Sveučilšta u Zagrebu; 2013.
26. Murray PE, Garcia Godoy C, Garcia Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007 May;12(3):E258-66.
27. 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 May;36(5):331-6.

28. 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. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*. 2008 Apr;19(4):1793-801.
29. Schmalz G, Schuster U, Nuetzel K, Schweikl H. An in vitro pulp chamber with three-dimensional cell cultures. *Journal of endodontics*. 1999 Jan;25(1):24-9.
30. Polyzois GL. In vitro evaluation of dental materials. *Clinical Materials*. 1994;16(1):21-60.
31. Szep S, Kunkel A, Ronge K, Heidemann D. Cytotoxicity of modern dentin adhesives-in vitro testing on gingival fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002;63(1):53-60.
32. Geurtsen W, Spahl W, Muller K, Leyhausen G. Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemicals. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1999;48(6):772-7.
33. 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. Mutation Res*. 1998 Feb;410(1):81-116.
34. Pelka M, Danzl C, Distler W, Petschelt A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. *J Dent*. 2000 Jul;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. *Journal of Endodontics*. 1980 Jan;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. *Dental Materials:official publication of the Academy of Dental Materials*. 2002 Jul;18(5):413-21.
37. 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. *Mutation Res*. 1999 Jul 16;428(1-2):271-83.

38. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Res.* 1993 Jan;285(1):35-44.
39. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental Health Perspectives.* 1993 Oct;101 Suppl 3:101-7.
40. Brozović G. Genotoksični i citotoksični učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na zdrave i stanice Ehrlich ascites tumora u Swiss albino miševa [dissertation]. Zagreb: Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2007.
41. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. 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.
42. Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1534.
43. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 1992;271(1):69-77.
44. Erdemir EO, Sengun A, Ulker M. Cytotoxicity of mouthrinses on epithelial cells by micronucleus test. *European Journal of Dentistry.* 2007Apr;1(2):80-5.
45. 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.* 2012Jun;16(3):813-20.
46. Vladislavić Zorica N, Franić I, Gavić L, Tadin A. Assessment of cytotoxic and genotoxic effect of whitening toothpastes in buccal mucosal cells. *Acta Stomatol Croat.* 2022; 56: 441-6.
47. Öztürk FY, S;Toy, E; Kurtoglu, E.L.: Küçük, E.B. Genotoxic effects of banding procedure with different orthodontic cements on human oral mucosa cells. *Turk J Med Sci.* 2012;42(Sup.1):1157-65.
48. Gavić L, Goršeta K, Buterin A, Glavina D, Želježić D, Tadin A. Assessment of Cytotoxic and Genotoxic Effect of Fissure Sealants in Buccal Epithelial Cells. *Acta Stomatol Croat.* 2021; 55(1):10-7.
49. 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. *Dentomaxillofacial Radiology*. 2007 Mar;36(3):168-71.
50. Pai AS, R.C.; Naik, R.M.; Guruprasad, Y. . Biomonitoring of genotoxic and cytotoxic effects of gingival epithelial cells exposed to digital panoramic radiography. *J Orofac Sci* 2012;4:124-8.
51. Ribeiro DA. Cytogenetic biomonitoring in oral mucosa cells following dental X-ray. *Dentomaxillofacial Radiology*. 2012; 41:181–4.
52. 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. *Genetics and Molecular Research:GMR*. 2008;7(4):1259-66.
53. Rezende E.F. M-CMC, Fonseca J.C., Ribeiro A.O. . Nuclear anomalies in the buccal cells of children under dental treatment. *RSBO*. 2011;8:182-8.
54. 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 Oncology*. 2008 Mar;44(3):220-6.
55. 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. *Archi Toxicol*. 2013 Jan;87(1):179-87.
56. Reichl FX, Simon S, Esters M, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, et al. Cytotoxicity of dental composite (co) monomers and the amalgam component Hg(2+) in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol*. 2006; 80:465–72.
57. Radović M, Gavić L, Jerković D, Želježić D, Puizina J, Srzentić I, Puizina-Mladinić E, Tadin A. Clinical Prospective Assessment of Dental Implants in Gingival Epithelial Cells. *Acta Stomatol Croat*. 2022; 56(3):222-34.
58. Šutalo J. Kompozitni materijali u stomatologiji. Zagreb: Grafički Zavod Hrvatske; 1998.
59. Tarle Z i suradnici. Restaurativna dentalna medicina. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
60. Peutzfeld A. Resin composites in dentistry: the monomer system. *Eur J Our Sci*. 1997; 105:97-116
61. Bergmann P, NoackMJ, Roulet N. Der Einfluß der Kavitätenform auf das Randverhalten von Klasse-I-Kompositfüllungen. *Dtsch Zahnärztl Z*.1990;45:663
62. Croll TP. Repair of defective class I composite resin restorations. *Quintess Int*. 1990;21:695



63. Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W. Eine Untersuchung zum Restmonomer- und Additiva-Gehalt verschiedener lighthärtender Hybridkomposite. *Dtsch Zahnärztl Z.* 1991;46:471
64. Ferracane JL. Resin composite – State of the art. *Dent Mater.* 2011;27:29-38.
65. Santini A, Gallegos IT, Felix CM. Photoinitiators in dentistry: a review. *Prim Dent J.* 2013;2(4):30-3.
66. Tarle Z, Klarić E. Kompozitni materijali i adhezijski sustavi. U: Mehulić K i suradnici. *Dentalni materijali.* Zagreb: Medicinska naklada; 2017.
67. Halvorson RH, Erikson RL, Davidson CL. An energy conversion relationship predictive of conversion profiles and depth of cure for resin-based composite. *Oper Dent.* 2003; 28:307-14.
68. Prediago J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Tome AR, Vanherle G, Lopes A. Morphological field emission-SEM study of effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. *Dent Mater.* 1996; 12:262-71.
69. Preston JD. Current status of shade selection and color matching. *Quintessence Int.* 1985; 16:47.
70. Tarle Z. Procjena polimerizacijskog učinka pulsno-laserskog izvora svjetlosti u uzorku kompozitnog materijala [dissertation]. Zagreb; Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 1995.
71. Ferracane JL. Elution of leachable components from composite. *J Oral Rehabil.* 1994; 21(4): 441-52.
72. Ferracane JL & Condon JR. Rate of elution of leachable component from composite. *Dental Materials.* 1990;6(4): 282-7.
73. Trujillo M, Newman SM& Stansburry JW. Use of near-IR to monitor the influence of external heating on dental composite photopolymerization. *Dental Materials.* 2004; 20(80): 766-77.
74. Knezevic A, Tarle Z, Meniga A, Sutalo J, Pichler G& Ristic M. Degree of conversion and temperature rise during polymerization of composite resin samples with blue diodes. *Journal of Oral Rehabilitation.* 2001;28(6):586-91.
75. Westphal GA, Asgari S, Schulz TG, Bünger J, Müller M, Hallier E. Thimerosal induces micronuclei in the cytochalasin B block micronucleus test with human lymphocytes. *Arch Toxicol.* 2003;77:50–5.

76. Jeslin Mary S, Girish L, Isaac JT, Sathyan P. Genotoxic Effects of Silver Amalgam and Composite Restorations: Micronuclei-Based Cohort and Case–Control Study in Oral Exfoliated Cells. *Contemp Clin Dent*. 2018 Apr-Jun; 9(2): 249–54.
77. 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. *Dental materials:official publication of the Academy of Dental Materials*. 2011 Aug;27(8):723-47.
78. 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 Mar;31(8):2010-4.
79. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res*. 1995 Sep;74(9):1602-6.
80. McKinney C, Rue T, Sathyanarayana S, Martin M, Seminario AL, DeRouen T. Dental sealants and restorations and urinary bisphenol A concentrations in children in the 2003–2004 National Health and Nutrition Examination Survey. *J Am Dent Assoc*. 2015;145:745–50.
81. Fung EY, Ewoldsen NO, St Germain HA, Marx DB, Miaw CL, Siew C, Chou HN, Gruninger SE, Meyer DM. Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant. *J Am Dent Assoc*. 2000;131:51–8.
82. Atabek D, Alacam A, Berkkan A. The Effect of Temperature on Bisphenol: An Elution from Dental Resins The Effect of Temperature on Bisphenol: An Elution from Dental Resins. *J Contem Den. Pract*. 2014;15:576–80.
83. Moreira MR, Matos LG, De Souza ID, Brigante TAV, Queiroz MEC, Romano FL, Nelson-Filho P, Matsumoto MAN. Bisphenol A release from orthodontic adhesives measured *in vitro* and *in vivo* with gas chromatography. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2017;151:477–83.
84. Tanaka M, Kawamoto T, Matsumoto H. Distribution of <sup>14</sup>C-bisphenol A in pregnant and newborn mice. *Dent Mater*. 2010;26:e181–e7.
85. Darmani H., Al-Hiyasat A.S. The effects of BIS-GMA and TEG-DMA on female mouse fertility. *Dent. Mater*. 2006;22:353–8.

86. Schwengberg S., Bohlen H., Kleinsasser N., Kehe K., Seiss M., Walther U.I., Hickel R., Reichl F.X. In vitro embryotoxicity assessment with dental restorative materials. *J. Dent.* 2005;**33**:49–55.
87. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: A review. *Clin. Oral Investig.* 2008;**12**:1–8.
88. He J, Kopperud HM. Preparation and characterization of Bis-GMA-free dental composites with dimethacrylate monomer derived from 9, 9-Bis [4-(2-hydroxyethoxy)phenyl] fluorene. *Dent Mater.* 2018;**34**:1003–13.
89. Kuan Y-H, Huang F-M, Lee S-S, Li Y-C, Chang Y-C. BisGma stimulates prostaglandin E2 production in macrophages via cyclooxygenase-2, cytosolic phospholipase A2, and mitogen-activated protein kinases family. *PLoS ONE.* 2013;**8**:e82942.
90. Kuan Y-H, Huang F-M, Li Y-C, Chang Y-C. Proinflammatory activation of macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate involved NFκB activation via PI3K/Akt pathway. *Food Chem. Toxicol.* 2012;**50**:4003–9.
91. Huang F-M, Chang Y-C, Lee S-S, Yeh C-H, Lee KG, Huang Y-C, Chen C-J, Chen W-Y, Pan P-H, Kuan Y-H. BisGMA-induced cytotoxicity and genotoxicity in macrophages are attenuated by wogonin via reduction of intrinsic caspase pathway activation. *Environ Toxicol.* 2014;**31**:176–84.
92. Schmalz G, Krifka S, Schweikl H. Toll-like Receptors, LPS, and Dental Monomers. *Adv. Dent. Res.* 2011;**23**:302–6.
93. Perduns R, Volk J, Schertl P, Leyhausen G, Geurtsen W. HEMA modulates the transcription of genes related to oxidative defense, inflammatory response and organization of the ECM in human oral cells. *Dent Mater.* 2019;**35**:501–10
94. Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harréus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M, Glas J, Reichl F-X. 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**:1762–70.
95. Wisniewska-Jarosinska M, Poplawski T, Chojnacki CJ, Pawlowska E, Krupa R, Szczepanska J, Blasiak J. Independent and combined cytotoxicity and genotoxicity of triethylene glycol dimethacrylate and urethane dimethacrylate. *Mol Biol Rep.* 2011;**38**:4603–11.

96. Kermanshahi S, Santerre J, Cvitkovitch D, Finer Y. Biodegradation of Resin-Dentin Interfaces Increases Bacterial Microleakage. *J Dent Res.* 2010;89:996–1001.
97. Schmalz G, Hickel R, van Landuyt KL, Reichl F-X. Scientific update on nanoparticles in dentistry. *Int Dent J.* 2018;68:299–305.
98. Schmalz G, Hickel R, van Landuyt KL, Reichl F-X. Nanoparticles in dentistry. *Dent Mater.* 2017;33:1298–314.
99. Noronha V, Paula AJ, Durán G, Galembeck A, Cogo-Muller K, Franz-Montan M, Durán N. Silver nanoparticles in dentistry. *Dent Mater.* 2017;33:1110–26.
100. Schubert A, Ziegler C, Bernhard A, Burgers R, Miosge N. Cytotoxic effects to mouse and human gingival fibroblasts of a nanohybrid ormocer versus dimethacrylate-based composites. *Clin Oral Investig.* 2019;23:133–9.
101. Yang Y, Reichl F-X., Shi J, He X, Hickel R, Högg C. Cytotoxicity and DNA double-strand breaks in human gingival fibroblasts exposed to eluates of dental composites. *Dent Mater.* 2018;34:201–8.
102. Styllou M, Reichl F-X, Styllou P, Urcan E, Rothmund L, Hickel R, Högg C, Scherthan H. Dental composite components induce DNA-damage and altered nuclear morphology in gingiva fibroblasts. *Dent Mater.* 2015;31:1335–44.
103. Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent.* 1996 Jan-Mar;24(1-2):125-8.
104. 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 Mar;27(9):1803-9.
105. Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *International Journal of Molecular Sciences.* 2009 Sep;10(9):3861-99.
106. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res.* 2001 Jul;80(7):1615-20.
107. 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. *Molecular Biology Reports.* 2012 Feb;39(2):1561-74.

108. Poplawski T, Loba K, Pawlowska E, Szczepanska J, Blasiak J. Genotoxicity of urethane dimethacrylate, a tooth restoration component. *Toxicology in vitro:an International Journal published in association with BIBRA*. 2010 Apr;24(3):854-62.
109. Nassiri MR, Hanks CT, Cameron MJ, Strawn SE, Craig RG. Application of flow cytometry to determine the cytotoxicity of urethane dimethacrylate in human cells. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1994 Feb;28(2):153-8.
110. 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 May;74(5):1162-7.
111. Al-Hiyasat AS, Darmani H, Milhem MM. Cytotoxicity evaluation of dental resin composites and their flowable derivatives. *Clinic Oral Investig*. 2005 Mar;9(1):21-5.
112. Mohsen NM, Craig RG, Hanks CT. Cytotoxicity of urethane dimethacrylate composites before and after aging and leaching. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998 Feb;39(2):252-60.
113. Schweikl H, Schmalz G, Rackebrandt K. The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutation Res*. 1998 Jul 8;415(1-2):119-30.
114. 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 Mar;32(3):229-34.
115. 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. *Dental Materials:official publication of the Academy of Dental Materials*. 2007 Jan;23(1):34-9.
116. Schweikl H, Hiller KA, Eckhardt A, Bolay C, Spagnuolo G, Stempfl T, et al. Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials*. 2008 Apr;29(10):1377-87.
117. Janke V, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W. TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2003 Oct;82(10):814-8.

118. 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. *Mutation Res.* 2008 Jan 8;649(1-2):79-90.
119. 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. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2002;63(4):418-23.
120. 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 Aug;25(19):4573-80.
121. Imazato S, Horikawa D, Nishida M, Ebisu S. Effects of monomers eluted from dental resin restoratives on osteoblast-like cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials.* 2009 Feb;88(2):378-86.
122. Theilig C, Tegtmeier Y, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of BisGMA and TEGDMA on proliferation, migration, and tenascin expression of human fibroblasts and keratinocytes. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2000;53(6):632-9.
123. Silva VV, Lameiras FS, Lobato ZI. Biological reactivity of zirconia-hydroxyapatite composites. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2002;63(5):583-90.
124. Caughman WF, Caughman GB, Shiflett RA, Rueggeberg F, Schuster GS. Correlation of cytotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. *Biomaterials.* 1991 Oct;12(8):737-40.
125. Polydorou O, Trittler R, Hellwig E, Kummerer K. Elution of monomers from two conventional dental composite materials. *Dental Materials:official publication of the Academy of Dental Materials.* 2007 Dec;23(12):1535-41.
126. Yap AU, Han VT, Soh MS, Siow KS. Elution of leachable components from composites after LED and halogen light irradiation. *Oper Dent.* 2004 Jul-Aug;29(4):448-53.
127. 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 Bucal.* 2011 Mar;16(2):e252-9.
128. Knezevic A, Zeljezic D, Kopjar N, Tarle Z. Cytotoxicity of composite materials polymerized with LED curing units. *Oper Denti.* 2008 Jan-Feb;33(1):23-30.

129. World Health Organization (WHO) Guidance for Identifying Populations at Risk from Mercury Exposure. IOMC Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals (UNEP. UNEP DTIE Chemicals Branch and WHO Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases); Geneva, Switzerland: 2008.. Mercury Publications. [cited 2023 May 22] Available online:<https://www.who.int/foodsafety/publications/chem/mercuryexposure.pdf> [Google Scholar]
130. Galić N, Prskalo K, Prpić-Mehičić G, Šutalo J, Anić I, Prester Lj. Toksičnost dentalnog amalgama I. *Acta Stomatol Croat.* 1997;31:243-51.
131. Ajsuvakova OP, Tinkov AA, Aschner M, Rocha JBT, Michalke B, Skalnaya MG, Skalny AV, Butnariu M, Dadar M, Sarac I, Aaseth J, Bjørklund G. Sulfhydryl groups as targets of mercury toxicity. *Coord Chem Rev.* 2020; 417:213343.
132. Homme KG, Kern JK, Haley BE, Geier DA, King PG, Sykes LK, Geier MR. New science challenges old notion that mercury dental amalgam is safe. *Biometals.* 2014; 27:19–24.
133. Di Pietro A, Visalli G, La Maestra S, Micale R, Baluce B, Matarese G, Cingano L, Scoglio ME. Biomonitoring of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of subjects with dental restorative fillings. *Mutat Res.* 2008; 650:115–22.
134. Sánchez-Alarcón J, Milić M, Bustamante-Montes LP, Isaac-Olivé K, Valencia-Quintana R, Ramírez-Durán N. Genotoxicity of mercury and its derivatives demonstrated in vitro and in vivo in human populations studies. Systematic review. *Toxics.* 2021;9(12):326.
135. Sibley R, Mutter J. An Overview of Evidence that Mercury from Dental Fillings may be an Etiological Factor in Many Health Disorders. *J Biomed Res Environ Sci.* 2021; 2:472-85.
136. Bartel-Steinbach M, Lermen D, Gwinner F, Schäfer M, Göen T, Conrad A, Weber T, von Briesen H, Kolossa-Gehring M. Long-term monitoring of mercury in young German adults: Time trend analyses from the German Environmental Specimen Bank, 1995–2018. *Environ Res.* 2022; 207:112592.
137. Shahi S, et al. A review on potential toxicity of dental material and screening their biocompatibility. *Toxicol Mech Methods.* 2019;29(5):368-77.
138. Schmaltz et al. Biocompatibility of amalgam vs composite-a review. *Oral Health Prev Dent.* 2022;20(1):149-56.

139. Chemicals of Public Health Concern. World Health Organisation. 2020. [cited 2023 May 22] Available from: <https://www.who.int/news-room/to-story/photo-story-detail/10-chemicals-of-public-health-concer>.
140. Amalgam (Part 2): Safe Use and Phase Down of Dental Amalgam. Adopted by the FDI General Assembly: 27-29 September 2021, Sydney,. Australia. [cited 2023 May 22] Available from: [www.fdiworlddental.org/amalgam-part-2-safe-use-and-phase-down-dental-amalgam](http://www.fdiworlddental.org/amalgam-part-2-safe-use-and-phase-down-dental-amalgam)
141. Galić N, Prpić-Mehičić G. Dentalni amalgami. U: Mehulić K i suradnici. Dentalni materijali. Zagreb: Medicinska naklada; 2017.
142. Molin C. Amalgam - Fact and Fiction. Scand J Res. 1992; 100:66-73.
143. Wirz J, Leupin TH, Schmidli F. Moderne Amalgame-Politur und Korosionsverhalten in-In vitro-Versuch. Quintessenz. 1990; 7:1129-44.
144. Marek M. Interactions between Dental Amalgams and the oral enviroment. Adv Dent Res. 1992; 6:100-9.
145. Lussi A et al.. Toxikologie der Amalgame. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 1989; 99:55-8.
146. Kaga M, et al. Citotoxicity of amalgam alloys, and their elements and phases. Dent Mater. 1991; 7:68-72.
147. Müller-Fahlbusch H, Wohnin GT. Psychosomatische Untersuchung der mit Amalgamfüllungen in Verbindung gebrachten Beschwerden. Dtsch Zahnarztl Z. 1983; 38:665-9.
148. Eversole LR, Ringer M. The role of dental restorative materials in the pathogenesis of oral lichen planus. Oral Surg. 1984; 57:383-7.
149. Owens BM et al. Oral Amalgam Tattoos: A Diagnostic Study. Compend Contin Educ Dent. 1993;XIV(2):210-5.
150. Thompson CC. Dentistry and the multiple sclerosis patient. J Oral Med. 1986; 38:34-42.
151. Larsson KS. Teratological Aspects of Dental Amalgam. Adv Dent Res. 1992; 6:114-20.
152. Bayne SC. The amalgam controversy. Quintessence Int. 1991; 22:247-8.
153. Hickel R et al. Nebenwirkungen von Amalgam? - Eine interdisziplinäre Studie. Dtsch Zahnarztl Z. 1991; 46:542-4.
154. Wilhelm M et al. Einfluß von Amalgam auf Zellen des Imunsystems. Dtsch Zahnarztl Z. 1991; 46:544-7.



155. Van Wacs H, Lutz F. Elektrogalvanismus in der Mundhöhle. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 1989; 99:203-7.
156. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate based dental resins. Biomaterials. 2002Apr;23(8):1819-29.
157. Ahmed RH, Aref MI, Hassan RM, Mohammed NR. Cytotoxic effect of composite resin and amalgam filing materials on human labial and buccal epithelium. Nat Sci. 2010; 8(10):48-53.
158. Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. Genet Mol Res. 2002; 1:246–60.
159. Stich HF, Stich W, Rosin MP, Vallejera MO. Use of the micronucleus test to monitor the effect of vitamin A, beta-carotene and canthaxanthin on the buccal mucosa of betel nut/tobacco chewers. Int J Cancer. 1984; 34:745–50.
160. Van Schooten FJ, Besaratinia A, De Flora S, D'Agostini F, Izzotti A, Camoirano A, Balm AJ, Dallinga JW, Bast A, Haenen GR, Van't Veer L, Baas P, Sakai H, Van N, Zandwijk. Effects of oral administration of N-acetyl-L-cysteine: a multibiomarker study in smokers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002; 11:167–75.

## **8. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA**

Milena Trutina Gavran rođena je 24. rujna 1977. godine. U Ljubuškom završava osnovnu školu i opću gimnaziju 1996. godine. Iste godine upisuje Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 10. siječnja 2002. godine. Od 2003. godine radi kao doktor dentalne medicine u Domu zdravlja Vrgorac.

Na Poslijediplomskom magistarskom studiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu obranila je u prosincu 2012. godine Magistarski rad pod nazivom: "Učestalost nepogodnih navika kod djece predškolske dobi". Na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je Poslijediplomski doktorski studij, gdje je izradila doktorsku disertaciju pod nazivom „Procjena citotoksičnoga i genotoksičnoga utjecaja suvremenih dentalnih materijala *in vivo*“.

Od 2019. godine je u zvanju višeg asistenta na Katedri za dentalnu morfologiju i antropologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Mostaru. Sudjelovala je aktivno na više znanstvenih i stručnih skupova.

Član je Hrvatske komore dentalne medicine i počasni član Hrvatskog društva za estetsku medicinu.

Udana je i majka je dvoje djece.

### **8.1. Popis objavljenih radova**

1. Trutina Gavran M, Meštrović S, Jurić H. Level of oral health in a sample of Croatian suburb pre-school children//Caries Research. Basel:Karger Publishers, 2014.409-409
2. Tadin A,Trutina Gavran M, Gavić L, Gović T, Galić N, Želježić D. *In vivo* comparison of genotoxic and cytotoxic effects of different brands of toothpaste without and with fluoride. Acta Stomatol Croat. 2017;51(4):371-2.
3. Jurić Kaćunić D, Matijević J, Tadin A, Trutina Gavran M, Galić N. Učinkovitost recipročnih instrumenata pri uklanjanju punila temeljenih na MTA Fillapex, AH Plus punilu i gutaperki. 6<sup>th</sup> Congress of School of Dental Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia, February, 2020.
4. Jurić Kaćunić D, Tadin A, Dijanić P, Katunarić A, Matijević J, Trutina Gavran M, Galić N. Učinkovitost recipročnih instrumenata u ponovnom liječenju bioaktivnih i smolastih sredstava za zatvaranje korijenskih kanala. Acta Stomatol Croat. 2022;56:338-50.
5. Galić N, Čelić R, Erceg D, Gavić L, Mandić-Negovetić V, Matijević J, Prskalo K,

Rulek G, Šegović S, Trutina Gavran M. Uvod u dentalnu medicinu. Udžbenik za stjecanje kvalifikacije dentalni asistent. Zagreb: Medicinska naklada, 2021.

6. Trutina Gavran M, Želježić D, Vranić L, Negovetić Vranić D, Grabarević L, Jurić-Kaćunić D, Tadin A, Šegović S, Galić N. Procjena citotoksičnog i genotoksičnog utjecaja suvremenih dentalnih materijala *In vivo*. Acta Stomatologica Croatica 2023.

7. Negovetić Mandić V, Plančak L, Marović D, Tarle Z, Trutina Gavran M, Par M. Mechanical properties of alkasite material with different curing modes and simulated aging conditions. Materials, Basel June 2024.